



Caractérisation des fonctions génomiques de variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Pauline Ould Madi-Berthelemy

► To cite this version:

Pauline Ould Madi-Berthelemy. Caractérisation des fonctions génomiques de variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. Cancer. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ112 . tel-03270758

HAL Id: tel-03270758

<https://theses.hal.science/tel-03270758>

Submitted on 25 Jun 2021

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (ED 414)

**CNRS UMR 7104 – INSERM U1258 :
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)**

THÈSE présentée par :

Pauline OULD MADI - BERTHELEMY

soutenue le : **25 septembre 2018**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

**Caractérisation des fonctions génomiques de
variants du récepteur des androgènes dans le
cancer de la prostate**

THÈSE dirigée par :
M. Jocelyn CERALINE

MCU-PH, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
M^{me} Anne CHAUCHEREAU
M. Francis VACHEROT

DR, Université Paris-Sud
PR-PUPH, Université Paris-Est Créteil

AUTRE MEMBRE DU JURY :
M^{me} Isabelle BILLAS MASSOBRIO

CR, Université de Strasbourg

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Isabelle Billas Massobrio, Anne Chauchereau et Francis Vacherot qui ont accepté de constituer mon jury de thèse et me font l'honneur d'étayer ce travail de leur regard critique. Isabelle, un merci tout particulier pour ton sourire, tes encouragements et des conseils au cours de ces dernières années.

J'aimerais ensuite remercier Jocelyn Céraline, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès le stage de Master 1, m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse et donner l'opportunité de prendre part à plusieurs congrès scientifiques en France ou à l'étranger au cours de ces cinq ans d'encadrement.

Merci à Bruno Kieffer, chef d'équipe dans laquelle je termine ma thèse, de m'avoir initiée à l'analyse de données et au langage Python mais aussi de m'avoir permis d'apposer un autre regard sur les résultats obtenus au laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Edwige, Eva, Félicie, Marine, Louise, Mahan, Maria et Rachel qui ont rythmé mon quotidien au laboratoire. Merci Eva pour ta pédagogie, ton aide et tes conseils. Félicie et Marine, cela fait longtemps que vous avez quitté le navire mais le souvenir de toutes les connaissances techniques que vous m'avez transmises mais aussi de tous les bons moments partagés ensemble me font penser à vous avec un sincère sourire. Edwige, nous avons formé un bon binôme toutes les deux et je suis heureuse d'avoir partagé avec toi ces congrès, ces nombreuses discussions et tous ces bons moments, aussi bien professionnels qu'amicaux. Louise, Mahan, Maria et Rachel, votre passage a été de courte durée mais vous avez apporté avec vous beaucoup de vie au laboratoire et ça a été un plaisir d'être à vos côtés durant ces quelques mois de stage.

C'est maintenant au tour des garçons. Karim, grand compagnon de la pause-café, merci pour ta présence, ton soutien et ton amitié tout simplement. Claude, merci mille fois pour m'avoir aidée à dompter le Biomek 4000 et pour t'être penché sur les réalisations graphiques avec Python. Tous les deux à votre manière, vous avez parsemé mon passage à l'IGBMC de petites attentions qui m'ont fait chaud au cœur.

J'adresse mes remerciements aux personnes qui m'ont aidée à l'IGBMC. Merci à Betty Heller et à tout le service de culture cellulaire pour les précieux services que vous nous rendez au quotidien et les conseils judicieux dispensés avec beaucoup de gentillesse. J'aimerais également remercier la plateforme GenomEast et plus particulièrement Céline Keime, Mathieu

Jung et Tao Ye pour l'aide à l'analyse des projets haut-débit que nous avons menés. Merci aussi à Eric Huntzinger pour m'avoir initiée à la purification de complexes protéiques, accueillie de nombreuses fois sur ta paillasse et pour avoir discuté de mes résultats avec toute ton expérience mais toujours beaucoup de bienveillance. Merci à Nicolas Le May pour l'utilisation du sonicateur du quatrième étage et la bonne humeur et la sympathie qui te caractérisent. Enfin, merci à Anna Isavella Rerra et à Gilles Laverny pour leur aide en ce qui concerne l'analyse des données de RNA-seq et pour les discussions scientifiques ou non que nous avons pu avoir ensemble.

J'ai une pensée pour l'association l'Alsace contre le Cancer et remercie chaleureusement tous les bénévoles d'avoir accepté de consacrer une partie des fonds de l'association au financement de mes travaux de thèse. J'aimerais tout particulièrement remercier Guy Hann et Solange Konning avec qui j'ai eu l'occasion d'avoir plus d'échanges et qui ont toujours eu une parole bienveillante et sympathique lors de nos entrevues.

Enfin, je remercie de tout mon coeur mes amis et ma famille, notamment Adrien et mes parents pour leur soutien inconditionnel et leur réconfort. Ces dernières années n'ont pas toujours été de tout repos mais grâce à vous, le navire est resté à flot et nous voilà aujourd'hui arrivés au bout de ce voyage. Agathe, mon chat d'amour, tu seras la seule à trouver en ces lignes un message plus personnel. Ton arrivée a inondé ma vie d'un bonheur incommensurable et, chaque matin, ton sourire au réveil est la plus belle façon de commencer une journée, qu'il fasse soleil ou pluie au dehors. Vous êtes, avec ton papa, le plus grand trésor de ma vie et je chéris avec bonheur cette famille que nous avons créée tous les trois.

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	9
<i>Liste des illustrations</i>	16
INTRODUCTION	19
<i>I. Les androgènes</i>	20
1) Biosynthèse des androgènes	21
2) Transport des androgènes	23
3) Régulation de la synthèse des androgènes	24
<i>II. Le récepteur des androgènes</i>	26
1) Récepteurs nucléaires.....	26
2) Structure du récepteur des androgènes.....	28
a. Domaine amino-terminal.....	29
b. Domaine de liaison à l'ADN	31
c. Région charnière.....	32
d. Domaine de liaison au ligand.....	33
3) Modifications post-traductionnelles	36
a. Phosphorylation	37
b. Acétylation	38
c. Méthylation.....	38
d. Ubiquitinylation.....	39
e. Sumoylation	40
4) Voies de signalisation du récepteur des androgènes.....	41
a. Voie génomique	41
- Modulation de la reconnaissance de l'ADN	43
- Activation de la transcription	43
- Répression de la transcription.....	45
b. Voie non-génomique.....	46
<i>III. La glande prostatique.....</i>	48
1) Développement embryonnaire de la prostate	48
2) Anatomie de la prostate	50
3) Histologie de la prostate	52

a. Epithélium prostatique	52
- Cellules luminales	53
- Cellules basales	53
- Cellules neuroendocrines.....	53
- Cellules intermédiaires.....	54
- Cellules souches	55
b. Stroma prostatique.....	55
4) Fonction exocrine de la prostate	56
<i>IV. Le cancer de la prostate</i>	<i>57</i>
1) Epidémiologie.....	57
a. Incidence mondiale	57
b. Mortalité mondiale.....	58
c. Facteurs de risque	59
- Age.....	59
- Origine géographique.....	60
- Antécédents familiaux.....	60
d. Gènes de susceptibilité.....	61
2) Cancérogenèse prostatique	62
a. Atrophie inflammatoire proliférative	63
b. Néoplasie intra-épithéliale.....	64
c. Carcinome invasif.....	66
3) Diagnostic.....	67
a. Dosage du PSA	68
b. Toucher rectal	69
c. Biopsies.....	69
d. Imagerie à résonance magnétique	71
4) Prise en charge thérapeutique	71
a. Cancers localisés.....	72
- Surveillance active	72
- Chirurgie.....	72
- Radiothérapie.....	73
- Thérapies alternatives : cryothérapie et ultrasons	73
b. Cancers métastatiques hormono-naïfs	74
- Agonistes et antagonistes de la LH-RH	74
- Anti-androgènes.....	74

<i>V. La résistance à la castration</i>	75
1) Traitement	76
a. Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des stéroïdes	76
b. Anti-androgènes de deuxième génération	77
c. Chimiothérapie	78
d. Immunothérapie	78
2) Mécanismes de résistance	79
a. Modifications dépendantes du récepteur des androgènes	79
- Amplification génique et surexpression du récepteur	79
- Surexpression de cofacteurs	82
- Activation aberrante du récepteur des androgènes	82
- Modification de la biosynthèse des androgènes	83
b. Modifications indépendantes du récepteur des androgènes	84
- Bypass du récepteur des androgènes par le récepteur des glucocorticoïdes	85
- Activation des voies prolifératives et anti-apoptotiques	85
- Différenciation neuroendocrine	86
3) Variants du récepteur des androgènes	86
a. Mutations faux-sens et insertions	87
b. Perte du domaine de liaison au ligand	88
- Protéolyse par la calpaïne 2	88
- Mutations non-sens	89
- Epissages alternatifs	89
 PARTIE 1 : Fonctions génomiques des variants RA-Q641X et RA-V7	93
<i>I. Objectifs de recherche</i>	94
<i>II. Régulation de la N-cadhérine</i>	95
1) Introduction	95
2) Publication 1	95
3) Conclusion	116
<i>III. Analyse transcriptionnelle</i>	117
1) Introduction	117
2) Publication 2	117
3) Conclusion	136

PARTIE 2 : Fonctions génomiques du variant RA-T576A	138
<i>I. Description de la mutation.....</i>	<i>139</i>
<i>II. Matériel et méthodes.....</i>	<i>141</i>
1) Plasmides.....	141
2) Culture cellulaire.....	142
3) ChIP-seq	142
4) Test luciférase	143
5) Transcription inverse et PCR quantitative	143
6) RNA-seq.....	144
7) Analyse des données haut-débit.....	144
<i>III. Résultats</i>	<i>145</i>
1) Liaison à l'ADN du récepteur sauvage et du variant T576A.....	145
a. Cistrome commun et sites de liaison spécifiques	146
b. Modification de la séquence d'ADN reconnue par le récepteur.....	147
2) Transcriptomes du récepteur sauvage et du variant T576A	149
a. Transcriptome commun et sets de gènes spécifiques.....	153
b. Impact de la mutation T576A sur les fonctions régulées par le récepteur	154
3) Croisement des données haut-débit	155
<i>IV. Conclusion</i>	<i>157</i>
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	159
<i>I. Variants constitutifs et transcription</i>	<i>160</i>
1) Perspectives de recherche.....	160
2) Avancées thérapeutiques.....	161
<i>II. Activité transcriptionnelle du variant T576A</i>	<i>163</i>
<i>III. Hétérogénéité tumorale.....</i>	<i>164</i>
1) Différents niveaux de variabilité génétique.....	164
2) Stratégies de recherche actuelles et perspectives.....	166
 <i>Références bibliographiques.....</i>	<i>168</i>
<i>Communications scientifiques.....</i>	<i>189</i>

Liste des abréviations

17βHSD = 17-β-hydroxystéroïde déshydrogénase

3βHSD = 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase/ Δ⁵-Δ⁴-isomérase

ACK1 = activated CDC42 kinase 1

ACTH = hormone adrénocorticotrophique

AF-1 = fonction de transactivation 1

AF-2 = fonction de transactivation 2

AKR1C3 = aldo-keto reductase family 1 member C3

AKT = AKR thymoma oncogene

AMACR = α-methylacyl-CoA racemase

AP-1 = activator protein 1

ARA = androgen receptor-associated protein

ARE = élément de réponse aux androgènes

ASF/SF2 = alternative splicing factor / pre-mRNA-splicing factor 2

BCL2 = B-cell lymphoma 2

BRCA1 = breast cancer type 1 susceptibility protein

BRCA2 = breast cancer type 2 susceptibility protein

CARM1 = coactivator-associated arginine methyltransferase 1

CaP = cancer de la prostate

CBP = cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein

CD44 = cluster of differentiation 44

CD57 = cluster of differentiation 57

CD133 = cluster of differentiation 133

CDH2 = cadherin 2

CDK = CCAAT/enhancer-binding protein Δ

CEBPD = kinase cycline-dépendante

CHIP = C-terminus of HSP70-interacting protein

ChIP = immunoprécipitation de la chromatine

ChIP-seq = immunoprécipitation de la chromatine suivie d'un séquençage haut-débit

CK = cytokératine

CREB = cAMP-response element-binding protein

CRH = hormone de libération des corticotropines

CRPC = cancer de la prostate résistant à la castration

CTD = domaine carboxy-terminal

CTLA4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen-4

DAXX = death-domain associated protein

DBD = domaine de liaison à l'ADN

D-box = boîte distale

DHEA = déhydroépiandrostérone

DHEA-S = sulfate de déhydroépiandrostérone

DHT = dihydrotestostérone

E1 = enzyme d'activation de l'ubiquitine

E2 = enzyme de conjugaison de l'ubiquitine

E3 = ubiquitine ligase

EGF = epidermal growth factor

eGFP = enhanced green fluorescent protein

EGFR = epidermal growth factor receptor

EGR-1 = early growth response protein 1

eIF4B = eukaryotic translation initiation factor 4B

ELAC2 = zinc phosphodiesterase ELAC protein 2

ELK-1 = E26 transformation specific (ETS) domain-containing protein

ERG = E26 transformation specific (ETS) erythroblastosis virus E26 oncogene homolog

ERK1/2 = extracellular regulated kinase 1/2

ETK = epithelial and endothelial tyrosine kinase

ETS2 = ETS proto-oncogene 2

ETV5 = ETS variant 5

FGF-7 = fibroblast growth factor 7

FKBP-4 = FK506 binding protein 4

FOXA1 = forkhead box protein A1

FSH = hormone folliculo-stimulante

GATA2 = GATA binding protein 2

GSEA = gene set enrichment analysis

GST π = glutathione-S transferase π protein

GSTP1 = glutathione-S transferase π gene

H2AK119Ub1 = mono-ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A

H2BK120ub1 = mono-ubiquitinylation de la lysine 120 de l'histone H2B

H3K4me2 = diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K4me3 = triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K9me3 = triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3

H3K27me3 = triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3

H3K36me3 = triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3

H3K79me3 = triméthylation de la lysine 79 de l'histone H3

HDAC = histone déacétylase

HER2 = human epidermal growth factor receptor 2

HES1 = hes family BHLH transcription factor 1

HGF = hepatocyte growth factor

HIFU = ultrasons focalisés de haute intensité

hnRNPA1 = heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

HOXB13 = homeobox B13

HPC1 = hereditary prostate cancer 1

HSP = heat shock protein

IGF-1 = insulin-like growth factor 1

IGFBP3 = insulin-like growth factor binding protein 3

IRM = imagerie à résonance magnétique

KDM4 = lysine déméthylase 4

KGF = keratinocyte growth factor

KIP1 = kinesin like protein 1

LBD = domaine de liaison au ligand

LBP = poche de liaison du ligand

LH = hormone lutéinisante

LHRH / GnRH = hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

MAPK = mitogen-activated protein kinase

MDM2 = mouse double minute 2 homolog

MDSC = cellule myéloïde suppressive

MED1 = mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1

MEK = mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase

MID1 = E3 ubiquitin protein-ligase midline 1

MSC1 = macrophage scavenger receptor 1

mTOR = mammalian target of rapamycin

NCoR = nuclear receptor corepressor 1

NF- κ B = nuclear factor κ B

NKX3-1 = NK3 homeobox 1

NLS = séquence de localisation nucléaire

NME2 = nucleoside diphosphate kinase 2

NR3C1 = nuclear receptor subfamily 3 group C member 1

NR5A2 = nuclear receptor subfamily 5 group A member 2

NSE = émolase spécifique des neurones

NTD = domaine amino-terminal

OATP1A2 = organic anion transporting polypeptide 1A2

P300/CBP = p300/ cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein

PBGD = porphobilinogen deaminase

P-box = boîte proximale

P/CAF = p300/ cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)-associated factor

PCGEM1 = prostate cancer gene expression marker 1

PD1 = programmed cell death 1

PEST = séquence riche en proline, glutamate, sérine et thréonine

PI3K = phosphoinositide 3-kinase

PIA = atrophie inflammatoire proliférative

PIAS = protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT)

PIN = néoplasie intra-épithéliale

PITX1 = pituitary homeobox 1

PK = protéine kinase

poly-G = séquence poly-glycine

poly-Q = séquence poly-glutamine

PP1 = protéine phosphatase 1

PP2A = protéine phosphatase 2A

PSA = antigène spécifique prostatique

PTEN = phosphatase and tensin homolog

qPCR = PCR quantitative

RA = récepteur des androgènes

RA-WT = récepteur des androgènes sauvage

RAR = récepteur de l'acide rétinoïque

RB1 = retinoblastoma 1

RBX1 = ring box 1

RG = récepteur des glucocorticoïdes

RMN = résonance magnétique nucléaire

RNase L = ribonucléase L

RNA-seq = Séquençage haut-débit des ARN

RNF6 = ring finger protein 6

ROR γ = retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor γ

S6K = 40S ribosomal S6 kinase

SDR5A2 = steroid 5- α -reductase 2

SENP = sentrine / SUMO-spécifique

SET9 = su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax (SET)-domain protein 9

SF1 = facteur de stéroïdogenèse 1

SF-1 = splicing factor 1

SGT- α = small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein α

SHBG = globuline liant les hormones sexuelles

SMAD3 = SMAD family member 3

SNURF = small nuclear RING finger protein

SOX9 = sex determining region Y (SRY)-box 9

SP1 = specificity protein 1

SPOP = speckle-type pox virus and zinc finger (POZ) protein

Src = sarcoma tyrosine kinase

SRC-1 = steroid receptor co-activator 1

SRC-2 = steroid receptor co-activator 2

SRC-3 = steroid receptor co-activator 3

SRY = sex determining region Y

StAR = protéine activatrice de la stéroïdogénèse

STAT3 = signal transducer and activator of transcription 3

SUMO = small ubiquitin-like modifier

SWI/SNF = switching defective/sucrose non-fermenting complex

TACSTD2 = tumor-associated calcium signal transducer 2

Tau = unité d'activation transcriptionnelle

TBP = TATA binding protein

TCTP = translationally controlled tumor protein

TFII = transcription factor II

TGFβ = transforming growth factor β

TIP60 = TAT interacting protein, 60KDa

TMPRSS2 = transmembrane protease, serine 2

TNM = tumor, metastasis, node classification

U2AF65 = U2 snRNP auxiliary factor 65KDa subunit

UBC9 = ubiquitin conjugating enzyme 9

USP-26 = ubiquitin specific peptidase 26

VEGF = vascular endothelial growth factor

ZEB1 = Zinc finger E-box binding homeobox 1

Liste des illustrations

Figures

Figure 1 (p.21) : Conversion du cholestérol en prégnénolone.

Figure 2 (p.22) : Cascade enzymatique de la voie de biosynthèse des androgènes $\Delta 5$.

Figure 3 (p.23) : Cascade enzymatique de la voie de biosynthèse des androgènes $\Delta 4$.

Figure 4 (p.25) : Régulation hormonale de la production d'androgènes.

Figure 5 (p.28) : Structure schématique des récepteurs nucléaires.

Figure 6 (p.29) : Structure du récepteur des androgènes.

Figure 7 (p.30) : Domaine amino-terminal du récepteur des androgènes.

Figure 8 (p.31) : Structure en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN.

Figure 9 (p.32) : Architecture des domaines de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes liés à un élément de réponse en répétition directe.

Figure 10 (p.33) : Structure cristallographique du peptide de localisation nucléaire complexé à l'importine- α .

Figure 11 (p.34) : Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand.

Figure 12 (p.35) : Représentation du domaine de liaison au ligand en présence de R1881, de DHT ou de testostérone.

Figure 13 (p.36) : Influence des interactions entre les domaines amino-terminal et carboxy-terminal sur le mode d'action du récepteur des androgènes.

Figure 14 (p.37) : Sites de phosphorylation du récepteur des androgènes.

Figure 15 (p.39) : Mécanisme d'ubiquitylation d'un substrat.

Figure 16 (p.40) : Mécanisme de sumoylation d'un substrat.

Figure 17 (p.42) : Mode d'action génomique du récepteur des androgènes.

Figure 18 (p.43) : Régulation de la transcription par les marques histones.

Figure 19 (p.44) : Activation de la transcription du *PSA*.

Figure 20 (p.47) : Voies de signalisation croisées du récepteur des androgènes.

Figure 21 (p.49) : Développement embryonnaire de la gonade indifférenciée.

Figure 22 (p.51) : Organisation de l'appareil uro-génital masculin à l'âge adulte.

Figure 23 (p.52) : Représentation schématique de l'anatomie de la prostate.

Figure 24 (p.54) : Représentation de l'épithélium prostatique.

Figure 25 (p.56) : Communication entre le stroma et l'épithélium.

Figure 26 (p.58) : Incidence du cancer de la prostate.

Figure 27 (p.59) : Mortalité du cancer de la prostate.

Figure 28 (p.63) : Formation du cancer de la prostate.

Figure 29 (p.65) : Télomères courts des cellules luminales des néoplasies intraépithéliales prostatiques.

Figure 30 (p.67) : Mécanisme de dissémination métastatique vers les os.

Figure 31 (p.70) : Représentation des différents scores de Gleason.

Figure 32 (p.76) : Adaptation ou sélection des cellules en réponse à la privation androgénique.

Figure 33 (p.80) : Implication de MID1 dans la traduction des ARN messagers.

Figure 34 (p.81) : Implication de la mutation de SPOP dans le cancer de la prostate.

Figure 35 (p.89) : Variants du récepteur des androgènes issus de mutations non-sens.

Figure 36 (p.90) : Structure des variants d'épissage du récepteur des androgènes.

Figure 37 (p.92) : Détection du RA-V7 dans les exosomes et survie des patients.

Figure 38 (p.139) : Localisation du résidu T576 au sein du domaine de liaison à l'ADN.

Figure 39 (p.140) : Structure des domaines de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes sauvage ou porteur de la mutation T576A.

Figure 40 (p.145) : Vérification de l'immunoprécipitation de la chromatine avant séquençage.

Figure 41 (p.147) : Impact de la mutation T576A sur le cistrome du récepteur des androgènes.

Figure 42 (p.148) : Découvertes de motifs privilégiés différents pour les deux formes du récepteur.

Figure 43 (p.149) : Profils d'activité transcriptionnelle séquence-dépendants du récepteur sauvage ou porteur de la mutation T576A.

Figure 44 (p.151) : Transcriptomes du récepteur des androgènes sauvage et du mutant T576A.

Figure 45 (p.152) : Régulation de gènes appartenant à la fonction de réponse aux androgènes.

Figure 46 (p.153) : Vérification des données de RNA-seq.

Figure 47 (p.154) : Comparaison des transcriptomes du récepteur sauvage et du mutant T576A après 24 ou 72h de traitement à la DHT.

Figure 48 (p.155) : Enrichissement fonctionnel des transcriptomes du récepteur sauvage ou mutant.

Figure 49 (p.156) : Croisement des données haut-débit.

Figure 50 (p.157) : Régulation de gènes connus pour répondre à la DHT ou à la dexaméthasone.

Figure 51 (p.162) : L'Acétate de Ralatinène cible le domaine amino-terminal du récepteur.

Figure 52 (p.166) : Arbre phylogénétique établi par séquençage d'échantillons d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique.

Figure 53 (p.167) : Hétérogénéité tumorale intercellulaire.

Tables

Table 1 (p.27) : Classification des récepteurs nucléaires.

Table 2 (p.60) : Incidence et mortalité du cancer de la prostate en France métropolitaine pour l'année 2013.

Table 3 (p.141) : Liste des oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides.

Table 4 (p.144) : Liste des primers utilisés en PCR quantitative.

INTRODUCTION

I. Les androgènes

Les hormones sont des substances biologiques synthétisées par des cellules dites endocrines. En étant sécrétées dans le sang ou la lymphe, elles permettent la transmission à distance d'un message chimique par action sur un organe ou un tissu dont les cellules expriment des récepteurs hormonaux.

Toutes les hormones stéroïdiennes sont produites à partir du cholestérol grâce à une cascade de réactions enzymatiques. Ces hormones sont divisées en 5 catégories : les androgènes, les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les progestatifs et les œstrogènes. Les androgènes sont des hormones sexuelles dont la structure particulière repose sur la présence de 19 atomes de carbone. Ils sont nécessaires au développement et au maintien des caractères sexuels masculins secondaires tels que la pilosité, l'élargissement des cordes vocales ou encore le développement de la masse musculaire mais sont surtout indispensables à la formation des organes sexuels, à la croissance de la prostate et à la fertilité.

Chez l'homme, les androgènes sont synthétisés par les cellules de Leydig localisées autour et entre les tubes séminifères du testicule mais aussi par les glandes corticosurrénales. La testostérone, majoritairement produite au niveau testiculaire, est le principal androgène circulant. Chez un homme adulte, le taux de testostérone dans le sang est de 0,3 à 1µg/dL. Ce taux diminue avec l'âge, avec une baisse pouvant aller jusqu'à 40% entre 40 et 70 ans. (Talih et al., 2007; Seidman, 2007).

Essentiellement connus pour leurs fonctions chez l'homme, les androgènes jouent également un rôle important chez la femme. Pour un individu adulte, le taux sanguin de testostérone varie en fonction du cycle menstruel, avec des concentrations de l'ordre de 0,30ng/mL en début de phase folliculaire et un pic de 0,45 à 0,80ng/mL en milieu de cycle. Les androgènes sont synthétisés par les ovaires et les glandes corticosurrénales et permettent aussi la mise en place des caractères sexuels tels que le développement du clitoris, de la pilosité pubienne et axillaire ou encore des glandes sébacées. De plus, ils sont nécessaires à la production d'œstrogènes et, de ce fait, à la maturation des follicules ovariens. Enfin, comme chez l'homme, ils exercent une action anabolisante sur la peau, le muscle et les os (Taieb and Lachgar, 2012).

1) Biosynthèse des androgènes

Qu'elle ait lieu au niveau des testicules, des ovaires ou des glandes corticosurrénales, la biosynthèse des androgènes repose sur les mêmes réactions enzymatiques et fait appel au même intermédiaire : la prégnénolone, commune à toutes les hormones stéroïdiennes.

Le cholestérol est le précurseur de tous les androgènes. Il peut être synthétisé *de novo* à partir de l'acétyl-Co-enzyme A, être extrait des stocks intracellulaires tels que la membrane plasmique ou les gouttelettes lipidiques ou provenir de la fraction circulante plasmatique transportée sous forme de lipoprotéines de faible densité. La première étape de biosynthèse a lieu dans les mitochondries. Le cholestérol étant un lipide, son import mitochondrial nécessite l'intervention d'une protéine de transport appelée protéine activatrice de la stéroïdogénèse (StAR). Ce mécanisme de transfert intra-mitochondrial constitue l'étape limitante de la biosynthèse des stéroïdes. Pour être converti en prégnénolone, le cholestérol subit alors 2 hydroxylations successives en position C20 et C22 par action respective des 20 α et 22 α -cholestérol-hydroxylases, puis un clivage de sa chaîne latérale par la 20-22 desmolase. Ces trois activités enzymatiques sont regroupées sur le cytochrome P450_{scc}, codé par le gène *CYP11A*. La prégnénolone est ensuite éjectée dans le réticulum endoplasmique où elle est métabolisée pour devenir biologiquement active (Figure 1) (Stuchbery et al., 2017; Tostain et al., 2004; Turcu et al., 2014).

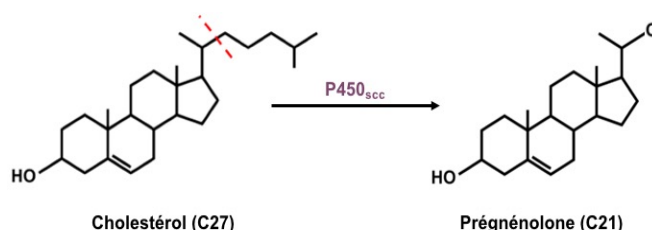


Figure 1 : Conversion du cholestérol en prégnénolone.

Pour être converti en prégnénolone, le cholestérol subit d'abord deux hydroxylations en C20 et C22 puis le clivage de sa chaîne latérale (rouge). Ces transformations reposent sur l'action enzymatique du cytochrome P450_{scc}. (d'après Stuchbery et al., 2017)

Deux voies de biosynthèse sont alors possibles pour aboutir à la synthèse de testostérone. La voie préférentielle, dite $\Delta 5$, met en jeu le cytochrome P450 17A1, codé par le gène *CYP17A1* pour obtenir la 17 α -hydroxyprégnénolone par hydroxylation du carbone C17. Le clivage de la chaîne latérale permet ensuite la production de déhydroépiandrostérone (DHEA). L'action collaborative des enzymes 3- β -hydroxystéroïde déshydrogénase / $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomérase (3 β HSD) et 17- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β HSD) conduit à la synthèse de testostérone par l'intermédiaire de $\Delta 4$ -androstènedione ou 5-androstènediol (Figure 2) (Stuchbery et al., 2017; Tostain et al., 2004).

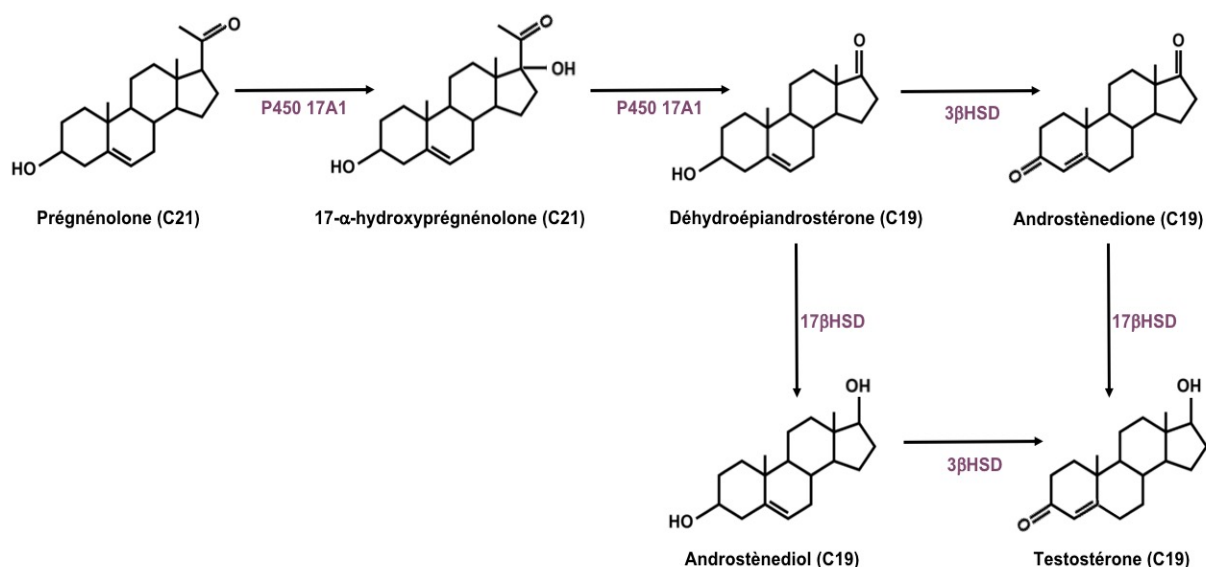


Figure 2 : Cascade enzymatique de la voie de biosynthèse des androgènes $\Delta 5$.

La prégnénolone est transformée en 17- α -hydroxyprégnénolone puis en DHEA par le cytochrome P450 17A1. L'action de la 17 β HSD et de la 3 β HSD permet la synthèse d'androstènediol et d'androstènedione, les deux donnant naissance à la testostérone. (d'après Stuchbery et al., 2017)

La voie de synthèse accessoire, appelée $\Delta 4$, fait quant à elle intervenir en premier lieu le complexe 3 β HSD pour former de la progestérone à partir de prégnénolone. La progestérone est ensuite transformée en 17- α -hydroxyprogestérone par hydroxylation puis en $\Delta 4$ -androstènedione après clivage par le cytochrome P450 17A1. L'action de la 17 β HSD permet ensuite la production de testostérone (Figure 3) (Stuchbery et al., 2017; Tostain et al., 2004).

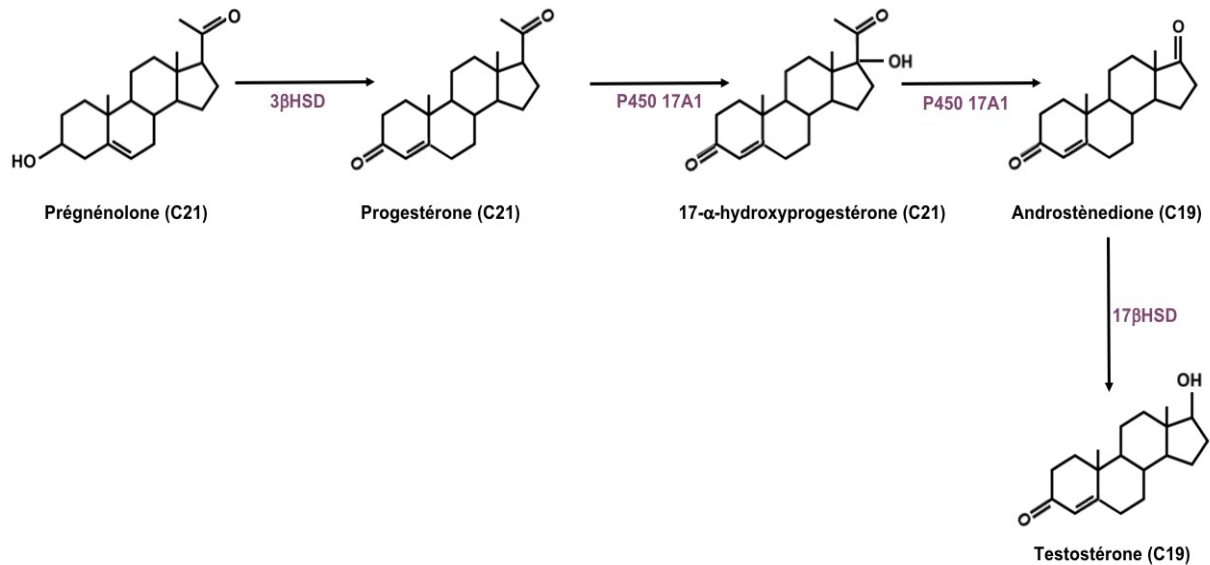


Figure 3 : Cascade enzymatique de la voie de biosynthèse des androgènes Δ4.

La progestérone est formée à partir de la prégnénolone par la 3βHSD. Le cytochrome P450 17A1 permet de produire la 17-α-hydroxyprogestérone puis l'androstènedione que la 17βHSD convertit en testostérone. (d'après Stuchbery et al., 2017)

La biosynthèse surrénalienne aboutit majoritairement à la production de DHEA et d'androstènediol. Ces androgènes sont sécrétés et apportés par la circulation sanguine aux tissus périphériques où ils sont convertis en testostérone. En conditions physiologiques, les glandes surrénales jouent un rôle minoritaire dans la production d'androgènes chez l'homme. En revanche, elles sont importantes pour la synthèse d'androgènes chez la femme. La production androgénique surrénale est également capitale au cours de la puberté mais aussi dans des pathologies comme le cancer de la prostate (Turcu et al., 2014).

2) Transport des androgènes

La testostérone diffuse librement à travers la membrane plasmique pour gagner la circulation plasmatique. Chez l'homme, la concentration en testostérone des veines spermatiques est de 100-600ng/mL et est 75 fois plus élevée que celle des veines périphériques. Dans le plasma, 2% de la testostérone circulent sous forme libre, 45 à 75% sont en complexe avec une protéine de transport appelée globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) et 30 à 55% sont liés à l'albumine (Ganong, 2005; Tostain et al., 2004).

La SHBG est une protéine produite par le foie. La liaison SHBG-testostérone est une liaison forte et la dissociation du complexe est difficile. Ainsi, la testostérone complexée à la SHBG n'est pas directement utilisable par les cellules cibles. Cette protéine de transport peut être considérée comme un réservoir permettant d'amortir les variations du taux de testostérone. Cela permet la régulation de la quantité de testostérone bio-disponible mais aussi l'augmentation de la clairance métabolique de la testostérone. En effet, sous forme libre, les androgènes sont rapidement catabolisés par le foie (Taieb and Lachgar, 2012; Tostain et al., 2004).

A l'inverse de la liaison SHBG-testostérone, la liaison mise en jeu entre l'albumine et la testostérone est faible. Ainsi, la fraction disponible pour l'utilisation tissulaire de la testostérone résulte de la somme de la testostérone libre et de celle liée à l'albumine. Au niveau des tissus cibles, la testostérone peut alors pénétrer dans les cellules par diffusion passive et agir sur le récepteur des androgènes (RA) soit de manière directe comme c'est le cas au niveau du muscle notamment, soit par le biais de son métabolite actif, la dihydrotestostérone (DHT), formée par action de la 5- α -réductase (Taieb and Lachgar, 2012; Tostain et al., 2004).

3) Régulation de la synthèse des androgènes

La biosynthèse des androgènes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'hypothalamus est une glande située à la base du cerveau, sur la face ventrale de l'encéphale. Elle appartient au système nerveux central et joue un rôle majeur dans le contrôle du système nerveux végétatif mais aussi du système endocrinien, notamment des sécrétions hypophysaires. L'hypophyse prend place dans une structure osseuse appelée selle turcique, juste en dessous de l'hypothalamus. L'hypophyse se compose de 2 parties : le lobe antérieur ou adénohypophyse et le lobe postérieur ou neurohypophyse. Seule l'adénohypophyse est impliquée dans le contrôle de la biosynthèse des androgènes.

L'hypothalamus sécrète l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (LH-RH ou GnRH) et des corticotropines (CRH) qui stimulent la glande pituitaire. Les cellules gonadotropes sécrètent alors des gonadotrophines, c'est-à-dire de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et les cellules corticotropes de l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH). Les gonadotrophines exercent leur action au niveau des testicules tandis que l'ACTH cible les glandes corticosurrénales. De manière schématique, il est admis que la FSH stimule la production de spermatozoïdes et la LH la synthèse

d'androgènes par les cellules de Leydig. L'ACTH va engendrer la production d'androgènes tels que le DHEA ou l'androstènediol par les glandes surrénales. Une fois synthétisés, les androgènes rejoignent les tissus cibles tels que la prostate par la voie sanguine (Figure 4) (Chen et al., 2009; Tostain et al., 2004).

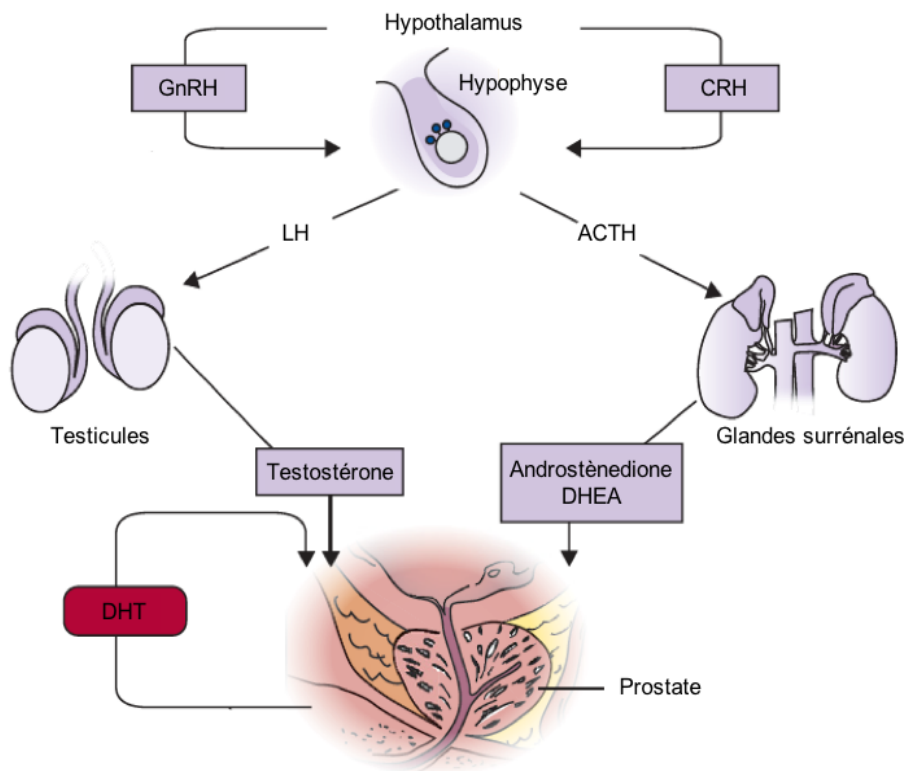


Figure 4 : Régulation hormonale de la production d'androgènes.

Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire contrôlant la production d'androgènes par les testicules et les glandes surrénales. (d'après Chen et al., 2009)

La production de gonadotrophines est régulée par une boucle de rétrocontrôle exercée par les androgènes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'action inhibitrice de la testostérone s'exerce à la fois sur l'hypothalamus, ce qui entraîne une baisse de la production de LH-RH, et sur l'hypophyse. La DHT et l'œstradiol prennent également part à ce rétrocontrôle mais ils exercent leur action frénatrice uniquement sur l'hypophyse. Il en résulte une baisse du taux plasmatique de FSH et LH et par conséquent, une moindre production d'androgènes par les cellules de Leydig des testicules. Les androgènes surrénaliens n'exercent quant à eux pas de rétrocontrôle sur la sécrétion d'ACTH, régulée par le cortisol (Chen et al., 2009).

II. Le récepteur des androgènes

Au sein des cellules cibles, les androgènes comme la testostérone ou plus particulièrement son métabolite actif, la DHT, exercent leur action par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire, le RA.

1) Récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires représentent une superfamille de facteurs de transcription jouant un rôle clé dans le développement et l'homéostasie des organismes pluricellulaires. Pour réguler l'expression de leurs gènes cibles, ils sont capables de reconnaître des séquences d'ADN spécifiques, appelées éléments de réponse et localisées dans les régions régulatrices.

Chez l'Homme, cette superfamille regroupe 48 récepteurs nucléaires dont seulement 24 sont connus pour être des facteurs de transcription ligand-dépendants. Ces derniers peuvent être subdivisés en 2 catégories : les récepteurs d'hormones stéroïdiennes et les récepteurs d'hormones non-stéroïdiennes. Les premiers fonctionnent sous forme de dimères et sont classiquement décrits comme étant séquestrés par des protéines chaperonnes dans le cytoplasme en absence de ligand. La liaison d'un agoniste entraîne alors la rupture de ce complexe et la translocation nucléaire du récepteur qui agit alors avec d'autres cofacteurs pour réguler la transcription de gènes cibles. A l'inverse, au stade non liés, les récepteurs d'hormones non-stéroïdes se retrouvent majoritairement dans le noyau où ils interagissent avec d'autres récepteurs nucléaires mais aussi avec des régulateurs de la transcription. La liaison du ligand a lieu dans le noyau et permet une fois encore de modifier l'expression des gènes cibles. Les récepteurs pour lesquels aucun ligand n'a été mis en évidence sont appelés récepteurs orphelins (Alexander et al., 2015).

Les récepteurs nucléaires dérivent tous d'un même ancêtre commun. Ainsi, l'alignement des séquences et l'élaboration de leur arbre phylogénétique ont permis la mise en place d'une classification en 6 groupes inégaux. Il existe une corrélation importante entre les caractéristiques de dimérisation et de liaison à l'ADN de chaque récepteur et la position qu'il y occupe (Table 1) (Germain et al., 2006).

Classe	Nomenclature	Abreviation	Nom complet du récepteur	ligand naturel
I	NR1A1	TR α	récepteur des hormones thyroïdes	hormones thyroïdes
	NR1A2	TR β		
	NR1B1	RAR α	récepteur de l'acide rétinoïque	acide rétinoïque
	NR1B2	RAR β		
	NR1B3	RAR γ		
	NR1C1	PPAR α	récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssomes	acides gras leukotriène B4
	NR1C2	PPAR β		
	NR1C3	PPAR γ		
	NR1H3	LXR α	récepteur liver X	oxystérols
	NR1H2	LXR β		
	NR1I1	VDR	récepteur de la vitamine D	vitamine D
II	NR2A1	HNF4 α	facteur nucléaire hépatocytaire 4	récepteur orphelin
	NR2A2	HNF4 β		
	NR2B1	RXR α	récepteur X des rétinoïdes	acide rétinoïque
	NR2B2	RXR β		
	NR2B3	RXR γ		
	NR2C1	TR2	récepteur testiculaire 2	récepteur orphelin
III	NR2C2	TR4	récepteur testiculaire 4	récepteur orphelin
	NR3A1	ER α	récepteur des oestrogènes	oestradiol
	NR3A2	ER β		
	NR3C1	GR	récepteur des glucocorticoïdes	cortisol
	NR3C2	MR	récepteur des minéralocorticoïdes	aldostérone
	NR3C3	PR	récepteur de la progestérone	progestérone
IV	NR3C4	AR	récepteur des androgènes	testostérone - DHT
	NR4A1	NGFI-B	clone B induit par le NGF	récepteur orphelin
V	NR5A1	SF1	Facteur stéroïdogénique 1	récepteur orphelin
	NR5A2	LRH-1	homologue 1 du récepteur Liver	récepteur orphelin
VI	NR6A1	GCNF	facteur nucléaire des cellules germinales	récepteur orphelin

Table 1 : Classification des récepteurs nucléaires.

Seuls les membres les plus importants de chaque groupe sont représentés dans ce tableau. (d'après Germain et al., 2006)

De par leur origine commune, les récepteurs nucléaires possèdent une structure similaire. Ainsi, 4 domaines fonctionnels peuvent être décrits. Le domaine amino-terminal (NTD) est intrinsèquement désordonné, très variable en termes de taille et de séquence protéique. Il abrite la fonction de transactivation 1 (AF-1) qui est impliquée dans l'activation de la transcription. Il est également le lieu d'interaction protéique avec de nombreux cofacteurs. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) permet la reconnaissance des éléments de réponse. Le DBD est la région la plus conservée au sein des récepteurs nucléaires. Il se compose de 2 doigts de zinc impliqués dans l'interaction avec le sillon majeur de la double hélice d'ADN. Le DBD est aussi l'interface de dimérisation des récepteurs. La région charnière est quant à elle une région flexible qui permet les changements conformationnels intervenant après la liaison

du ligand. Elle comporte également la séquence de localisation nucléaire (NLS) permettant la translocation du récepteur vers le noyau où il exerce son action. Enfin, le domaine carboxy-terminal (CTD) comporte le domaine de liaison au ligand (LBD) mais aussi la fonction de transactivation 2 (AF-2) impliquée dans la régulation de la transcription de manière ligand-dépendante. Le CTD joue également un rôle important dans le recrutement de co-régulateurs ainsi que la dimérisation du récepteur (Figure 5) (Novac and Heinzel, 2004).

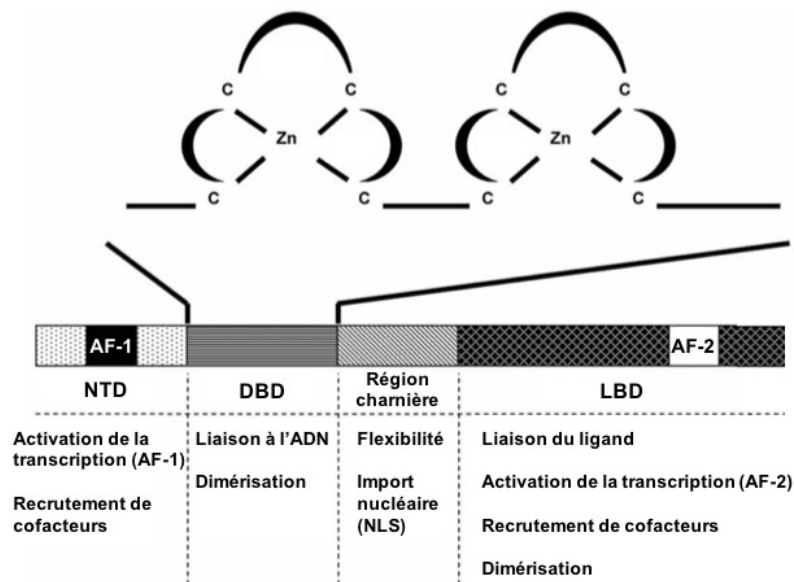


Figure 5 : Structure schématique des récepteurs nucléaires.

Représentation des quatre domaines communs aux récepteurs nucléaires et des fonctions associées. (d'après Novac and Heinzel., 2004)

2) Structure du récepteur des androgènes

Le RA appartient à la classe III des récepteurs nucléaires. Le gène codant est localisé sur le chromosome X, au locus Xq11-12 et s'étend sur environ 90 kilobases. Le cadre ouvert de lecture comporte 8 exons conduisant à une protéine de 920 acides aminés pour un poids moléculaire de 110 kilodaltons. La protéine regroupe les 4 domaines communs à tous les récepteurs nucléaires (Figure 6) (Tan et al., 2015). Dans ce manuscrit, la dernière version protéique du RA (Genbank, NCBI : P10275.3) est utilisée et toutes les données décrites à partir de la version antérieure (Genbank, NCBI : P10275.2) ont été actualisée pour correspondre à cette nouvelle séquence de référence.

Le RA se retrouve dans de nombreux tissus de l'organisme. Cependant, son expression est variable selon le stade de développement et le degré de différenciation cellulaire des tissus. Chez l'homme, les niveaux d'expression les plus élevés sont présents dans les organes sexuels tels que la prostate ou les testicules mais aussi dans le cœur, le muscle et le foie.

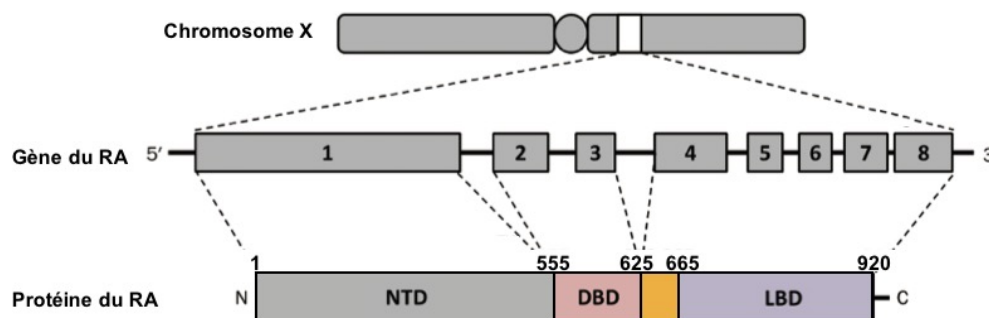


Figure 6 : Structure du récepteur des androgènes.

Le gène du RA est localisé sur le chromosome X. Il se compose de 8 exons codant une protéine de 920 acides aminés. (d'après Tan et al., 2015)

a. Domaine amino-terminal

Le NTD est la région la moins conservée au sein des récepteurs nucléaires. Codé par l'exon 1, il s'étend sur 555 acides aminés et représente ainsi plus de la moitié du RA. Contrairement aux autres domaines du RA, il s'agit d'un domaine intrinsèquement désordonné qui ne présente pas de structure définie. Cette plasticité pourrait lui permettre d'interagir avec des partenaires multiples aux structures tridimensionnelles variées tels que les co-activateurs de la famille p160 comme SRC-1 (*Steroid receptor co-activator 1*), le récepteur BRCA1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*), CBP (*cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein*) ou encore les facteurs généraux de la transcription TFIIF et TFIIFH (*Transcription factor II F and H*) (McEwan and Gustafsson, 1997; Tan et al., 2015).

Le NTD comporte plus précisément la fonction de transactivation AF-1 qui régule l'activation de la transcription. Elle repose sur deux unités d'activation transcriptionnelle (Tau) Tau-1 et Tau-5 impliquées dans le recrutement de partenaires protéiques différents comme TFIIF pour Tau-1 et SRC-1 pour Tau-5 (Callewaert et al., 2005 ; Claessens et al., 2008). Deux autres séquences semblent être importantes pour la fonction de la région amino-terminale. Il s'agit des motifs ²³FQNLF²⁷ et ⁴³⁵WHTLF⁴³⁹ qui permettent l'interaction entre le NTD et le CTD

du RA. Cette interaction est un prérequis à la transcription de gènes androgéno-dépendants. Elle permet de stabiliser la structure du dimère et de ralentir la dissociation du complexe avec son ligand (Figure 7) (Claessens et al., 2008; Wilson, 2011).



Figure 7 : Domaine amino-terminal du récepteur des androgènes.

Le NTD comporte la fonction d'activation AF-1 qui englobe les unités Tau-1 et Tau-5. Les motifs ²³FQNLF²⁷ et ⁴³⁵WHTLF⁴³⁹ et les régions polymorphiques poly-Q et poly-G sont également indiqués sur ce schéma. (d'après Claessens et al., 2008)

Deux régions hautement polymorphiques sont décrites au sein du NTD : les séquences poly-glutamine (poly-Q) et poly-glycine (poly-G) (Figure 7). Le nombre de répétitions contenues dans ces séquences influe sur les caractéristiques structurales du RA. Ainsi, une répétition poly-Q étendue, avec 45 codons CAG, entraîne la formation d'hélices α et diminue les structures de type feuillets β . A l'inverse, la déplétion de la région poly-Q décroît la formation d'hélices α et favorise celle des feuillets β (Davies et al., 2008). L'effet de ces répétitions polymorphiques sur l'activité transcriptionnelle du récepteur est un sujet de controverse. En effet, la plupart des études mettent en évidence une corrélation inverse entre le nombre de codons CAG et l'activité du RA (Belikov et al., 2015; Choong et al., 1996; Werner et al., 2006). Cependant, d'autres groupes de recherche ont démontré un effet positif des séquences poly-Q longues sur l'activité du RA dans des cellules musculaires (Sheppard et al., 2011). De ce fait, bien qu'un nombre faible de codons CAG ait été associé à un risque plus important de cancer de la prostate (Irvine et al., 2000; Weng et al., 2017), ce lien de cause à effet n'a pas toujours été démontré lors d'études épidémiologiques (Kumar et al., 2011). En revanche, une expansion du nombre de répétitions poly-Q serait à l'origine de maladies génétiques comme la maladie de Huntington ou l'atrophie musculaire spinale et bulbaire, aussi appelée syndrome de Kennedy et caractérisée par la formation de filaments amyloïdes (Bennett et al., 2010; Li and Al-Azzawi, 2009).

b. Domaine de liaison à l'ADN

Codé par les exons 2 et 3, le DBD confère au RA la capacité de reconnaître les éléments de réponse aux androgènes (ARE) situés au niveau des promoteurs ou régions « enhancers » de ses gènes cibles.

Le DBD s'organise en 2 doigts de zinc formés par 3 hélices α et une extension carboxy-terminale. Chaque doigt de zinc repose sur la présence de 4 résidus cystéine disposés en tétraèdre autour d'un ion zinc. L'hélice α amino-terminale du premier doigt de zinc permet la reconnaissance des ARE et l'interaction avec le sillon majeur de l'ADN. Cette fonction repose sur les acides aminés ⁵⁷⁸GSCKV⁵⁸² formant la boîte proximale, également appelée P-box. L'extension carboxy-terminale est également impliquée dans ce processus de reconnaissance. Au niveau du second doigt de zinc, la boîte distale ou D-box ⁵⁹⁷ASRND⁶⁰¹ constitue quant à elle l'interface de dimérisation du RA. Les acides aminés contenus dans la P-box et la D-box sont grandement conservés au sein des récepteurs nucléaires oxo-stéroïdiens tels que le RA, le récepteur des glucocorticoïdes, le récepteur de la progestérone et le récepteur des minéralocorticoïdes (Figure 8) (Bennett et al., 2010; Tan et al., 2015).

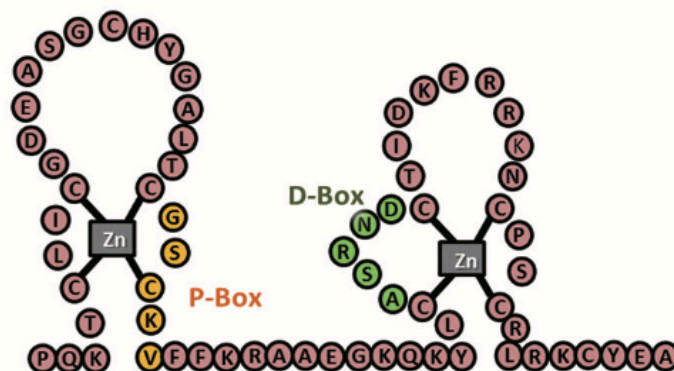


Figure 8 : Structure en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN.

Les doigts de zinc sont formés de quatre cystéines arrangées autour d'un ion zinc. Les P-box et D-box sont indiquées en jaune et en vert. (d'après Tan et al., 2015)

De manière générale, les ARE sont décrits comme des hexamères arrangés en palindromes inversés et séparés par 3 nucléotides avec la séquence consensus suivante : 5'-AGAACA_(n3)TGTTCT-3'. Ces ARE dits « classiques » sont également reconnus par d'autres récepteurs nucléaires stéroïdiens comme le récepteur des glucocorticoïdes, le récepteur des minéralocorticoïdes ou encore le récepteur de la progestérone. Il existe cependant des gènes

spécifiquement régulés par le RA. Pour ceux-ci, des ARE sélectifs ont été décrits sous formes de répétitions directes de séquences telles que 5'-AGAACA-3'. Étonnamment, qu'il s'agisse des ARE classiques ou sélectifs, les études cristallographiques ont mis en évidence que le RA s'organisait sous forme d'un dimère composé de deux monomères en configuration « tête-bêche » (Figure 9) (Shaffer et al., 2004; Tan et al., 2015).

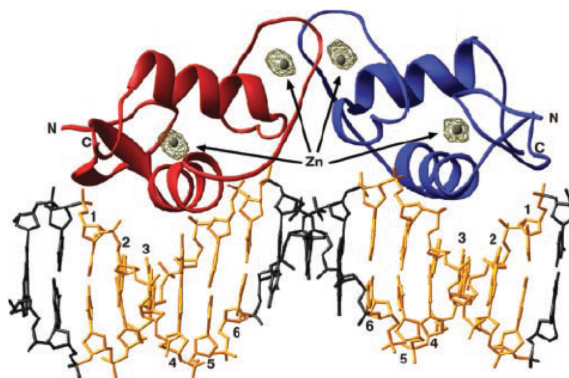


Figure 9 : Architecture des domaines de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes liés à un élément de réponse en répétition directe. *PDB 1R4I*

Les DBD (en rouge et en bleu) reconnaissent les nucléotides de l'élément de réponse (en jaune) et s'arrangent en configuration « tête-bêche ». (d'après Shaffer et al., 2004)

c. Région charnière

La région charnière se situe entre le DBD et le LBD. Pouvant être perçue comme un pont flexible entre ces 2 domaines, elle joue un rôle majeur dans les changements conformationnels qui interviennent lors de la liaison du ligand au RA.

De plus, elle abrite une séquence de localisation nucléaire (NLS) bipartite responsable de la translocation nucléaire du récepteur. Composée de 2 groupes d'acides aminés basiques séparés par 10 nucléotides **RKCYEAGMTLGARKLKK**, cette séquence s'étend plus précisément de l'expansion carboxy-terminale du DBD à la partie amino-terminale de la région charnière. Le motif RKLKK permet l'interaction du RA avec l'importine- α , protéine responsable du passage du récepteur à travers les pores nucléaires (Figure 10) (Tan et al., 2015). Une séquence riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine, appelée séquence PEST est également contenue dans la région charnière. Elle pourrait fonctionner, lorsqu'elle est démasquée, comme un signal de dégradation du récepteur par la voie du protéasome (Claessens et al., 2008).

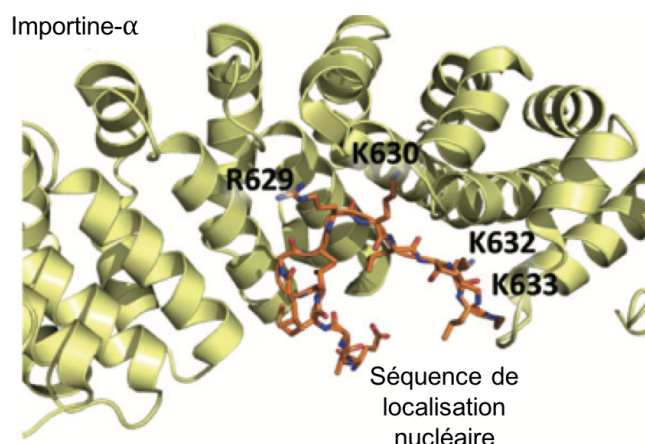


Figure 10 : *Structure cristallographique du peptide de localisation nucléaire complexé à l'importine- α . PDB 3BTR*

Les résidus de la séquence majeure de localisation nucléaire RKLKKL permettent l'interaction avec l'importine- α , responsable de la translocation nucléaire du récepteur. (d'après Tan et al., 2015) Séquence protéique de référence (Genbank, NCBI) : P10275.2.

En plus de la régulation du trafic du RA entre les compartiments cytoplasmique et nucléaire, le motif RKLKK de la région charnière est également impliqué dans la reconnaissance de l'ADN, l'interaction entre les domaines NTD et CTD du récepteur et le recrutement de co-activateurs (Tan et al., 2015). Par exemple, SNURF (*Small nuclear RING finger protein*) interagit avec le DBD mais aussi avec la région charnière du RA. Ce facteur favorise sa translocation nucléaire. La protéine SGT- α (*Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein α*) permet quant à elle de maintenir le récepteur dans le cytoplasme en formant un complexe avec les protéines chaperonnes HSP-70 et HSP-90 (*Heat shock protein 70 and 90*) et de réguler son affinité pour les androgènes (Clinckemalie et al., 2012).

d. Domaine de liaison au ligand

La liaison d'un ligand tel que la testostérone ou la DHT au niveau du LBD constitue le premier mécanisme de contrôle de la voie de signalisation du RA. Codé par les exons 4 à 8, le LBD adopte une structure en forme de sandwich hélicoïdal antiparallèle formé par 11 hélices α et 2 feuillets β organisés autour d'une cavité centrale, la poche de liaison du ligand (LBP).

Contrairement à la majorité des récepteurs nucléaires, le RA possède 11 hélices α . En effet, les autres récepteurs nucléaires en possèdent 12. La première couche de ce sandwich est composée des hélices H1 et H3. L'hélice H2, absente, est remplacée par une longue région flexible. La couche médiane regroupe les hélices H4, H5, H8 et H9 et le premier feuillet β . Enfin, les hélices H10 et H11 constituent la dernière couche de la structure. La LBP est formée par les hélices H3, H5 et H11. La liaison du ligand entraîne le repliement de l'hélice H12 qui joue alors le rôle d'un couvercle permettant de refermer la LBP (Figure 11) (Matias et al., 2000; Tan et al., 2015).

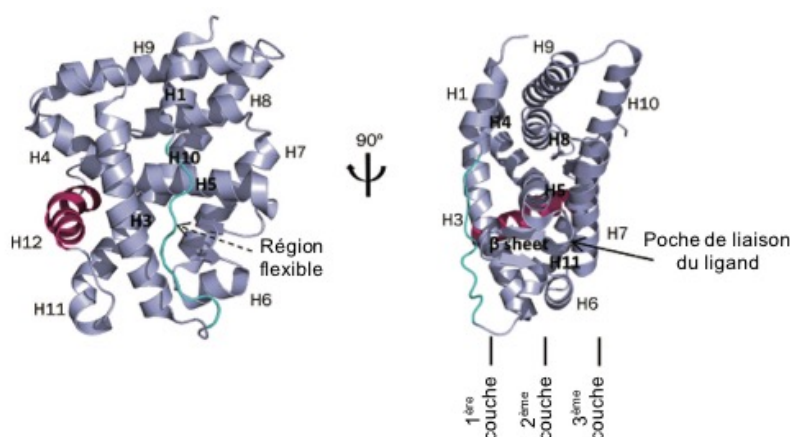


Figure 11 : Structure cristallographique du domaine de liaison au ligand. PDB 1E3G

Les 11 hélices α (en violet), les 2 feuillets β (en rose) et la région flexible (en bleu) forment un sandwich hélicoïdal à trois couches. (d'après Tan et al., 2015)

Qu'il soit en présence de testostérone, de DHT ou d'un androgène synthétique, le R1881, le LBD adopte une structure similaire, bien que le nombre de points de contact établis entre les deux partenaires diffère, avec respectivement 15, 16 et 18 résidus hydrophobes de la LBP engagés dans des liaisons de van der Waals avec le squelette stéroïde du ligand. De plus, 4 liaisons hydrogènes sont également formées entre les acides aminés polaires N706, Q712, R753 et T878 du RA et son ligand (Figure 12) (Tan et al., 2015). Des mutations impliquant ces résidus clés ont été mises en évidence chez des patients atteints d'un cancer de la prostate et présentant un phénomène de résistance au traitement. La substitution T878A est par exemple responsable de l'activation du RA en présence d'un anti-androgène appelé flutamide (Dehm and Tindall, 2007).

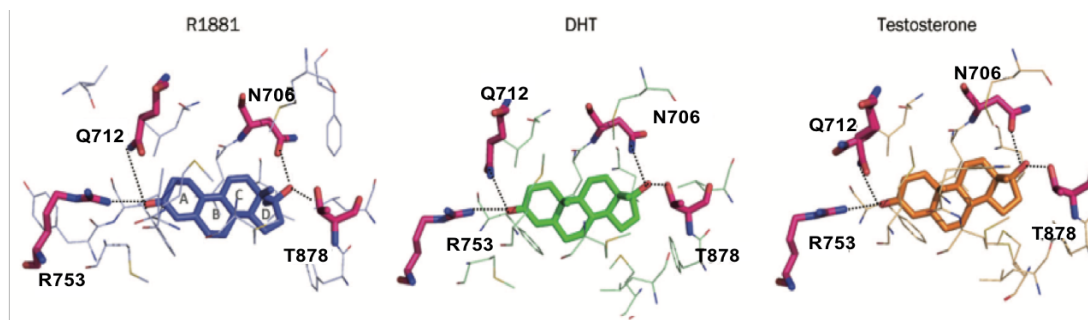


Figure 12 : Représentation du domaine de liaison au ligand en présence de R1881, de DHT ou de testostérone.

Les résidus clés de la LBP N706, Q712, R753 et T878 sont représentés en bâtonnets et les liaisons hydrogènes en pointillés. (d'après Tan et al., 2015) Séquence protéique de référence (Genbank, NCBI) : P10275.3.

Le changement de conformation induit par la liaison du ligand permet la mise en place de la seconde fonction de transactivation AF-2, principalement composée de l'hélice H12. Elle est impliquée dans le recrutement de co-régulateurs nécessaires aux fonctions du RA. De manière semblable à tous les récepteurs nucléaires, le RA peut utiliser cette plateforme pour interagir avec des protéines contenant un motif riche en leucine de type **LxxLL** comme la famille de co-activateurs p160 par exemple. Cependant, il a été démontré que l'affinité du RA est plus grande pour les motifs riches en phénylalanine **FxxLF**, favorisant ainsi l'interaction avec la séquence ²³FQNLF²⁷ présent dans le NTD du récepteur, de façon intra ou intermoléculaire (Hur et al., 2004). Cette interaction inhibe la liaison d'autres cofacteurs au niveau de la fonction AF-2 mais permet le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (*Switching defective/sucrose non-fermenting complex*), facilitant de cette manière la liaison du RA au niveau des ARE. Une fois le récepteur enchâssé sur l'ADN, l'interaction entre le CTD et le NTD est perdue, ce qui permet dès lors le recrutement de co-régulateurs par la fonction AF-2 (Figure 13) (Li et al., 2006; van Royen et al., 2007).

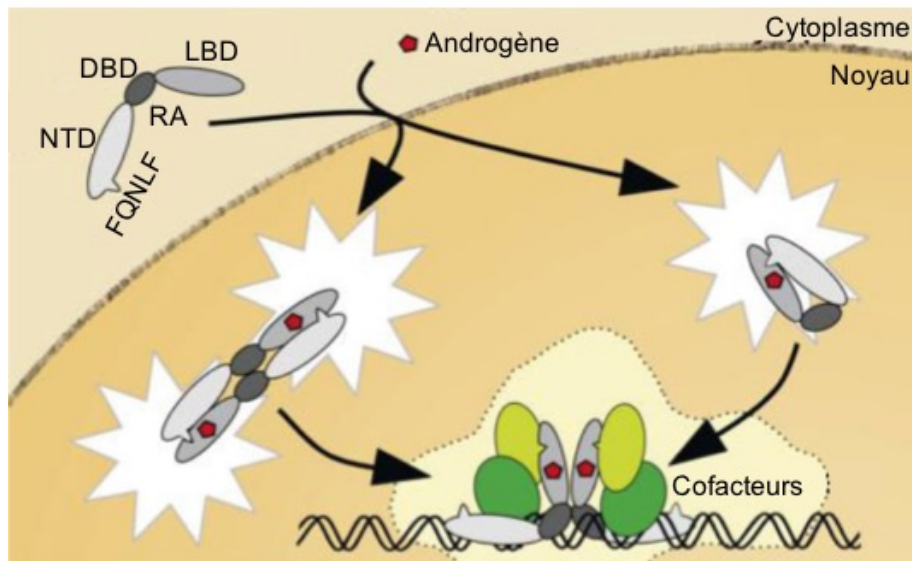


Figure 13: Influence des interactions entre les domaines amino-terminal et carboxy-terminal sur le mode d'action du récepteur des androgènes.

L'interaction du NTD et du LBD permet le recrutement de complexes de remodelage de la chromatine et la reconnaissance des ARE. Après liaison à l'ADN, cette interaction est perdue et le recrutement de cofacteurs peut avoir lieu. (d'après van Royen et al., 2007)

Une séquence d'export nucléaire s'étend entre les acides aminés 743 et 818. Cette séquence est dominante sur la NLS en absence de ligand, permettant ainsi la régulation du trafic du RA entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique (Saporita et al., 2003).

3) Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles du RA régulent son activité en affectant sa localisation cellulaire, sa stabilité protéique, sa structure ou encore son interaction avec d'autres partenaires. Elles se traduisent par la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation ou encore la sumoylation de certains résidus du récepteur (Coffey and Robson, 2012; van der Steen et al., 2013).

a. Phosphorylation

Le RA est la cible de nombreuses phosphorylations au niveau de résidus sérine, thréonine ou tyrosine. La plupart interviennent au niveau du NTD, plus particulièrement des régions Tau-1 et Tau-5. En fonction du résidu considéré, la phosphorylation a lieu de manière androgéno-dépendante ou en absence de stimulation androgénique. De plus, la sérine 96 semble être constitutivement phosphorylée (Figure 14) (Gioeli and Paschal, 2012; van der Steen et al., 2013).

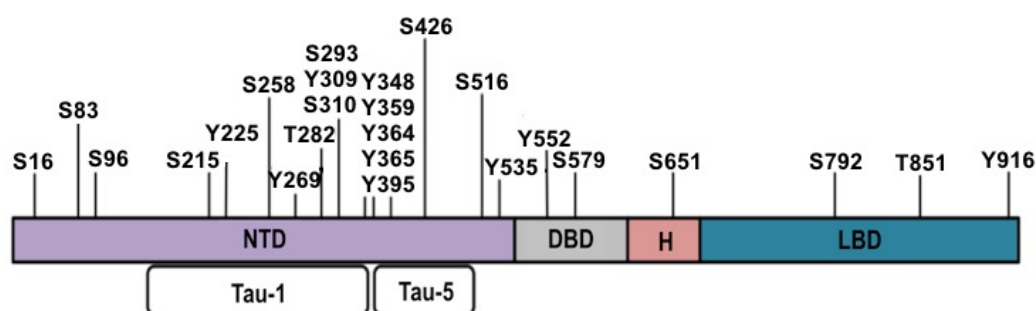


Figure 14 : Sites de phosphorylation du récepteur des androgènes.

De nombreuses phosphorylations interviennent au niveau des résidus sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) pour réguler la stabilité, la localisation et l'activité transcriptionnelle du RA. (d'après van der Steen et al., 2013) Séquence protéique de référence (Genbank, NCBI) : P10275.3.

En ce qui concerne les résidus sérine et thréonine, les acteurs de la phosphorylation du RA sont multiples et regroupent notamment des kinases cycline-dépendantes (CDK) telles que CDK1, CDK7, CDK9 et CDK11, la kinase AKT (*AKR thymoma oncogene*), Aurora-A, des MAP kinases (*Mitogen-activated protein kinase*) ou encore les protéines kinases (PK) PK-A et PK-C. En revanche, seuls les facteurs Src (*Sarcoma tyrosine kinase*) et ACK1 (*Activated CDC42 kinase 1*) ont à ce jour été mis en évidence pour phosphoryler les résidus tyrosine du RA, notamment Y269, Y365 et Y535. La phosphorylation du RA est un phénomène qui peut être réversible grâce à l'action des protéines phosphatases PP2A et PP1 (Gioeli and Paschal, 2012).

b. Acétylation

L'acétylation du RA intervient au niveau de la région charnière, plus précisément des résidus lysine 631, 633 et 634 contenus dans le motif RKLKK de la NLS. Cette modification post-traductionnelle repose sur l'activité acétyltransférase des facteurs p300, P/CAF (*p300/CBP-associated factor*) et TIP60 (*TAT interacting protein, 60KDa*) mais aussi de la protéine N-acétyltransférase arrest-defect 1. Ce processus est réversible grâce à l'action de l'histone déacétylase 1 (HDAC1) et de la Sirtuine 1 (Coffey and Robson, 2012).

Ces modifications post-traductionnelles sont mises en place après stimulation androgénique et permettent de favoriser l'activité transcriptionnelle du RA. En effet, elles augmentent son affinité pour ses co-activateurs comme p300 et la diminuent pour ses co-répresseurs tels que NCoR (*Nuclear receptor corepressor 1*) ou SMAD3 (*SMAD family member 3*). De plus, l'acétylation du RA joue aussi un rôle dans la liaison à l'ADN (Coffey and Robson, 2012; Fu et al., 2003).

c. Méthylation

La méthylation du RA est aujourd'hui peu décrite. Elle intervient sur les résidus lysine 631 et 633 de la région charnière par l'action de SET9 (*Su(var)3-9, enhancer-of-zeste and trithorax (SET)-domain protein 9*). Comme pour toutes les modifications post-traductionnelles, il s'agit d'un processus dynamique. Ainsi, la lysine (K) déméthylase KDM4 semble être à l'origine de la déméthylation de ces deux résidus (Coffey and Robson, 2012).

A l'état inactif, le RA serait méthylé. Suite à une stimulation androgénique, il serait déméthylé par l'action de l'enzyme KDM4. La déméthylation des résidus lysine 631 et 633 leur permettrait ensuite d'être acétylés afin de favoriser l'activité du RA (van der Steen et al., 2013).

d. Ubiquitynylation

L'ubiquitynylation du RA se traduit par la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine au niveau des résidus lysine 846 et 848 situés dans le LBD. Cette modification post-traductionnelle se déroule en trois étapes. Tout d'abord, l'ubiquitine est activée par une enzyme de type E1, appelée enzyme d'activation, puis elle est conjuguée au niveau d'un résidu cystéine de l'enzyme de conjugaison E2 avant d'être transférée par une enzyme ubiquitine ligase E3 sur un résidu lysine de la protéine cible. L'ubiquitynylation permet de réguler la dégradation des protéines par le protéasome mais peut également servir de signal pour modifier l'activité d'une voie de signalisation donnée (Figure 15) (Coffey and Robson, 2012; Dikic et al., 2009).

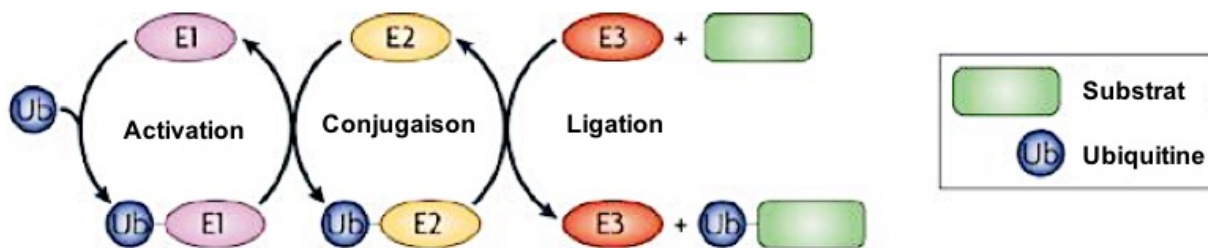


Figure 15 : Mécanisme d'ubiquitynylation d'un substrat.

Les enzymes E1, E2 et E3 permettent respectivement l'activation de l'ubiquitine, sa conjugaison puis sa ligation sur la protéine cible. Le substrat peut être mono ou poly-ubiquitynylé. (d'après Dikic et al., 2009)

L'enzyme E3 MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*) est la première à avoir été mise en évidence dans l'ubiquitynylation du RA. Depuis, CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) et RNF6 (*Ring finger protein 6*) ont également été découvertes. Ainsi, MDM2 et CHIP sont impliquées dans la polyubiquitynylation du RA, permettant d'adresser le récepteur au protéasome 26S pour sa dégradation. En revanche, RNF6 entraîne la monoubiquitynylation de la protéine, ce qui favorise son activité transcriptionnelle. En effet, l'ubiquitynylation par RNF6 fonctionne comme une interface de liaison, permettant le recrutement de co-activateurs tels que ARA54 (*Androgen receptor-associated protein 54*) (Gioeli and Paschal, 2012).

Comme les autres modifications post-traductionnelles, ce processus est réversible grâce à l'action d'enzymes déubiquitinases telles que USP-26 (*ubiquitin specific peptidase 26*) par exemple (Gioeli and Paschal, 2012).

e. Sumoylation

La sumoylation repose sur la liaison covalente d'une certaine d'acides aminés d'une molécule SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) à un résidu lysine de la protéine cible. Comme l'ubiquitinylation, c'est un processus en trois étapes qui fait intervenir des enzymes E1, E2 et E3 (Hendriks and Vertegaal, 2016).

Seule une faible proportion de RA est sumoylée dans un contexte cellulaire physiologique. Cette modification post-traductionnelle cible les résidus lysine 388 et 521. A l'heure actuelle, peu d'enzymes sont décrites dans la réalisation de ce procédé cellulaire. Il est possible de citer l'enzyme E2 UBC9 (*ubiquitin conjugating enzyme E2*) ou encore les enzymes E3 PIAS α et PIAS1 (*Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription (STAT) α and 1*). Il s'agit également d'une modification réversible grâce à l'action de protéases sentrines / SUMO-spécifiques (SENPs) comme SENP1 et SENP2 (Figure 16) (Gioeli and Paschal, 2012; Hendriks and Vertegaal, 2016).

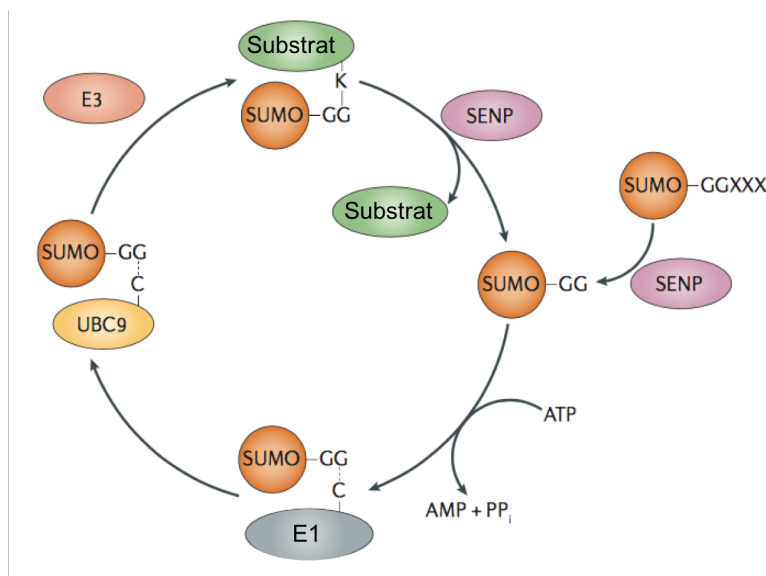


Figure 16 : Mécanisme de sumoylation d'un substrat.

Les enzymes E1, E2 comme UBC9 et E3 permettent la liaison covalente de molécules SUMO sur un substrat. Ce processus est réversible grâce à l'action des SENPs. (d'après Hendriks and Vertegaal, 2016)

La sumoylation du RA permet de moduler son activité transcriptionnelle, notamment en influant sur le recrutement de co-régulateurs. Ainsi, DAXX (*Death-domain associated protein*), un co-represseur connu du RA a été mis en évidence pour être recruté de manière sumo-dépendante, inhibant ainsi l'activité du récepteur (Coffey and Robson, 2012).

Le RA est la cible d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Elles régulent la stabilité de la protéine, sa dégradation, sa localisation cellulaire ou encore l'interaction avec de nombreux co-régulateurs, contrôlant ainsi son activité. De par ses actions génomiques et non génomiques, le RA joue un rôle majeur dans le cycle cellulaire, la survie ou encore la différenciation des cellules dans lesquelles il est exprimé, notamment les cellules prostatiques.

4) Voies de signalisation du récepteur des androgènes

En conditions physiologiques, l'activation du RA est androgéno-dépendante. Il fonctionne comme un facteur de transcription et régule ainsi l'expression de nombreux gènes cibles. Cependant, il peut également être impliqué dans des fonctions non-génomiques par l'induction d'autres voies de signalisation cellulaire.

a. Voie génomique

La testostérone représente la forme majoritaire d'androgènes circulants. Elle traverse librement la membrane plasmique des cellules prostatiques avant d'être convertie en DHT par la 5- α -réductase. En absence d'androgènes, le RA est séquestré dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes incluant des protéines de choc thermique comme HSP-40, HSP-56, HSP-70 et HSP-90, mais aussi p23, FKBP-4 (*FK506 binding protein 4*) ou encore SGT- α . Ce complexe le protège de la dégradation et le maintient dans une conformation favorable à la liaison du ligand (Heemers and Tindall, 2007; Schreyer et al., 2017).

A l'inverse, en présence de DHT, sa liaison de haute affinité au RA entraîne un changement conformationnel permettant la mise en place de la fonction AF-2 et par conséquent l'interaction des domaines NTD et LBD. Il en résulte la dissociation du complexe RA-protéines chaperonnes et le démasquage de la NLS. Le RA recrute alors des partenaires

tels que ARA70 (*Androgen receptor-associated protein 70*), la Filamine-A et l'importine- α qui interagissent directement au niveau de la NLS. Ces co-régulateurs permettent l'adressage nucléaire du récepteur et sa dimérisation. Une fois dans le noyau, le RA orchestre la régulation de l'expression de gènes cibles (Basu and Tindall, 2010; Bennett et al., 2010). Pour cela, il interagit avec l'ADN au niveau des ARE et recrute des co-répresseurs ou au contraire des co-activateurs et des complexes de remodelage de la chromatine qui régulent son accessibilité à l'ARN polymérase II et donc sa transcription (Figure 17) (Shang et al., 2002; Tan et al., 2015).

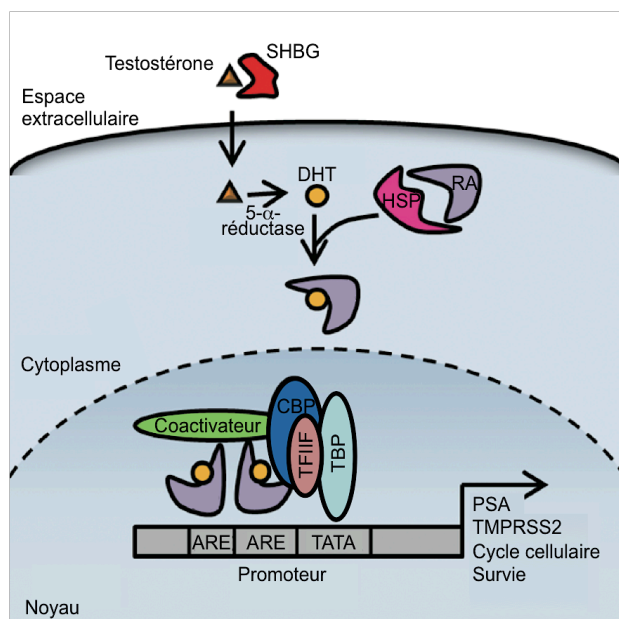


Figure 17 : Mode d'action génomique du récepteur des androgènes.

Après activation par son ligand, le RA se dissocie des protéines chaperonnes et est transloqué dans le noyau. Il reconnaît alors les ARE situés dans les régions régulatrices des gènes cibles et recrute des co-régulateurs pour contrôler l'expression de gènes cibles. (d'après Tan et al., 2015)

Au sein du noyau, la chromatine est formée par l'enroulement de l'ADN autour d'octamères d'histones avec un pas de 147 paires de bases. Les complexes de remodelage de la chromatine permettent de réguler sa compaction par le biais de modifications post-traductionnelles des histones telles que l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la citrullination, l'ADP-ribosylation, l'isomérisation ou encore la phosphorylation. L'ensemble de ces transformations est regroupé au sein du « code histone ». L'acétylation, la méthylation et l'ubiquitinylation sont les principales marques qui permettent de réguler l'accessibilité de l'ADN à l'ARN polymérase II et par conséquent la transcription (Figure 18) (Rothbart and Strahl, 2014; Zhang et al., 2015).

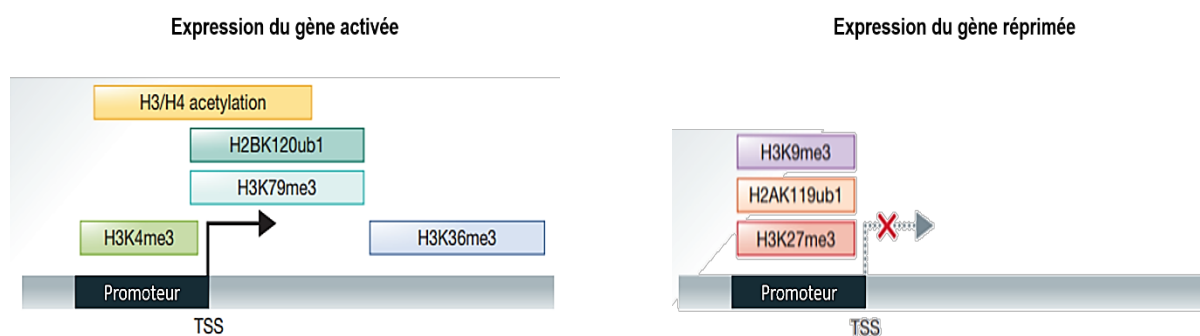


Figure 18 : Régulation de la transcription par les marques histones.

L'acétylation des histones H3 et H4, la triméthylation des résidus K4, K36 et K79 ainsi que l'ubiquitinylation du résidu K120 de l'histone H3 sont des marques activatrices de la transcription. A l'inverse, la triméthylation des résidus K9 et K27 de l'histone H3 et l'ubiquitinylation K119 de l'histone H2 sont en faveur de la répression de la transcription. (d'après Zhang et al., 2015)

- **Modulation de la reconnaissance de l'ADN**

Certains facteurs de transcription ont été décrits comme des collaborateurs du RA. Ils modifient également les marques post-traductionnelles des histones, permettant ainsi de faciliter la reconnaissance des ARE par le RA. L'analyse du recrutement du RA à l'ADN a permis de mettre en évidence un chevauchement entre les ARE et les sites de liaison pour les facteurs GATA2 (*GATA binding protein 2*) et FOXA1 (*Forkhead box protein A1*). Le facteur FOXA1 se lie à l'ADN au niveau de régions riches en histones H3 méthylés sur la lysine 4 (H3K4me2 et H3K4me3), entraîne un switch épigénétique et favorise ainsi le recrutement du RA. Le même mécanisme a été mis en évidence pour le facteur GATA2 qui reconnaît aussi les régions condensées de la chromatine (Lupien et al., 2008; Obinata et al., 2017).

- **Activation de la transcription**

L'expression des gènes cibles du RA repose sur le recrutement de partenaires et la formation d'un complexe transcriptionnel qui dépend du contexte cellulaire et du gène considéré. Schématiquement, une série de premiers co-activateurs est recrutée de manière directe avant qu'interviennent des seconds co-activateurs et des facteurs de la machinerie transcriptionnelle. Les premiers co-activateurs intègrent des protéines appartenant à la famille p160 telles que SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (*Steroid receptor co-activator 1, 2 or 3*) mais aussi SWI/SNF et MED1 (*Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1*). Ils permettent de stabiliser l'interaction du RA avec l'ADN et de recruter d'autres régulateurs de la transcription.

Parmi les seconds co-activateurs, p300/CBP (*p300/cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein*), P/CAF et CARM1 (*Coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) ont été décrits pour interagir avec les membres de la famille p160 et engendrer des modifications des histones permettant l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle. Le facteur TFIID se lie alors au niveau de la boîte TATA de l'ADN grâce à sa sous-unité TBP (*TATA binding protein*). Le facteur TFIIF permet l'interaction spécifique de l'ARN polymérase II puis les facteurs TFIIE et TFIIH interagissent avec l'ARN polymérase II et favorisent l'initiation de la transcription en séparant les deux brins d'ADN (Heemers and Tindall, 2007; Kim and Coetzee, 2004).

Ce complexe transcriptionnel est particulièrement bien décrit pour le gène de l'antigène spécifique prostatique (PSA). Ce gène comporte 3 ARE dont 2 sont localisés au niveau du promoteur proximal, 170 et 400 paires de bases avant le site d'initiation de la transcription, et le dernier au niveau de la région « enhancer » à 4,2 kilobases du site d'initiation de la transcription. En réponse à la liaison du ligand, le RA reconnaît ces ARE et recrute un complexe composé des membres SRC-1, SRC-2 ou SRC-3 de la famille p160, de SWI/SNF, de MED1, de p300/CBP et de CARM1 (Kim and Coetzee, 2004). D'un point de vue spatial, il est nécessaire qu'une communication s'établisse entre le promoteur et la région « enhancer ». Il semblerait qu'elle repose à la fois sur la formation d'une boucle d'ADN permettant que les protéines localisées au niveau de la région « enhancer » interagissent directement avec celles du promoteur mais aussi sur la diffusion du signal reçu au niveau de la région « enhancer » vers le promoteur le long de l'ADN. La formation de ce complexe à l'architecture définie permet ainsi l'initiation de la transcription du gène (Figure 19) (Wang et al., 2005).

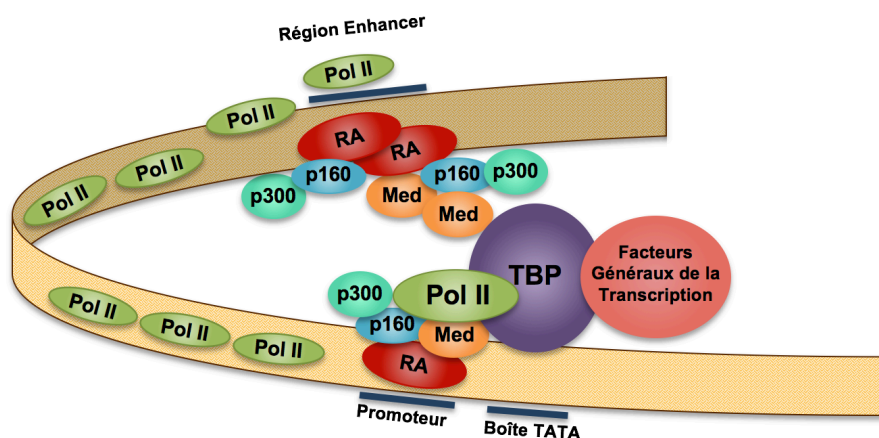


Figure 19 : Activation de la transcription du PSA.

Le recrutement du RA est plus important au niveau des ARE de la région « enhancer » que du promoteur. La communication entre ces 2 régions s'effectue par diffusion le long de l'ADN mais aussi par la formation d'une boucle permettant la collaboration entre les co-régulateurs des différents ARE. (d'après Wang et al., 2005)

transcription STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*). Ainsi, après activation par la DHT, le RA est capable d'interagir avec STAT3 et d'augmenter ses fonctions transactivatrices, permettant alors l'expression de gènes cibles de l'Interleukine-6 (Matsuda et al., 2001).

- **Répression de la transcription**

Si l'action répressive du RA est moins bien documentée, il est toutefois admis qu'elle peut s'exercer sur un panel de gènes impliqués dans différents processus cellulaires comme la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'invasion ou encore la formation de métastases (Grosse et al., 2012).

Le RA peut exercer ses fonctions répressives par la liaison directe à l'ADN et la formation d'un complexe répressif. Dans ce cas, il reconnaît et lie les ARE situés dans les régions régulatrices des gènes cibles et recrute des co-répresseurs et des histones déacétylases. La formation d'une chromatine plus condensée inhibe la transcription. Ce mécanisme semble être à l'origine de la répression de la transcription du gène de la *Maspine*, de la *Caspase-2* ou encore des *UDP-Glucuronosyltransférase B15* et *B17*. Néanmoins, si la répression de ces gènes coïncide avec le recrutement du RA activé au niveau des ARE, les complexes répresseurs mis en jeu n'ont pas encore été élucidés (Grosse et al., 2012). Dans un modèle de cellules prostatiques cancéreuses, le rôle répresseur du facteur NANOG a été mis en évidence sur les complexes RA-FOXA1, réprimant ainsi l'expression de gènes cibles du RA comme *NKX3-1* (*NK3 homeobox 1*) ou *TMPRSS2* (*Transmembrane protease, serine 2*) (Jeter et al., 2016).

Le RA peut aussi inhiber des protéines aux fonctions transactivatrices. Ce processus entraîne une diminution du recrutement de ces facteurs de transcription au niveau de l'ADN ou interfère avec leurs fonctions d'activation de la transcription, aboutissant ainsi à la transrépression des gènes d'intérêt. Le facteur de transcription SP1 (*Specificity protein 1*) interagit ainsi avec le RA quand celui-ci est transloqué dans le noyau via le domaine DBD du récepteur. Cette interaction inhibe la liaison de SP1 à l'ADN et par conséquent l'expression de gènes comme *c-Met* ou encore *LHβ*, codant la sous-unité β de l'hormone lutéinisante. Dans ce cas, les gènes cibles contiennent des séquences de liaison de SP1 et le RA n'est pas directement au contact de l'ADN (Verras et al., 2007). Un autre mécanisme d'interférence est également décrit pour la régulation de l'expression de *LHβ*. Dans celui-ci, le RA lie le facteur de transcription SF-1 (*Splicing factor 1*), entraînant ainsi la dissociation du complexe

SF-1/PITX1 (*Pituitary homeobox 1*). La machinerie transcriptionnelle ne peut plus être recrutée, ce qui aboutit à la répression du gène. Lors d'un stimulus hormonal, l'expression du facteur EGR-1 (*Early growth response protein 1*) est induite. EGR-1 interfère alors avec le complexe SF-1/RA et entraîne la rupture de l'interaction protéique. SF-1 est ainsi capable d'interagir à nouveau avec PITX1, ce qui permet de rétablir l'expression du gène *LHβ* (Jorgensen and Nilson, 2001). La répression androgéno-dépendante du gène du *TGFβ* (*Transforming growth factor β*) s'effectue également par l'interaction nucléaire du RA et de SMAD3, empêchant ainsi ce dernier de reconnaître ses éléments de réponse au niveau du promoteur du gène *TGFβ* (Chipuk et al., 2002).

La répression de facteurs de transcription ou encore la compétition pour des co-activateurs peuvent également expliquer l'action répressive du RA. Ce dernier phénomène intervient pour le co-activateur CBP, empêchant son recrutement par la sous-unité p65 de NF-κB (*Nuclear factor kappa B*) et donc l'expression des gènes cibles de p65 (Grosse et al., 2012).

b. Voie non-génomique

L'action non-génomique du RA est une signalisation rapide qui intervient dans le cytoplasme, en l'espace de quelques secondes à quelques minutes après stimulation par les androgènes. Ainsi, après liaison du ligand, le RA peut activer la tyrosine kinase Src qui, à son tour, active les kinases MAPK et MEK (*MAPK/Extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase*), le tout résultant en une augmentation de la phosphorylation des facteurs ERK-1/2 et l'activation des facteurs de transcription CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*) et ELK-1 (*ETS domain-containing protein*) (Figure 20) (Grosse et al., 2012; Leung and Sadar, 2017).

Le RA peut également moduler l'activation de la voie phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT. En effet, après stimulation androgénique, il est capable d'activer la kinase PI3K directement ou par l'intermédiaire de Src. PI3K peut alors phosphoryler AKT, menant ainsi à l'activation du facteur mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) dans un modèle de cellules androgéno-dépendantes (Figure 20) (Bennett et al., 2010; Leung and Sadar, 2017; Zarif and Miranti, 2016). En revanche, lorsqu'il est ré-exprimé dans des cellules androgéno-indépendantes, le RA peut interagir avec le récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR), entraînant la diminution de son autophosphorylation et par conséquent l'inhibition de la voie PI3K/AKT (Grosse et al., 2012). La régulation de cette voie de signalisation par l'action non-génomique du RA semble donc être délicate et pourrait dépendre du contexte cellulaire.

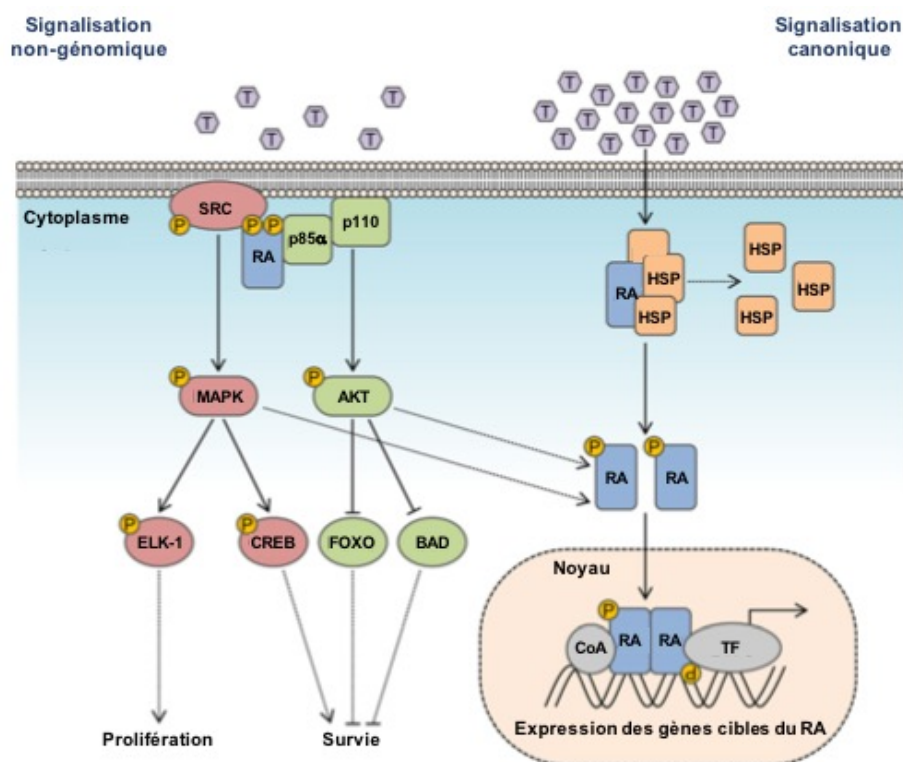


Figure 20 : Voies de signalisation croisées du récepteur des androgènes.

L'activation des voies des MAP kinases et de PI3K-AKT par le RA permet de réguler la prolifération et la survie cellulaire. Les MAP kinases et AKT peuvent également phosphoryler le RA, favorisant ainsi son activité transcriptionnelle. (d'après Leung and Sadar, 2017)

Le RA est aussi capable de moduler la localisation nucléaire de facteurs de transcription. Ainsi, il a été décrit que suite à son activation, le RA pouvait inhiber la translocation nucléaire du facteur p65. Le réarrangement du cytosquelette est l'un des mécanismes avancé pour expliquer cette action répressive du RA (Nelius et al., 2007; Papadopoulou et al., 2008).

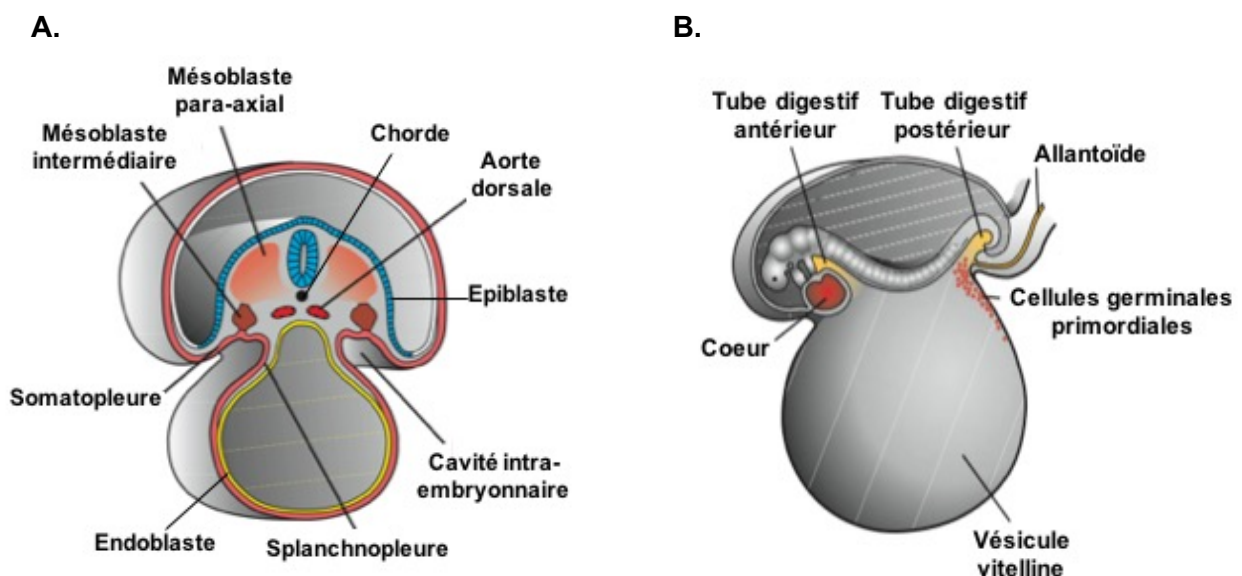
De nombreux récepteurs membranaires peuvent également activer le RA en absence d'androgènes. Pour ce faire, les récepteurs à l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), au KGF (*Keratinocyte growth factor*) et à l'EGF (*Epidermal growth factor*) mais aussi d'autres récepteurs tyrosine-kinases comme HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) utilisent les voies de signalisation des MAP kinases et de AKT. De plus, les récepteurs couplés aux protéines G sont aussi capables de phosphoryler le RA par l'intermédiaire de MEK1/2 et ERK1/2 (*Extracellular regulated kinase 1/2*) (Bennett et al., 2010).

III. La glande prostatique

La prostate est une glande accessoire faisant partie de l'appareil génital masculin. Le RA joue un rôle majeur dans son développement et son homéostasie, contrôlant notamment la croissance, la survie ou encore la différenciation des cellules prostatiques.

1) Développement embryonnaire de la prostate

A la troisième semaine de développement, l'embryon se compose de 3 feuillets : l'épiblaste, l'endoblaste et le mésoblaste. Ce dernier est formé de 3 bandes longitudinales réparties de chaque côté de la corde dorsale parmi lesquelles le mésoblaste intermédiaire donne naissance au cordon néphrogène (Figure 21 A.). C'est à partir de cette structure que se développe l'appareil génital. A la fin de la troisième semaine, les cellules germinales primordiales, d'origine épiblastique, apparaissent dans la vésicule vitelline (Figure 21 B.). Dès la sixième semaine, elles migrent activement pour rejoindre les crêtes génitales situées dans la paroi postérieure du tronc, à hauteur du dixième segment thoracique. Les cellules du mésenchyme sous-jacent et de l'épithélium coelomique s'assemblent alors en cordons sexuels primitifs que les cellules germinales envahissent pour former la gonade indifférenciée (Figure 21 C.) (Larsen, 2011; Sadler, 2010).



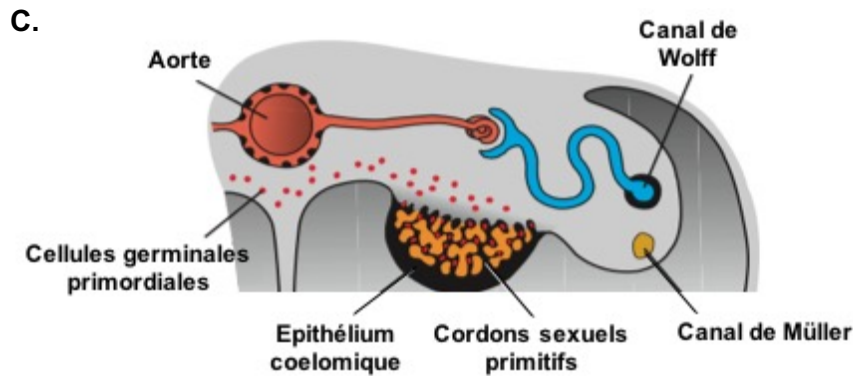


Figure 21 : Développement embryonnaire de la gonade indifférenciée.

A. Coupe schématique représentant l'organisation 3 feuillets : l'épiblaste (en bleu), le mésoblaste (en rouge) et l'endoblaste (en jaune). **B.** Les cellules germinales primordiales, une population issue de l'épiblaste, apparaît au niveau de la vésicule vitelline. **C.** Les cellules germinales primordiales migrent vers les crêtes génitales où elles colonisent ensuite les cordons sexuels primitifs pour former la gonade indifférenciée. (d'après Sadler, 2000)

La différenciation sexuelle des sujets mâles commence à la fin de la sixième semaine de développement embryonnaire. Elle repose sur l'expression de la protéine SRY (*Sex determining region Y*), dont le gène se situe sur le chromosome Y, dans les cellules des cordons sexuels. Cette protéine est un facteur de transcription qui permet d'initier l'expression en cascade des effecteurs de la différenciation sexuelle masculine tels que le facteur de stéroïdogénèse 1 (SF1). SF1 agit avec SOX9 (*Sex determining region Y (SRY) -box 9*) pour induire le programme de différenciation des cellules de Leydig et de Sertoli. Les cellules de Sertoli produisent l'hormone anti-mullérienne qui provoque l'involution des canaux de Muller primitifs tandis que les cellules de Leydig produisent de la testostérone convertie en DHT au sein des cellules cibles par l'action de la 5- α -reductase. Ces androgènes entraînent l'activation du RA qui exerce alors son action pour induire le programme de différenciation des organes génitaux internes et externes (Sadler, 2000).

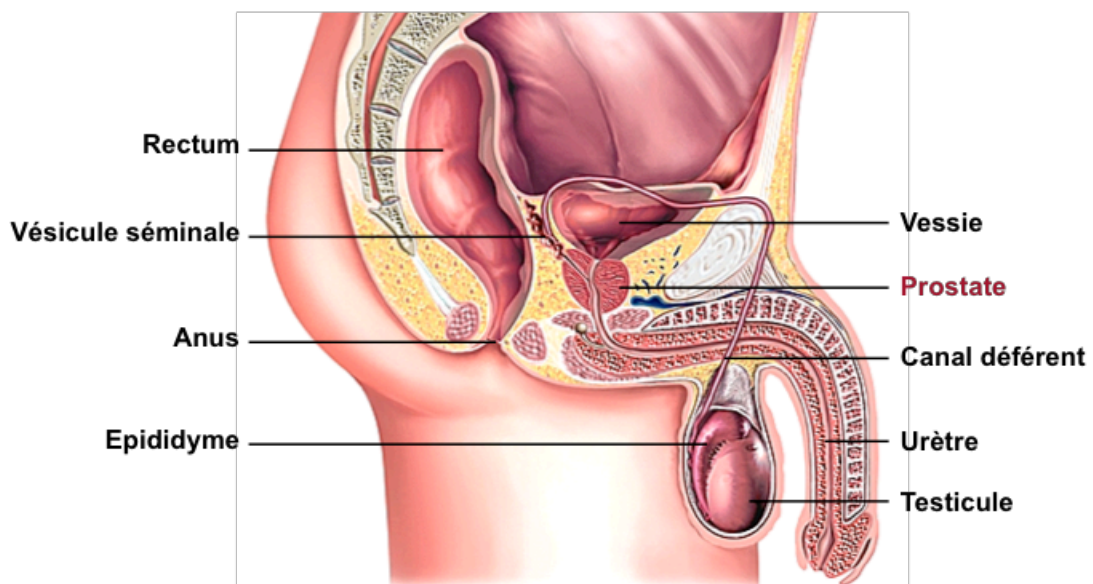
La prostate commence à se développer à partir de la dixième semaine en réponse aux sécrétions androgéniques des testicules. Le bourgeonnement de l'urètre pelvien entraîne la formation d'excroissances prostatiques présomptives organisées en 5 groupes indépendants de cordons solides ou plus. La formation du bourgeon prostatique nécessite l'expression du RA dans le tissu mésenchymateux urogénital voisin. Dès la onzième semaine, ces cordons développent une lumière et des glandes acineuses. Lorsque la concentration en testostérone atteint un niveau élevé, aux alentours de la quinzième semaine, l'activité sécrétoire de la

prostate débute et l'organisation de la glande se termine avec la différenciation du mésenchyme entourant la portion glandulaire en muscle lisse et tissu conjonctif (Larsen., 2011).

2) Anatomie de la prostate

La prostate est une glande accessoire qui fait partie de l'appareil génital masculin. Si elle est très petite à la naissance et ne pèse alors que quelques grammes, elle subit une phase de croissance à la puberté pour atteindre la grosseur et la taille d'un marron, pesant de 15 à 25 grammes à l'âge adulte. Localisée sous la vessie, en avant du rectum, elle entoure l'urètre qui présente une excroissance postérieure appelée « veru montanum » dans laquelle débouchent les canaux éjaculateurs traversant obliquement la glande prostatique (Figure 22).

A.



B.

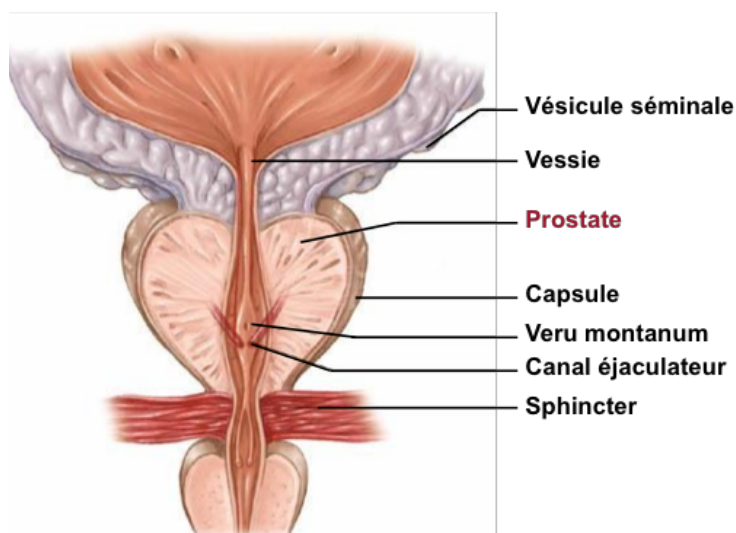


Figure 22 : Organisation de l'appareil uro-génital masculin à l'âge adulte.

A. Coupe sagittale schématisée replaçant la prostate au croisement de l'appareil urinaire et de l'appareil génital. **B.** Les canaux éjaculateurs se déversent dans l'urètre au niveau d'une structure anatomique appelée veru montanum.

Enveloppée par une épaisse capsule conjonctive, la prostate contient de nombreuses glandes tubulo-alvéolaires ancrées dans un stroma formé de tissu conjonctif et de muscle. Elle a d'abord été décrite en 1915 par Lowsley sous la forme de 3 lobes, à savoir 2 lobes latéraux réunis en avant par un isthme et un lobe médian situé au-dessus de l'abouchement des canaux éjaculateurs (Lowsley, 1915; Seisen et al., 2012).

Le modèle anatomique actuellement accepté a été défini par les travaux de Mc Neal en 1968. Il permet d'identifier 4 zones distinctes. La zone de transition représente 5% de la masse de la glande. Elle se compose de 2 lobes entourant l'urètre prostatique distal. La zone centrale, située en arrière de la zone de transition, est traversée par les canaux éjaculateurs et constitue 25% de la masse glandulaire. Elle compose la majeure partie de la base prostatique. Enfin, la zone périphérique qui entoure la zone centrale et l'urètre distal représente 70% de la masse de la glande. Elle constitue une partie de la base prostatique mais surtout l'intégralité de l'apex. Ces trois zones englobent l'intégralité des glandes tubulo-alvéolaires de la prostate tandis que la quatrième est composée du stroma fibro-musculaire complètement dépourvu de tissu glandulaire (Figure 23) (Mc Neal, 1968; Valkenburg and Pienta, 2015).

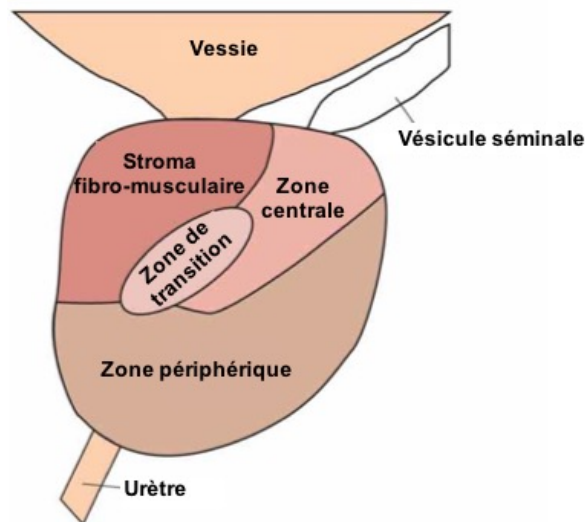


Figure 23 : Représentation schématique de l'anatomie de la prostate.

Les travaux de Mc Neal en 1968 ont permis de définir 4 zones distinctes au sein de la prostate : la zone périphérique, la zone de transition, la zone centrale et le stroma fibro-musculaire. (d'après Valkenburg et al., 2015)

3) Histologie de la prostate

Les glandes tubulo-alvéolaires de la prostate déversent leurs sécrétions dans l'urètre prostatique, participant ainsi à l'élaboration du sperme. Ces glandes sont composées d'un épithélium pseudo-stratifié qui repose sur un tissu de soutien riche en cellules musculaires, en fibroblastes et en collagène.

a. Épithélium prostatique

L'épithélium prostatique se compose de 2 couches cellulaires. La première couche est peu différenciée et contient majoritairement des cellules basales. On y trouve également des cellules neuroendocrines et des cellules souches. La seconde, appelée couche luminale, contient les cellules sécrétrices différenciées (Figure 24 A.). Des cellules intermédiaires présentent un stade de différenciation médian et expriment à la fois des marqueurs de cellules basales et de cellules luminales (Valkenburg and Pienta, 2015).

- **Cellules luminales**

Les cellules luminales représentent le type cellulaire majoritaire de l'épithélium prostatique. Hautement différenciées et de forme cylindrique, ces cellules ne prolifèrent pas. Elles assurent les fonctions exocrines de la prostate par la sécrétion du liquide prostatique et du PSA. Expriment le RA, leur survie dépend de la bio-disponibilité en androgènes. Différents marqueurs permettent de les différencier des autres types cellulaires de l'épithélium tels que les cytokératines (CK) 8 et 18, le marqueur de surface CD57 (*Cluster of differentiation 57*) ou encore la protéine NKX3-1 (Figure 24 A.) (Abate-Shen and Shen, 2000; Valkenburg and Pienta, 2015).

- **Cellules basales**

Les cellules basales, de forme cubique, sont peu différenciées et sont dépourvues d'activité sécrétoire. Elles se trouvent entre la couche luminale et la membrane basale. Elles expriment très peu le RA et sont caractérisées par les CK5 et 14, le marqueur de surface CD44 (*Cluster of differentiation 44*), le facteur p63, l'enzyme GST π (*Glutathione-S transferase π*) ou encore la protéine anti-apoptotique BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) (Figure 24 A.) (Long et al., 2005; Valkenburg and Pienta, 2015).

- **Cellules neuroendocrines**

Les cellules neuroendocrines forment une population mineure de l'épithélium prostatique. Elles sont localisées dans la couche basale et possèdent des expansions qui rejoignent la couche luminale. Elles sont différenciées, ne prolifèrent pas et sont androgéno-indépendantes. Ces cellules semblent jouer un rôle majeur dans la régulation nerveuse et endocrine de la prostate cependant, leur fonction n'est à ce jour pas clairement définie. Elles expriment de nombreux marqueurs dont certains sont utilisés en clinique pour les identifier. Il s'agit notamment de la chromogranine A, de la synaptophysine ou encore de l'endolase neurones-spécifique (NSE) (Figure 24 A. et B.) (Parimi et al., 2014; Valkenburg and Pienta, 2015).

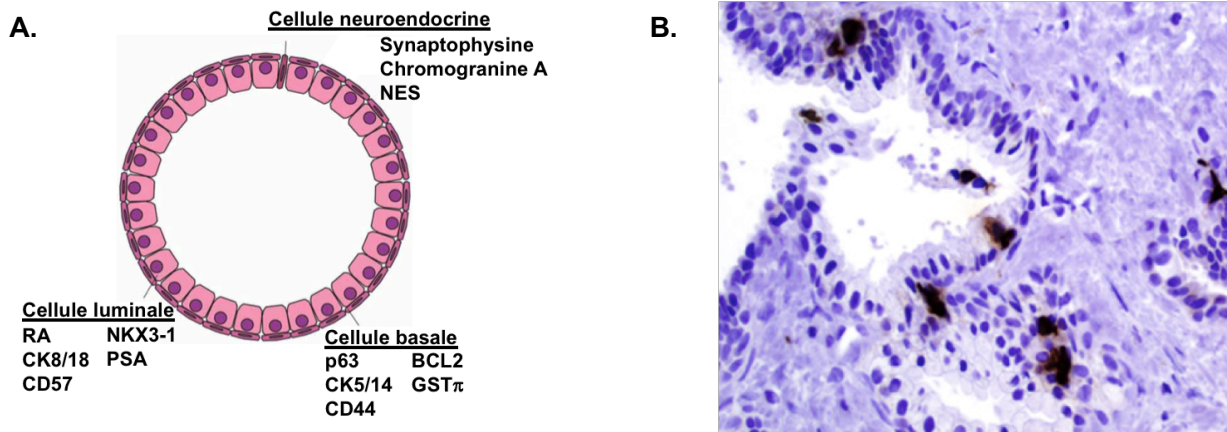


Figure 24 : Représentation de l'épithélium prostatique.

A. Les cellules basales et les cellules luminales constituent les 2 assises cellulaires de l'épithélium prostatique. Les cellules neuroendocrines représentent moins de 1% de l'épithélium prostatique. Elles prennent naissance dans la couche basale et s'étendent jusqu'à la couche luminale. **B.** Les cellules neuroendocrines sont mises en évidence par immuno-marquage de la chromogranine A. (d'après Parimi et al., 2014 et Valkenburg et al., 2015)

- **Cellules intermédiaires**

Des études histologiques ont mis en évidence des cellules situées dans le compartiment basal exprimant des marqueurs de cellules luminales et, à l'inverse, des cellules de la couche luminale exprimant des marqueurs de cellules basales. L'analyse des cytokératines a permis de définir deux phénotypes distincts avec des cellules exprimant CK5-8-14 et d'autres CK5-18. Les cellules positives pour CK5-18 sont localisées dans tout l'épithélium tandis que les cellules exprimant CK5-14-18 se retrouvent dans la couche basale. Ces cellules intermédiaires sont en réalité des cellules en cours de différenciation qui migrent depuis la couche basale vers le compartiment luminal. Ainsi, il semblerait qu'au cours de ce transit, elles perdent tout d'abord l'expression de CK14 avant celle de CK5 (Long et al., 2005).

- **Cellules souches**

Certaines cellules de la couche basale présentent des caractéristiques de cellules souches. Ces cellules sont immatures et possèdent un fort potentiel de prolifération et d'auto-renouvellement. Différents phénotypes ont été décrits pour caractériser ces cellules souches tels que le haut niveau d'expression de TACSTD2 (*Tumor-associated calcium signal transducer 2*), l'expression du marqueur CD133 (*Cluster of differentiation 133*) ou encore l'expression de p63 associée à l'absence d'expression de CK5 et 14. Le modèle de différenciation de l'épithélium prostatique le plus décrit aujourd'hui est que ces cellules souches donnent naissance aux cellules intermédiaires qui vont progressivement se différencier en cellules sécrétrices en migrant vers le compartiment luminal (Jaworska et al., 2015; Long et al., 2005).

b. Stroma prostatique

Le stroma prostatique se compose d'une matrice extracellulaire riche en fibres de collagène qui englobe des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. On y trouve également des cellules endothéliales, des fibres nerveuses autonomes, des cellules ganglionnaires mais aussi des représentants du système immunitaire tels que des lymphocytes ou des macrophages (Barron and Rowley, 2012).

Les communications entre l'épithélium et le stroma sont indispensables à la mise en place de la prostate au cours du développement embryonnaire mais aussi au maintien de l'homéostasie de la glande. De ce fait, de nombreux facteurs sécrétés par les deux types cellulaires ont une action paracrine réciproque de manière à contrôler la croissance et les fonctions de la prostate. Ainsi, la DHT produite par les cellules basales diffuse vers le stroma et active le RA des cellules musculaires lisses. Celles-ci produisent alors des facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF-7 (*Fibroblast growth factor 7*), le HGF (*Hepatocyte growth factor*), l'IGF-1 ou le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Leur action paracrine sur les cellules épithéliales est impliquée dans la morphogenèse prostatique mais aussi la prolifération et la survie cellulaire. En revanche, l'action paracrine du TGF- β inhibe la prolifération des cellules épithéliales et induit leur apoptose (Figure 25) (Berry et al., 2008; Wong et al., 2003).

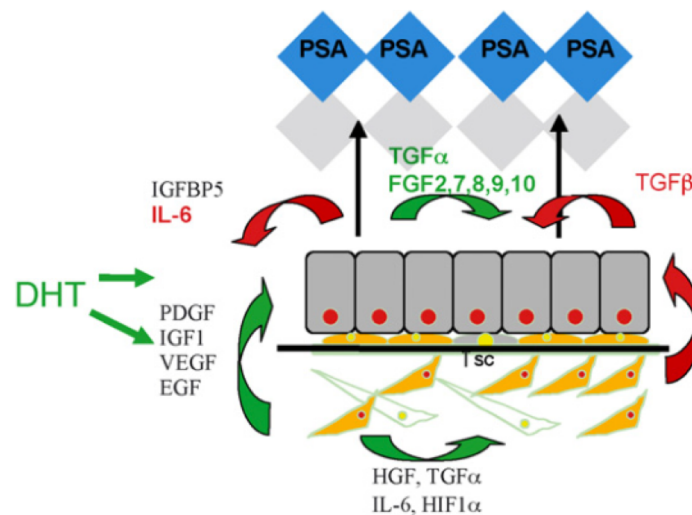


Figure 25 : Communication entre le stroma et l'épithélium.

Les cellules stromales sécrètent de nombreux facteurs de croissance qui exercent une action paracrine sur les cellules épithéliales. Leur effet peut être stimulateur (en vert) ou inhibiteur (en rouge). (d'après Berry et al., 2008)

4) Fonction exocrine de la prostate

La fonction exocrine de la prostate participe à l'élaboration du sperme. En effet, le sperme se compose de spermatozoïdes baignés dans un liquide séminal qui provient à la fois de sécrétions des vésicules séminales mais aussi de sécrétions prostatiques. Le liquide prostatique forme jusqu'à un tiers du volume du sperme et joue un rôle important dans la survie et la mobilité des spermatozoïdes. Au moment de l'éjaculation, la contraction du muscle lisse de la prostate permet son éjection dans l'urètre prostatique (Marieb, 1999).

Il s'agit d'un liquide laiteux et acide qui contient notamment du citrate et des enzymes comme la fibrinolyse, la plasmine séminale, la phosphatase acide prostatique ou encore la protéase PSA. Chacun des constituants du liquide prostatique a une fonction précise. De ce fait, bien que le fructose issu des sécrétions séminales soit le carburant majeur des spermatozoïdes, le citrate leur sert également de nutriment. La plasmine séminale possède des fonctions antibiotiques permettant d'éviter les infections des voies urinaires masculines. Le PSA permet de liquéfier le sperme au moment de l'éjaculation. Après éjaculation, les facteurs coagulants présents dans le sperme entraînent sa coagulation. La fibrinolyse liquéfie cette masse visqueuse pour permettre aux spermatozoïdes de commencer à se mouvoir dans les voies génitales de la femme (Marieb, 1999; Mc Kinley et al., 2014).

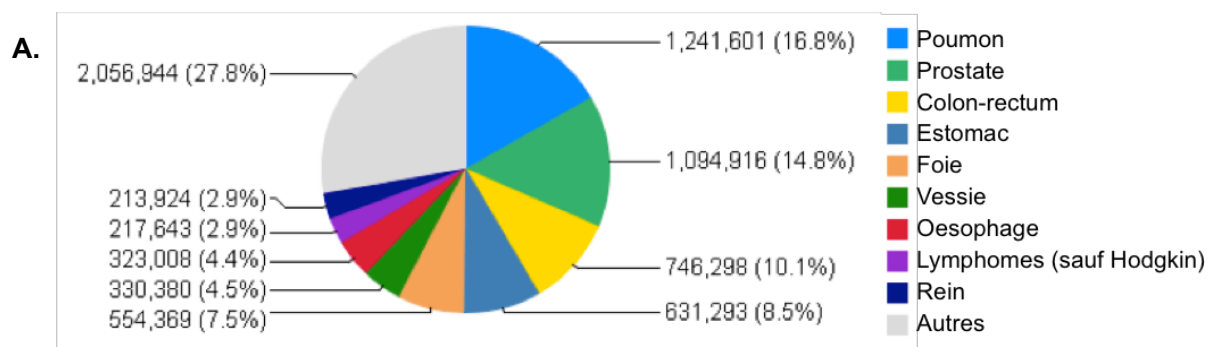
IV. Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate (CaP) représente aujourd'hui un réel enjeu de santé publique. En effet, il représente le premier cancer diagnostiqué chez l'homme de plus de 50 ans. Tout comme les cellules normales de la prostate, les cellules cancéreuses dépendent des androgènes pour leur croissance et leur survie. La suppression des androgènes entraîne la mort cellulaire. Cette découverte fondamentale pour la prise en charge thérapeutique des patients a valu le Prix Nobel à Charles Huggins en 1966 (Huggins and Hodges, 1941).

1) Épidémiologie

a. Incidence mondiale

Le CaP est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme, après le cancer du poumon. En 2012, le nombre de cas diagnostiqués dans le monde a été estimé à 1,1 million, représentant ainsi 15% des cancers chez l'homme. L'incidence géographique du CaP varie plus de 25 fois, avec des taux très élevés dans les régions développées notamment en Australie, en Nouvelle Zélande, en Amérique du Nord et dans le nord et l'ouest de l'Europe. Ce phénomène s'explique par un meilleur dépistage grâce à une pratique courante du dosage du PSA sanguin et la réalisation de biopsies (Figure 26) (Ferlay et al., 2015).



B.

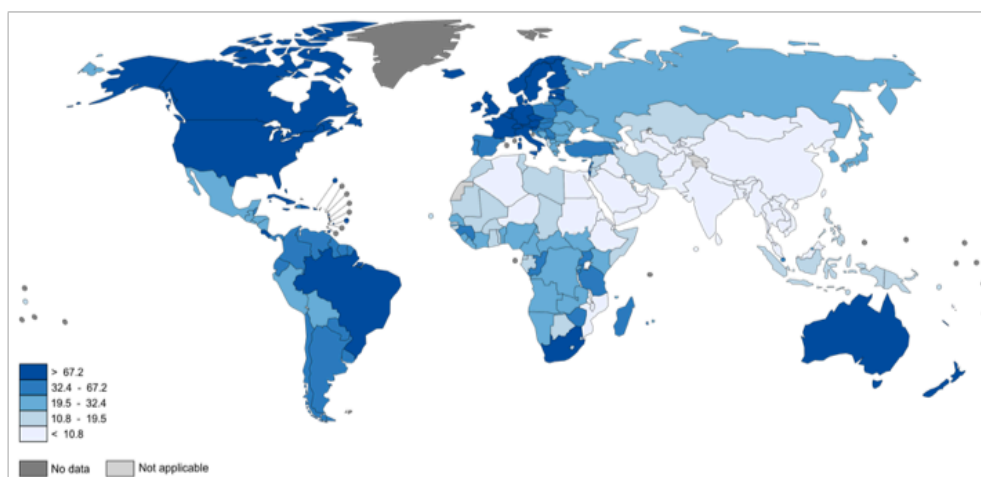


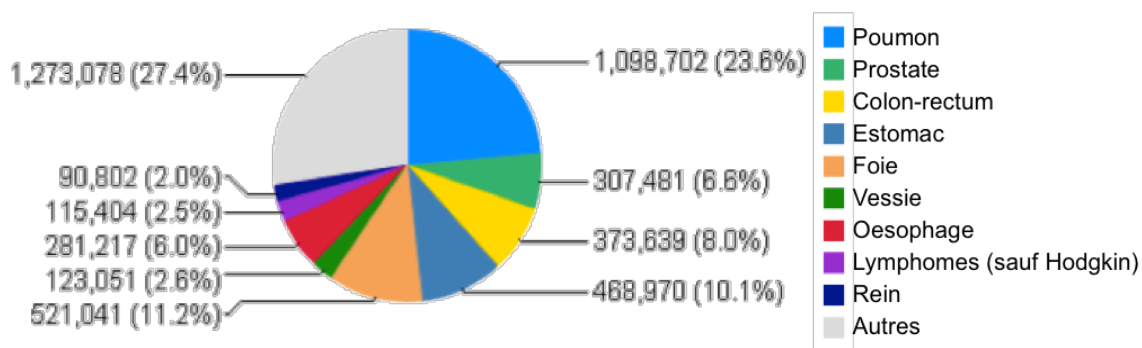
Figure 26 : Incidence du cancer de la prostate.

A. Le CaP représente près de 15% des cancers diagnostiqués chez l'homme dans le monde, ce qui le place en seconde position derrière le cancer du poumon. **B.** L'incidence géographique varie beaucoup et les taux les plus élevés se retrouvent dans les pays développés comme l'Australie, la Nouvelle Zélande, l'Amérique du Nord ou encore le nord et l'ouest de l'Europe. (d'après Ferlay et al., 2015)

b. Mortalité mondiale

Avec 307 000 décès estimés dans le monde en 2012, le CaP se place en cinquième rang en termes de mortalité par cancer chez l'homme. D'un point de vue géographique, il y a moins de variabilité de la mortalité du CaP que de son incidence, toutefois, les taux les plus élevés sont cette fois observés dans les pays les moins développés. Cette répartition peut s'expliquer par un moins bon accès aux soins médicaux (Figure 27) (Ferlay et al., 2015).

A.



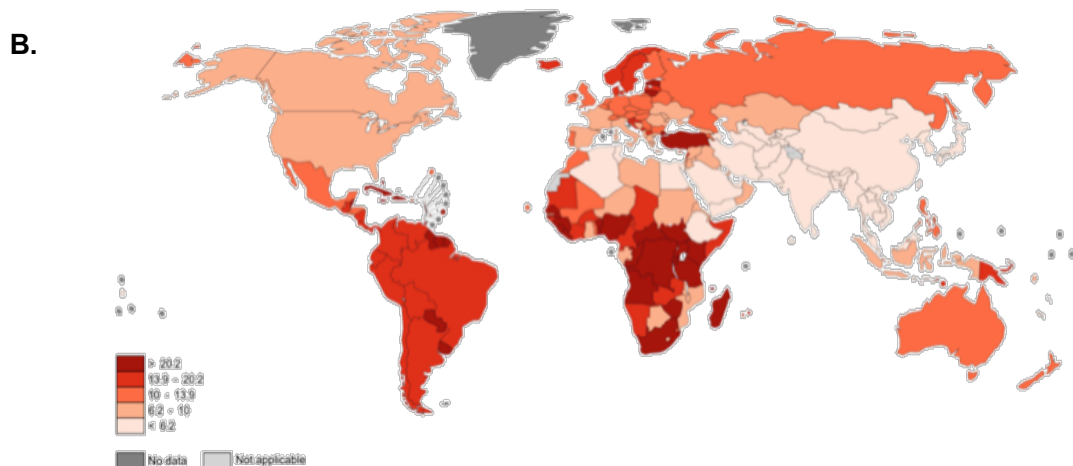


Figure 27 : Mortalité du cancer de la prostate.

A. Avec 6,6%, le CaP se place en cinquième rang en termes de mortalité par cancer chez l'homme.
B. Géographiquement, la mortalité est plus élevée dans les pays les moins développés. (d'après Ferlay et al., 2015)

c. Facteurs de risque

A ce jour, seuls trois facteurs de risque de développer un CaP ont été validés avec certitude. Il s'agit de l'âge, de l'existence d'antécédents familiaux ou encore de l'origine géographique et notamment l'appartenance à la population africaine, afro-américaine ou caribéenne.

- **Age**

Le CaP touche les hommes âgés. Ainsi, avant l'âge de 50 ans, la proportion d'hommes atteints d'un CaP est très faible. La plupart du temps, le CaP est diagnostiqué à l'âge de 65 ans ou plus. En France métropolitaine, près de 48 500 nouveaux cas de CaP ont été recensés en 2013, dont la majeure partie dans la tranche des 65 à 74 ans (Table 2) (Adjakly et al., 2015; Jéhannin-Ligier et al., 2017).

Classe d'âge	Incidence 2013	Mortalité 2013
[00 ; 14]	0	0
[15 ; 49]	279	11
[50 ; 64]	14 088	477
[65 ; 74]	20 186	1 276
[75 ; 84]	10 771	3 078
[85; ++]	3 103	3 783
Total	48 427	8 625

Table 2 : Incidence et mortalité du cancer de la prostate en France métropolitaine pour l'année 2013.

Le CaP est majoritairement diagnostiqué chez les hommes de 65 à 74 ans. La mortalité est plus élevée chez les sujets de 75 ans et plus. (d'après Jéhannin-Ligier et al., 2017)

- **Origine géographique**

L'incidence du CaP varie beaucoup en fonction de la zone géographique considérée. Près de 70% des CaP sont diagnostiqués dans les pays développés, notamment en Australie, en Nouvelle Zélande, en Amérique du Nord et dans le nord et l'ouest de l'Europe. Cependant, cela peut s'expliquer par un meilleur accès au dépistage et à une pratique plus courante du dosage du PSA sanguin ou encore de la réalisation de biopsies (Ferlay et al., 2015).

L'incidence est également relativement élevée dans des pays moins développés tels que l'Afrique du Sud, l'Amérique du Sud ou encore les Caraïbes. De plus, l'étude des populations afro-américaines a mis en évidence le diagnostic de maladies plus avancées et un phénomène de récurrence plus fréquent par rapport aux populations caucasiennes américaines et européennes (Powell et al., 2014).

- **Antécédents familiaux**

La présence d'antécédents familiaux entraîne un risque accru de développer un CaP. En effet, 5 à 10% des CaP sont héréditaires et présentent un profil de transmission mendélien. Le CaP familial se manifeste de manière plus précoce, en moyenne 6 à 7 ans plus tôt que les formes sporadiques (Pakkanen et al., 2007; Zeegers et al., 2003).

d. Gènes de susceptibilité

Le caractère héréditaire du CaP peut s'expliquer par transmission de facteurs génétiques prédisposants. Ainsi, plusieurs polymorphismes de l'ADN des cellules germinales sont aujourd'hui considérés comme des facteurs de risque. L'étude de ces mutations a débuté avec l'identification du locus HPC1 (*Hereditary Prostate Cancer 1*) sur le chromosome 1 (Smith et al., 1996). Ce locus contient notamment le gène de la *Ribonucléase L* (RNase L) qui est impliquée dans la prolifération et l'apoptose en réponse à un stimuli externe. Plusieurs polymorphismes ont été décrits comme la mutation R462Q. Cette substitution diminue l'activité enzymatique de la RNase L, permettant ainsi l'échappement des cellules à la mort par apoptose (Krüger et al., 2005). D'autres gènes de susceptibilité ont depuis été décrits comme *ELAC2* (*Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2*) dont le produit est impliqué dans la synthèse des ARN de transfert ou encore *MSC1* (*Macrophage scavenger receptor 1*) (Alvarez-Cubero et al., 2013; Beuten et al., 2010).

Plus récemment, les gènes *BRCA1* et *BRCA2*, connus pour leur implication dans le cancer du sein, ont été caractérisés dans le CaP. Si l'implication de *BRCA1* est controversée, toutes les études mettent en évidence un développement plus précoce et un caractère plus agressif des CaP diagnostiqués chez les porteurs de mutations *BRCA2*. Cependant ce gène n'est muté que dans 2% de la population développant un CaP avant l'âge de 55 ans. La mutation du gène *BRCA2* est malgré tout associée à un risque 23 fois plus grand de développer un CaP dans la même tranche d'âge (Castro et al., 2013; Kote-Jarai et al., 2011).

La mutation du facteur de transcription *HOXB13* (*Homeobox B13*), bien que rare, est également retrouvée de manière récurrente. *HOXB13* interagit avec le RA pour promouvoir le développement et la différenciation de la prostate saine ou cancéreuse. Ce polymorphisme augmente de 8 fois le risque de développer un CaP avant l'âge de 55 ans. Cependant, aucune corrélation n'a été établie entre cette mutation et l'agressivité ou la récurrence du CaP (Karlsson et al., 2014).

La voie de signalisation des androgènes est également une source de prédispositions majeures au CaP. Comme mentionné précédemment, les polymorphismes du RA, localisés au niveau des séquences poly-G et poly-Q du NTD ont été associés au risque de développer un CaP. Ainsi, il existerait une corrélation inverse entre la longueur des répétitions et l'activité du RA (Belikov et al., 2015; Werner et al., 2006). De ce fait, un nombre faible de répétitions pour chaque codon a été décrit comme un facteur de risque (Irvine et al., 2000). Bien que toutes les études n'aillent pas dans ce sens (Kumar et al., 2011), ces observations ont été

validées par une méta-analyse réalisée sur 51 publications avec près de 15000 cas de CaP et 19000 contrôles pour la séquence poly-Q et 14 publications pour la séquence poly-G pour environ 3000 cas d'étude et autant d'individus contrôles (Weng et al., 2017).

Trois polymorphismes sont également décrits pour l'enzyme de conversion de la testostérone en DHT, la 5- α -réductase. Il s'agit des substitutions A49T et V89L ainsi que de la séquence répétée du dinucléotide TA au niveau de la partie non-traduite de l'exon 5. La substitution A49T accroît l'activité enzymatique de la protéine, permettant ainsi une augmentation de l'activation du RA, tandis que la mutation V89L la diminue d'environ 30% (Makridakis et al., 1999). De nombreuses études ont cherché à caractériser leur implication dans le développement du CaP mais les résultats sont variés et il n'existe aucun consensus. En 2011, une méta-analyse regroupant 31 publications basées sur une cohorte totale de près de 15000 cas de CaP et autant d'individus contrôles a permis de valider le caractère de prédisposition de la substitution A49T. En revanche, aucun lien n'a été retenu entre la mutation V89L et le développement d'un CaP. Enfin, la longueur des répétitions TA a été inversement corrélée au risque de CaP (Li et al., 2011). Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des androgènes sont aussi sujettes aux polymorphismes, comme le cytochrome P450 C17 ou encore la 3 β HSD (Chang et al., 2002).

2) Cancérogenèse prostatique

En considérant le modèle anatomique de la prostate établi par Mc Neal, la zone périphérique semble être le lieu privilégié du développement du CaP. En effet, 75% des CaP ont pour origine la zone périphérique contre seulement 20% pour la zone de transition. Peu de CaP sont retrouvés au niveau de la zone centrale (Mc Neal et al., 1988; Shaikhibrahim et al., 2012).

L'étude des biopsies prostatiques a mis en évidence le caractère multifocal du CaP qui se traduit par la présence de nombreuses lésions précancéreuses disséminées au sein de la glande et présentant des profils génétiques distincts (Shen and Abate-Shen, 2010). Le modèle de cancérogenèse actuellement admis repose sur l'évolution progressive du CaP à travers différents stades et l'accumulation de mutations aboutissant à la prolifération anarchique des cellules de l'épithélium prostatique. Ainsi, la prostate saine présente d'abord une atrophie inflammatoire proliférative. Celle-ci aboutit à la formation de lésions néoplasiques intra-épithéliales qui évoluent vers un carcinome invasif (Figure 28) (De Marzo et al., 2007).

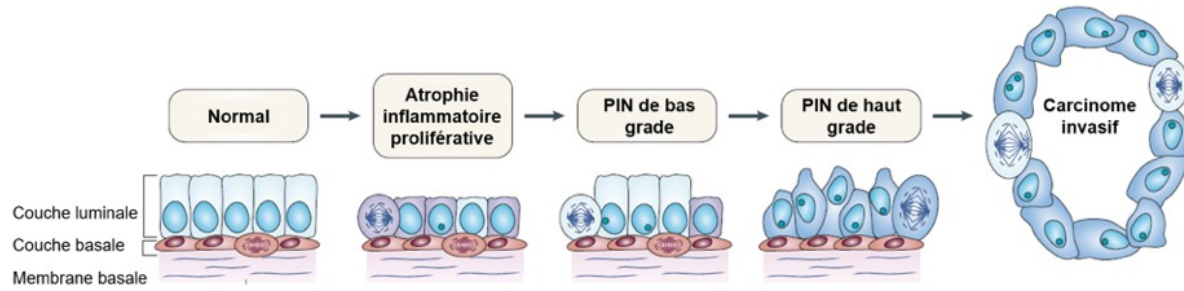


Figure 28 : Formation du cancer de la prostate.

L'une des premières étapes de cancérogenèse du CaP est l'évolution de l'épithélium sain vers le stade d'atrophie inflammatoire proliférative. Après quoi, des lésions intra-épithéliales de bas grade puis de haut grade se forment, aboutissant à la formation d'un carcinome invasif. Cette évolution repose sur l'accumulation d'un grand nombre d'altérations génétiques. (d'après de Marzo et al., 2007)

a. Atrophie inflammatoire proliférative

Des infiltrats de cellules immunitaires sont couramment observés lors de biopsies prostatiques. Les origines de cette inflammation sont souvent inconnues et pourraient provenir d'infections, de variations hormonales, de reflux urinaires, de calculs prostatiques, de l'exposition à des composés chimiques ou encore de facteurs alimentaires (Woenckhaus and Fenic, 2008).

Les cellules immunitaires telles que les lymphocytes, les macrophages ou encore les neutrophiles sont recrutées au niveau de la zone inflammatoire. Elles produisent des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote qui agissent sur les cellules épithéliales et entraînent des dommages à l'ADN et la mort cellulaire. Morphologiquement, ce processus se traduit par le développement d'une atrophie focale. Cependant, la déstabilisation de la balance des signaux prolifératifs et anti-prolifératifs provenant de la communication entre les cellules stromales et les cellules épithéliales ainsi que de nombreuses altérations génétiques entraînent une régénération cellulaire importante. Les cellules présentent alors un index mitotique élevé et un faible taux d'apoptose, ce qui caractérise l'atrophie inflammatoire proliférative (PIA) (De Marzo et al., 2007; Ruska et al., 1998).

Les mutations retrouvées au sein de la PIA permettent de favoriser l'instabilité génétique et la transformation maligne des cellules. Ainsi, la perte d'expression de l'inhibiteur de cyclines p27/KIP1 (*Kinesin like protein 1*), du facteur anti-prolifératif NKX3-1 ou encore de PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) favorise la progression du cycle cellulaire. La répression du gène *GSTP1* (*glutathione-S transferase π*) qui code pour la protéine GST π protégeant les cellules des radicaux libres permet d'augmenter les altérations génétiques (De Marzo et al., 2007; Perletti et al., 2010; Woenckhaus and Fenic, 2008). Cependant, ces altérations se retrouvent uniquement dans une sous-population de la PIA tandis que les autres cellules surexpriment des suppresseurs de tumeur en réponse au stress oxydatif. L'évolution de la PIA en CaP n'est donc pas un phénomène systématique. Le haut potentiel mutationnel établi dans cet environnement inflammatoire peut perturber la balance oncogènes/suppresseurs de tumeur et enclencher le processus de cancérogenèse prostatique (De Marzo et al., 2003; Nakayama et al., 2003).

b. Néoplasie intra-épithéliale

En fonction des modifications génétiques, les PIA peuvent évoluer en néoplasies intra-épithéliales (PIN). Sur le plan histologique, les PIN de bas grade et de haut grade forment un continuum basé sur l'évolution continue des cellules. Elles sont différenciables des autres lésions prostatiques et présentent progressivement une hyperplasie des cellules épithéliales, une nucléomégalie avec un nucléole proéminent et la condensation de la chromatine à proximité de la membrane nucléaire (Brawer, 2005).

La perte d'expression de la GST π par hyperméthylation de îlots CpG du promoteur est l'une des altérations qui favorise la transition des PIA vers le stade de PIN (Nakayama et al., 2003). Cela permet notamment de soutenir la diminution des télomères induite par les radicaux libres, une caractéristique importante des cellules cancéreuses. En effet, dans la plupart des cellules somatiques, la longueur des télomères diminue à chaque cycle cellulaire et apparaît être un facteur limitant la vie des cellules puisque lorsqu'ils sont trop courts, la division cellulaire est inhibée et les cellules entrent en sénescence. Cependant, au sein des cellules cancéreuses, les télomères apparaissent très courts, bien qu'elles soient encore en division (Figure 29) (Meeker et al., 2002). A un certain point, la petitesse des télomères semble être critique et les cellules se retrouvent en état de crise caractérisé par de nombreux réarrangements chromosomiques tels que le gène de fusion *TMPRSS2:ERG* (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*), marqueur caractéristique du CaP (De Marzo

et al., 2003; Wang et al., 2017). Le gène *TMPRSS2* encode une sérine-protéase dont l'expression est sous le contrôle du RA. *ERG* est un oncogène codant pour un facteur de transcription clé dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse ou encore l'inflammation. Cette translocation permet la surexpression du facteur ERG, qui n'est normalement pas exprimé par les cellules épithéliales prostatiques et jouerait un rôle dans la progression tumorale en favorisant l'angiogenèse, l'invasion et la migration cellulaire (Carver et al., 2009; Deramaudt et al., 2001; Gupta et al., 2010). L'accumulation progressive des altérations génétiques conduit la progression tumorale vers le stade de carcinome invasif.

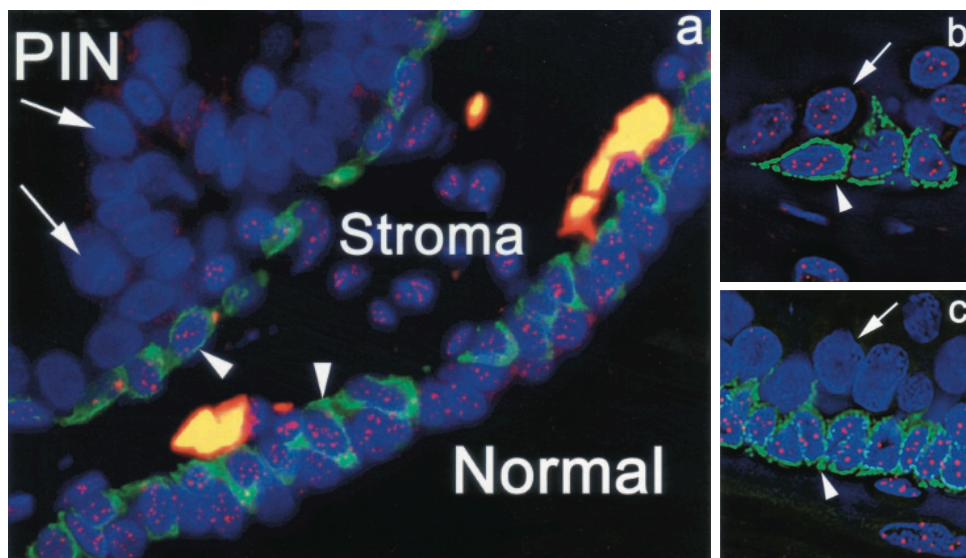


Figure 29 : Télomères courts des cellules luminales des néoplasies intraépithéliales prostatiques.

A. Le marquage fluorescent *in situ* des télomères (en rouge) diffère entre les régions de l'épithélium normal et les PIN. Le marquage des noyaux est réalisé au DAPI (en bleu) et les cellules basales sont mises en évidence à l'aide d'un anticorps anti-cytokératine (en vert). **B.** Au niveau de l'épithélium sain, les cellules luminales (flèche du haut) et les cellules basales (flèche du bas) présentent le même marquage des télomères. **C.** Pour les PIN, le marquage des télomères semble beaucoup plus faible pour les cellules luminales que les cellules basales, traduisant leur important raccourcissement. (d'après Meeker et al., 2002)

c. Carcinome invasif

La dégradation de la membrane basale permet l'invasion du stroma adjacent par la tumeur. L'adénocarcinome prostatique est histologiquement caractérisé par l'absence de marquage pour p63 et les cytokératines 5 et 14. Ces marqueurs sont caractéristiques des cellules de la couche basale de l'épithélium prostatique. Ainsi, leur absence au sein des CaP traduit la disparition des cellules basales. Le diagnostic est également favorisé par la présence d'un marquage fort pour AMACR (*α -methylacyl-CoA racemase*), un marqueur des cellules luminales fortement surexprimé (Humphrey, 2007).

La majeure partie des CaP est composée de carcinomes acineux. Cependant, bien que rares, d'autres types existent comme le CaP mucineux ou encore le CaP ductal. Le cancer neuroendocrine à petites cellules représente moins de 2% des tumeurs de la prostate. En revanche, des zones de différenciation neuroendocrine sont fréquemment observées au sein des CaP acineux (Grignon, 2004; Shen and Abate-Shen, 2010).

Le CaP est d'abord localisé au niveau de la glande prostatique. Il peut ensuite former des métastases au niveau des relais ganglionnaires puis au niveau des os, des poumons ou du foie. Pour cela, une succession d'étapes est nécessaire. Les cellules tumorales envahissent d'abord le stroma puis rejoignent les vaisseaux sanguins par un processus appelé intravasation. La circulation les emmène au niveau des organes cibles. Elles quittent alors les vaisseaux sanguins par adhérence aux cellules endothéliales et extravasion. Elles perçoivent les signaux du microenvironnement, ce qui induit la prolifération cellulaire et l'établissement d'une métastase. Le processus de progression tumorale et de formation des métastases repose sur une transdifférenciation des cellules appelée transition épithélio-mésenchymateuse et caractérisée par la perte de marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux (Figure 30) (Mundy, 2002).

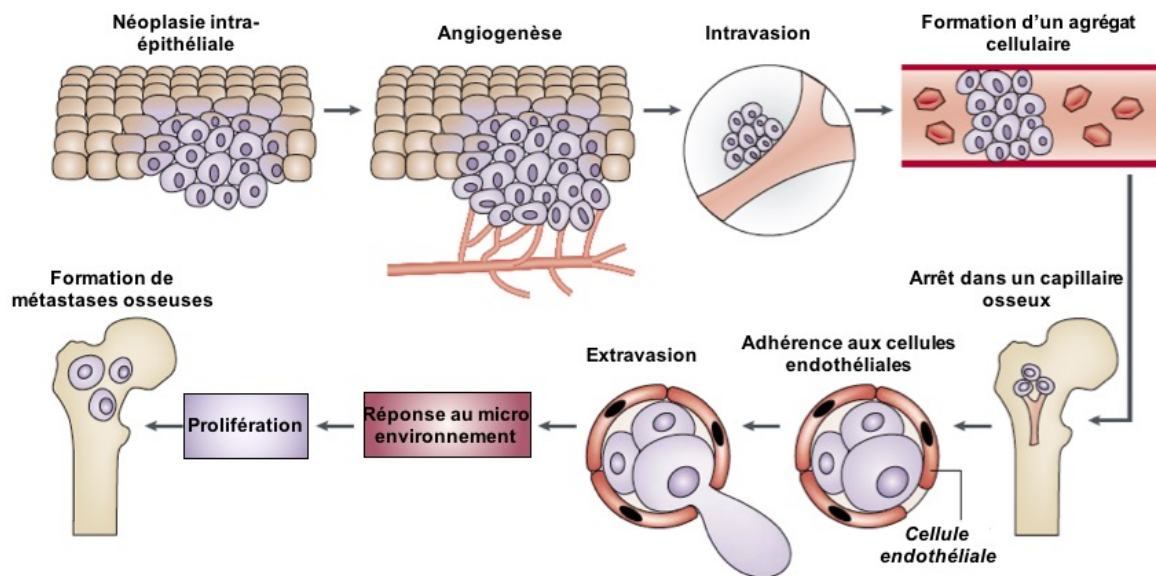


Figure 30 : Mécanisme de dissémination métastatique vers les os.

Les cellules cancéreuses envahissent le stroma et induisent la formation de vaisseaux sanguins. Elles entrent ensuite dans la circulation sanguine par intravasation et rejoignent les capillaires situés dans les os. La formation d'un agrégat cellulaire peut participer à l'arrêt des cellules. Elles s'extraient des vaisseaux par adhérence aux cellules endothéliales et extravasation. Percevant les signaux du microenvironnement, elles prolifèrent et établissent ainsi des métastases osseuses. (d'après Mundy, 2002)

3) Diagnostic

Au départ, le CaP est le plus souvent asymptomatique. Ainsi, malgré la croissance et l'extension de la tumeur, le patient ne perçoit aucun symptôme. A un stade plus avancé, le CaP peut engendrer des problèmes de miction tels qu'un besoin fréquent ou une incapacité d'uriner, une sensation de brûlure ou une douleur en urinant, des troubles de l'érection ou encore la présence de sang dans les urines ou le sperme. Des douleurs osseuses ou une compression médullaire sont un signe clinique de la présence d'un CaP métastatique (Latorzeff and Gamé, 2011; Roupret and Beley, 2008). De ce fait, plus le CaP est diagnostiqué tôt, meilleures sont les chances de guérison du patient.

Cependant, le dépistage du CaP est aujourd'hui particulièrement controversé. En effet, aucune étude n'a à ce jour établi de bénéfice du dépistage pour l'état de santé globale de la population dépistée. Néanmoins, le dépistage du CaP permet de diminuer la mortalité spécifique de la maladie (Arnsrud Godtman et al., 2015; Schröder et al., 2014). En France, l'Association Française d'Urologie recommandait la réalisation annuelle d'un dosage du PSA

sanguin et d'un examen clinique par toucher rectal entre 45-50 et 75 ans (Latorzeff and Gamé, 2011). Cependant, la détection précoce du CaP s'adresse maintenant exclusivement aux hommes en bon état fonctionnel et à la probabilité de survie prolongée. Cette procédure repose toujours sur un toucher rectal et un dosage du PSA mais sans nécessité de répétition annuelle ou avec un intervalle de 2 ans en cas de facteur de risque (Rozet et al., 2016). De la même manière, aux États-Unis, il a été recommandé en 2012 de ne plus informer les patients de la possibilité d'effectuer le dosage du PSA en raison du risque de surdiagnostic et de surtraitement du CaP. Un vif débat s'est dès lors instauré suite à l'observation d'une augmentation des CaP diagnostiqués à un stade évolué ou métastatique. En effet, la détection précoce du CaP a pour bénéfice avéré la diminution considérable des formes métastatiques au diagnostic, limitant ainsi la morbidité et les coûts des traitements des formes avancées (Arnsrud Godtman et al., 2015; Buzzoni et al., 2015; Welch et al., 2015) .

a. Dosage du PSA

Le PSA est une glycoprotéine produite par les cellules luminales prostatiques qui possède une activité enzymatique de type sérine-protéase. Sécrété dans le liquide prostatique, il permet la liquéfaction du sperme. Bien que cette protéase se retrouve majoritairement dans le sperme, il est également possible d'en effectuer le dosage sanguin.

Dans les années 1980, deux équipes de recherche ont permis de caractériser le PSA comme un marqueur du CaP et de développer les bases du dosage sanguin (Papsidero et al., 1980; Stamey et al., 1987). Aujourd'hui, le dosage du PSA est une pratique courante dans les pays développés. La valeur seuil retenue est de 4ng/mL, permettant d'obtenir une sensibilité d'environ 90%. Si le PSA sanguin est compris entre 4 et 10ng/mL, les $\frac{3}{4}$ des CaP diagnostiqués sont localisés et auront une bonne réponse au traitement. Si la valeur de PSA atteint les 30ng/ml ou plus, alors il est probable d'être en présence d'un CaP avancé avec une dissémination métastatique (Boissier, 2011).

La valeur du PSA dépend de plusieurs critères tels que l'âge du patient et le volume prostatique et une augmentation du PSA n'est pas toujours synonyme de CaP. Pour permettre un meilleur diagnostic, il est possible de doser la forme libre du PSA. En effet, dans la circulation sanguine, le PSA peut se trouver sous forme libre ou complexé à des protéines du sang. Il est reconnu que la forme libre du PSA augmente non pas en cas de CaP mais bien en présence d'une hypertrophie bénigne de la prostate. Ainsi, seul un rapport du PSA libre sur le PSA total dont la valeur est basse témoigne de la présence d'un cancer. Cependant, le

dosage de la fraction libre du PSA n'est pas recommandé en première intention. Il est réalisé lorsque le taux de PSA total reste élevé malgré la réalisation de biopsies négatives (Boissier, 2011; Roupret and Beley, 2008).

Le dosage du PSA a révolutionné le diagnostic et le suivi du CaP. Cependant, il reste un marqueur général des pathologies prostatiques et n'est pas spécifique du cancer. Ainsi, d'autres marqueurs sont aujourd'hui en cours d'étude de manière à améliorer la spécificité du diagnostic. Parmi ces marqueurs, le gène *PCA3* (*Prostate cancer associated 3*) semble être un bon candidat. En effet, il est exprimé quasiment uniquement dans le tissu cancéreux prostatique. Son expression est nulle dans les tissus non prostatiques et très faible dans la prostate saine ou les pathologies prostatiques bénignes (Bussemakers et al., 1999; Hessels et al., 2003; Kok et al., 2002). Son ARNm peut être dosé dans les urines après massage prostatique. En France, son utilisation est réservée aux protocoles de recherche ou aux démarches diagnostiques financées par les patients eux-mêmes (Vlaeminck-Guillem et al., 2015).

b. Toucher rectal

Le dosage du PSA seul ne suffit pas au dépistage du CaP. En effet, il est estimé que 5 à 10% des CaP palpables au toucher présentent une valeur de PSA normale. Le toucher rectal est d'ailleurs préconisé préalablement à la prescription du dosage du PSA (Boissier, 2011; Gosselaar et al., 2008). Il permet au praticien de palper la prostate à travers la paroi du rectum et d'obtenir des informations quant au volume de la prostate, la présence de nodules durs ou d'une zone plus ferme, ou encore l'asymétrie des lobes prostatiques. Ces observations permettent d'émettre une alerte relative à la suspicion d'un CaP (Roupret and Beley, 2008).

c. Biopsies

Toute anomalie mise en évidence par le dosage du PSA ou au cours du toucher rectal conduit à la réalisation d'un examen anatomo-pathologique. Il repose sur le prélèvement de biopsies echo-guidées endorectales permettant de rendre compte de l'ensemble de la prostate. Ainsi, 10 à 12 prélèvements sont effectués en première intention, étagés de la base à l'apex de la glande et dirigés vers la zone périphérique ou toute zone suspecte à l'échographie (Rozet et al., 2016).

Les fragments de prostate sont ensuite analysés au microscope par un anatomo-pathologiste. Cet examen permet de déterminer le type histologique de CaP mais aussi son grade par la classification TNM (*Tumor, Metastasis, Node*), le score de Gleason ou encore la classification d'Amico.

La classification TNM est le plus ancien facteur pronostique validé. Elle tient compte de la taille de la tumeur, de son extension extracapsulaire, de l'atteinte ganglionnaire et de la présence de métastases (Yarbro et al., 1999).

Le score de Gleason, reconnu internationalement, a été défini en 1966 puis revu en 2005 et en 2014. Il définit 5 grades histologiques en fonction de la différenciation des tumeurs et permet d'attribuer un indice composite dont la valeur est obtenue en additionnant le grade des 2 territoires les plus représentés. Il permet de rendre compte de l'architecture de la glande dans laquelle coexistent plusieurs foyers tumoraux d'évolution différente et à des stades de différenciation distincts (Figure 31) (Epstein et al., 2005; Gleason, 1966; Harnden et al., 2007). En 2014, le classement des tumeurs prostatiques par le score de Gleason a été débattu au cours de la conférence consensus de la société internationale des pathologies urologiques et les bases d'une nouvelle stratégie de classification ont été développées. Cette nouvelle stratification tend à mieux rendre compte du risque des tumeurs et discrimine ainsi 5 groupes de CaP en fonction de leur indice composite de Gleason. Cette stratégie a été validée par l'organisation mondiale de la santé en 2016 (Epstein et al., 2016 a and b).

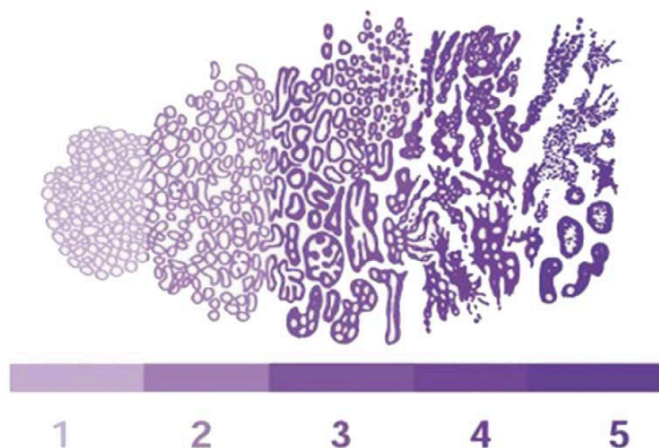


Figure 31 : Représentation des différents scores de Gleason.

Le grade 1 correspond à des glandes de petites tailles, uniformes et bien différenciées. Le grade 2 caractérise des glandes arrondies mais plus dispersées et aux bords mal définis. Des glandes simples de taille, de forme et d'espacement variés mais aussi des massifs épithéliaux cribiformes ou papillaires sont regroupés dans le grade 3. Le grade 4 est caractérisé par la présence de glandes fusionnées et de cellules claires. Le grade 5 ne présente plus de structures glandulaires, la masse tumorale y est indifférenciée. (d'après Harnden et al., 2007)

La classification d'Amico permet de guider la prise en charge thérapeutique des patients en les ségrant dans différents groupes à risque. Initialement, elle englobait les facteurs multiples du dosage du PSA, du score de Gleason et du stade TNM. Depuis peu, elle intègre d'autres paramètres cliniques tels que le pourcentage de biopsies positives par exemple (Kattan, 2003).

d. Imagerie à résonance magnétique

L'imagerie à résonance magnétique (IRM) occupe depuis peu une place importante au cœur du diagnostic du CaP. Bien qu'elle ne fasse pas partie des recommandations officielles, elle est prescrite par la moitié des urologues français en amont de la réalisation des biopsies (Renard-Penna et al., 2016). Elle permet d'apporter des précisions quant au volume de la tumeur et aux caractéristiques des zones suspectes de manière plus précise que l'échographie. Les images peuvent ainsi être utilisées pour guider le clinicien au cours de la réalisation des biopsies grâce à des applications logicielles projetant l'IRM en 3 dimensions sur l'écran de guidage de l'échographie. De plus, grâce à sa bonne valeur prédictive négative, l'IRM permet également d'éviter les prélèvements sur de nombreux patients. Les résultats de l'essai randomisé PRECISION appuient l'efficacité de l'IRM systématique avant une première série de biopsies pour une meilleure détection des cancers cliniquement significatifs par rapport à la biopsie standard (Kasivisvanathan et al., 2018).

4) Prise en charge thérapeutique

Différents facteurs cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques permettent d'estimer le résultat d'un traitement et d'orienter la décision thérapeutique. Il s'agit notamment des données du toucher rectal, du nombre de biopsies positives, du score de Gleason, du grade TNM, de la classification d'Amico et de la valeur du dosage du PSA. L'espérance de vie est aussi un élément clé puisqu'un traitement à visée curative sera mis en place uniquement pour les patients ayant une espérance de vie de plus de 10 ans (Rozet et al., 2016).

a. Cancers localisés

Le diagnostic précoce du CaP permet d'accroître le taux de guérison des patients. En effet, les $\frac{3}{4}$ des cancers localisés présentant une valeur du PSA comprise entre 4 et 10ng/mL présentent une bonne réponse thérapeutique (Boissier, 2011).

- **Surveillance active**

La surveillance permet de déplacer dans le temps le traitement du CaP. Elle est basée sur l'hypothèse de formes latentes du CaP, à très faible risque de progression et qui pourraient rester asymptomatiques durant plusieurs années voire la vie entière du patient. Cette surveillance permet ainsi d'éviter le sur-traitement du CaP et d'améliorer la qualité de vie du patient en lui évitant les désagréments de la prise en charge thérapeutique classique. Elle repose sur la réalisation régulière d'examens de contrôle incluant le dosage du PSA, le toucher rectal et la réalisation de biopsies. Dès lors qu'apparaît un signe de progression tumorale, un traitement actif est instauré (Rozet et al., 2016; Salomon et al., 2010).

- **Chirurgie**

La prise en charge chirurgicale du CaP se fait par prostatectomie totale et exérèse des vésicules séminales et représente le traitement de référence des tumeurs localisées de la prostate chez l'homme de moins de 70 ans présentant une espérance de vie de plus de 10 ans. Un curage ganglionnaire peut également être réalisé pour les groupes à risque intermédiaire ou élevé de rechute (Rozet et al., 2016).

L'incontinence urinaire et l'impuissance sont les deux complications post-opératoires majeures de la prostatectomie. Ainsi, l'enjeu majeur, outre la résection de la tumeur, est de conserver les structures responsables de la continence et de l'érection. Dans cette optique, la préservation des faisceaux neuro-vasculaires peut être envisagée pour les CaP à risque faible (Rozet et al., 2016; Salomon et al., 2010).

- **Radiothérapie**

La radiothérapie constitue un traitement adjuvant à la prostatectomie mais peut également être un traitement alternatif. Il en existe deux types : la curiethérapie et la radiothérapie externe.

La curiethérapie, proposée aux patients présentant un CaP peu avancé, consiste à implanter des grains radioactifs d'iode¹²³ dans la prostate par voie périnéale de manière échoguidée. Cette technique permet de délivrer de plus grandes quantités de radioactivité à un endroit précis, ce qui diminue l'effet sur les organes voisins (Long et al., 2011).

La radiothérapie externe consiste en l'irradiation de la loge prostatique et des vésicules séminales. La dose minimale délivrée est de 70 grays en 35 séances. L'utilisation d'une technique conformationnelle tridimensionnelle notamment par tomodensitométrie permet de mieux définir le volume cible et de diminuer les effets sur les organes adjacents. De plus, la modulation de l'intensité d'irradiation a également permis de décroître la toxicité de cette technique (Long et al., 2011; Rozet et al., 2016).

- **Thérapies alternatives : cryothérapie et ultrasons**

La cryothérapie repose sur l'introduction par voie périnéale d'aiguilles de cryothérapie qui vont congeler à -40°C les tissus avoisinants. La chute brutale de la température et la formation de cristaux de glace entraînent une dénaturation protéique, la rupture des membranes cellulaires et un phénomène de micro-thromboses vasculaires. Cette technique, toujours en cours d'évaluation, pourrait être une alternative aux traitements de référence des CaP localisés lorsqu'il n'est pas possible de les mettre en place. Cependant, en 2015, les résultats d'une étude sur 4000 cryothérapies ont montré une survie sans récurrence à un an moins bonne qu'après chirurgie ou radiothérapie (Ramsay et al., 2015; Rozet et al., 2016).

Le traitement du CaP peut aussi faire appel aux ultrasons focalisés de haute intensité. Cette technique repose sur l'introduction endorectale d'une sonde qui émet des ultrasons focalisés vers la zone de la prostate à traiter. La chaleur du faisceau entraîne une brûlure qui permet la destruction des cellules de CaP. Cette alternative est proposée aux patients qui n'entrent pas dans le schéma thérapeutique classique avec prostatectomie et radiothérapie, lors de l'échec de cette première prise en charge ou encore aux hommes de plus de 70 ans dans le cadre d'une étude menée par l'Association Française d'Urologie (Rozet et al., 2016).

b. Cancers métastatiques hormono-naïfs

La prise en charge thérapeutique des formes métastatiques du CaP s'effectue par hormonothérapie. Ce sont les travaux de Huggins, en 1941, qui ont permis de démontrer la dépendance aux androgènes des cellules prostatiques et par conséquent le caractère hormono-dépendant du CaP (Huggins and Hodges, 1941). L'hormonothérapie a donc pour objectif d'induire une privation androgénique, diminuant le taux de testostérone circulant à moins de 50 ng/dL (Ziouziou et al., 2014).

Chez l'homme, les testicules sont la source principale de la production de testostérone. Ainsi, pour induire une privation androgénique, l'orchidectomie a longtemps été le traitement de choix des CaP évolués (Rebillard and Ruffion, 2005).

- **Agonistes et antagonistes de la LH-RH**

En 1971, la caractérisation de la structure de la LH-RH par Schally a permis le développement d'agonistes qui ont vite concurrencé la castration chirurgicale (Schally et al., 1971). L'utilisation de ces agonistes entraîne, dans un premier temps, une augmentation transitoire importante de la testostéronémie. Cet effet indésirable est qualifié de *Flare up*. Cependant, l'exposition prolongée permet de désensibiliser les récepteurs hypophysaires de la LH-RH grâce à la mise en place d'un rétrocontrôle négatif (Rozet et al., 2016). Les antagonistes de la LH-RH permettent quant à eux de bloquer directement les récepteurs de l'hypophyse. Ils induisent une privation androgénique rapide et ne sont associés à aucun effet *Flare up* (Wong et al., 2014).

- **Anti-androgènes**

Les agonistes et antagonistes de la LH-RH agissent sur la production androgénique testiculaire. Cependant, les précurseurs androgéniques d'origine surrénalienne soutiennent également la prolifération des cellules du CaP. Ainsi, l'approche thérapeutique combine le plus souvent ces composés à des anti-androgènes.

Les anti-androgènes constituent la première thérapie ciblée du CaP. Ils se lient au LBD du récepteur pour en inhiber l'activité. Il existe deux types d'anti-androgènes. Les premiers sont stéroïdiens, comme l'Acétate de Cyprotérone, et exercent un effet anti-androgénique et

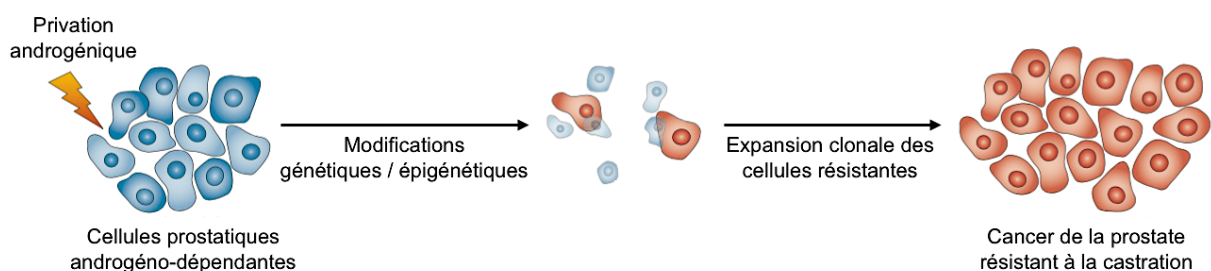
anti-gonadotrope. Ainsi, ils participent également au rétrocontrôle négatif de la production de LH. Les seconds sont les anti-androgènes non-stéroïdiens tels que le Flutamide, le Bicalutamide ou encore le Nitutamide. Ils sont plus sélectifs pour le RA (Chen et al., 2009; Salomon et al., 2010).

L'hypogonadisme associé à la privation androgénique induit de nombreux effets secondaires. Ainsi, les patients traités par castration médicale peuvent présenter des bouffées de chaleur, des troubles de l'humeur, une prise de poids, une fonte musculaire, un risque plus accru de fractures et d'ostéoporose dû à la perte de densité minérale osseuse, une baisse de la libido associée à des troubles érectiles ou encore une susceptibilité au diabète de type II (Grossmann et al., 2008; Smith, 2007; Ziouziou et al., 2014).

V. La résistance à la castration

Le traitement des CaP avancés et métastatiques par hormonothérapie entraîne tout d'abord une réponse thérapeutique positive. Cependant, les effets observés sont seulement transitoires et, après une période moyenne de 2 à 3 ans, les patients rechutent (Harris et al., 2009). La reprise évolutive biologique et clinique du cancer malgré la privation androgénique caractérise les CaP résistants à la castration (CRPC). Ce phénomène peut provenir de l'adaptation de cellules au traitement et de leur expansion clonale ou bien de la sélection des clones résistants déjà présents dans la tumeur primaire (Figure 32) (Zong and Goldstein, 2013).

A. Adaptation des cellules



B. Sélection des cellules

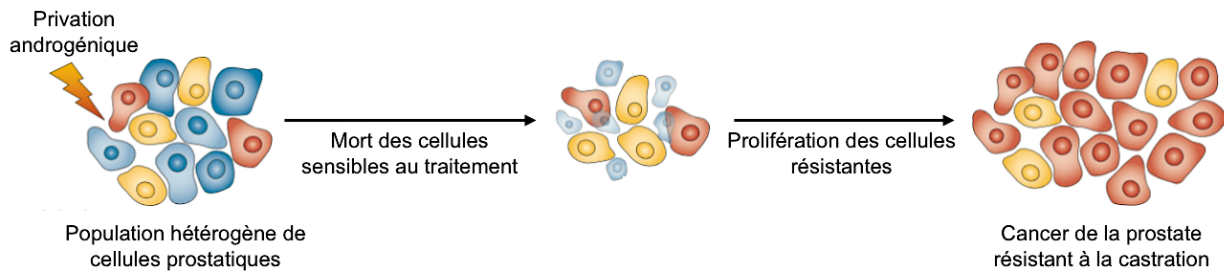


Figure 32 : Adaptation ou sélection des cellules en réponse à la privation androgénique.

A. Modèle d'adaptation des cellules : suite à la privation androgénique, les cellules peuvent subir des modifications génétiques permettant l'émergence de clones résistants. L'expansion de ces clones permet la formation du CRPC. **B.** Modèle de sélection : les cellules prostatiques constituent une population hétérogène dont les clones résistants sont sélectionnés par le traitement. Leur prolifération permet la formation du CRPC. (d'après Zong and Golstein, 2013)

1) Traitement

La prise en charge thérapeutique des CRPC s'effectue en ayant recours à l'hormonothérapie de seconde génération qui combine des inhibiteurs de la voie de biosynthèse des stéroïdes et des anti-androgènes.

a. Inhibiteurs de la voie de biosynthèse des stéroïdes

La surexpression des enzymes impliquées dans la synthèse des androgènes est un phénomène observé dans les tumeurs prostatiques. Cela permet aux cellules de CaP de produire des androgènes à partir des stocks intracellulaires de cholestérol ou des précurseurs surrénaliens. Cette observation a entraîné la mise sur le marché d'inhibiteurs de la voie de biosynthèse des stéroïdes comme l'Acétate d'Abiratérone. Cet analogue de la prégénolone est un inhibiteur sélectif et irréversible du cytochrome P450 17A1, enzyme clé de la synthèse de testostérone au niveau testiculaire, surrénalien et intratumoral. Cependant, l'effet inhibiteur de cette molécule s'accompagne d'une accumulation de minéralocorticoïdes. Pour pallier à ce problème, ce traitement est complété par la prise de corticoïdes comme la Prednisone (Ryan and Cheng, 2013; Wong et al., 2014). Les études COU-AA-301 et 302 ont mis en évidence un bénéfice significatif de l'Acétate d'Abiratérone sur la survie globale en présence de CRPC traités ou non par chimiothérapie (Fizazi et al., 2012; Ryan et al., 2015).

D'autres inhibiteurs de la voie de synthèse des stéroïdes ont été développés récemment, comme par exemple l'Orteronel, le Galeterone et le VT-464 qui sont également des inhibiteurs du cytochrome P450 17A1. Si les résultats des études de phase III concernant l'Orteronel semblent mitigés, une méta-analyse récente appuie son efficacité clinique (Roviello et al., 2017). Les résultats préliminaires de l'étude de phase I/II du VT-464 semblent quant à eux encourageants, avec une diminution significative du PSA sanguin (De Bono et al., 2015). Le Galeterone est un composé multi-actif qui présente, en plus de l'inhibition du cytochrome P450 17A1, la capacité d'augmenter la dégradation du RA et un effet anti-androgène y compris sur les formes tronquées au niveau carboxy-terminal. Une étude de phase II évalue en ce moment son efficacité clinique (Alex et al., 2016).

b. Anti-androgènes de deuxième génération

De nouveaux anti-androgènes ont été développés ces dernières années parmi lesquels l'Enzalutamide. De forte affinité pour le LBD du RA, il exerce son action inhibitrice en entrant en compétition avec les androgènes pour leur liaison au RA mais est aussi responsable de l'inhibition de la translocation nucléaire du récepteur activé, l'inhibition de la liaison à l'ADN ou encore du recrutement de cofacteurs (Keating, 2015). L'effet de l'Enzalutamide a été caractérisé comme positif sur la survie globale des patients ayant reçu une chimiothérapie par l'étude AFFIRM (Scher et al., 2012) mais aussi sur la survie sans progression et la survie globale de patients avant chimiothérapie dans l'étude PREVAIL (Beer et al., 2014).

D'autres anti-androgènes sont actuellement en cours de développement clinique. L'Apalutamide, dérivé de l'Enzalutamide, a été récemment approuvé dans le traitement du CRPC. Des essais cliniques supplémentaires sont actuellement en cours pour juger son efficacité en combinaison avec des antagonistes de la LH-RH, l'Acétate d'Abiratérone ou encore des inhibiteurs de mTOR. Le Darolutamide, un composé chimique de structure nouvelle, semble quant à lui prometteur car il présente une pénétration faible de la barrière hémato-encéphalique et est ainsi associé à moins d'effets secondaires. Enfin, pour pouvoir éviter les résistances dues à la perte du LBD par certaines formes du RA, des anti-androgènes ciblant la partie N-terminale, plus particulièrement le domaine Tau-5 de la fonction AF-1 ont été développés. Le composé le plus avancé est l'Acétate de Ralanitène, testé en essai clinique de phase I/II (Nevedomskaya et al., 2018).

c. Chimiothérapie

La chimiothérapie repose sur l'administration de composés chimiques perturbant la prolifération des cellules cancéreuses. Ces composés ne ciblent ni la synthèse ni la voie de signalisation des androgènes. Le Docetaxel est le traitement par chimiothérapie de référence du CRPC métastatique. Isolé à partir des aiguilles d'if, cet alcaloïde inhibe la dépolymérisation des microtubules, ce qui empêche la progression du cycle cellulaire. Cependant, un phénomène de résistance peut également s'instaurer. Dans ce cas, le recours au Cabazitaxel, un composé dérivé du Docetaxel et à l'action similaire, permet un bénéfice en survie globale. Ces données sont issues de l'étude TROPIC comparant l'efficacité du Cabazitaxel combiné à la Prédnisone avec celle d'un autre agent de chimiothérapie, le Mitoxantrone. Le Cabazitaxel représente aujourd'hui le traitement de seconde ligne de référence lors d'un échec de la thérapie par administration de Docetaxel (Rozet et al., 2016; Tannock et al., 2004).

d. Immunothérapie

Le Sipuleucel-T est une immunothérapie cellulaire active. Le patient subit tout d'abord 3 prélèvements de cellules sanguines circulantes de manière à récupérer les cellules immunitaires présentatrices de l'antigène. Ces cellules sont cultivées et activées *in vitro* par la protéine de fusion PA2024, un antigène issu de la phosphatase acide prostatique, avant d'être réadministrées par perfusion au patient. L'étude de phase III IMPACT a montré en 2010 un bénéfice de cette thérapie sur la survie globale par rapport au placebo. Cependant, le gain est limité et estimé à 4,1 mois pour les malades traités préalablement ou non par chimiothérapie (Kantoff et al., 2010). Ainsi, cette thérapie n'est pour l'instant pas disponible en Europe.

D'autres immunothérapies sont actuellement en cours de développement. Elles reposent sur l'utilisation d'anticorps anti-CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) ou anti-PD1 (*Programmed cell death 1*) (Rozet et al., 2016).

2) Mécanismes de résistance

Malgré l'amélioration de la survie globale des patients présentant un CRPC métastatique, la privation androgénique n'est pas vraiment un traitement curatif puisque seulement 5 à 10% survivent plus de 10 ans après le début du traitement (Harris et al., 2009; Tangen et al., 2003). La reprise évolutive du CaP témoigne de la présence de clones cellulaires capables de survivre et proliférer lorsqu'ils sont privés d'androgènes. Les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène de résistance sont multiples et peuvent reposer sur des adaptations RA-dépendantes ou RA-indépendantes.

a. Modifications dépendantes du récepteur des androgènes

L'augmentation du taux de PSA sanguin qui accompagne la reprise tumorale appuie l'implication de la voie du RA dans ce phénomène de résistance. Les mécanismes RA-dépendants sont multiples et regroupent par exemple la surexpression du RA ou de ses cofacteurs, son activation inappropriée par des facteurs de croissance ou des cytokines, l'augmentation de la synthèse androgénique ou encore la présence de formes mutées du RA.

- **Amplification génique et surexpression du récepteur**

L'un des premiers mécanismes de résistance à l'hormonothérapie à avoir été décrit est l'amplification du RA. Elle survient à cause d'altérations du locus Xq11-12 menant à l'augmentation du nombre de copies du gène. Ce phénomène est décrit dans 20 à 30% des tumeurs résistantes à la castration (Linja et al., 2001). Des études sur des échantillons de tumeurs primaires et de tumeurs récurrentes issues des mêmes patients ont permis de mieux caractériser cette aberration génétique et de corrélérer sa survenue lors de la transition du stade hormono-naïf au stade hormono-résistant (Bubendorf et al., 1999a). Cette amplification se traduit par une surexpression protéique du RA, ce qui le rend plus sensible au faible taux d'androgènes résiduels.

L'augmentation du pool protéique du RA peut aussi être due à une traduction plus efficace de son ARN messager. La ribonucléoprotéine MID1 (*E3 ubiquitin protein-ligase Midline 1*) pourrait être impliquée dans ce processus. Elle reconnaît les ARN messagers cibles et s'associe avec la sous-unité $\alpha 4$ de la phosphatase PP2A. MID1 recrute des régulateurs de la traduction comme S6K (*40S ribosomal S6 kinase*) et inhibe l'activité de PP2A tout en

favorisant celle de mTOR. Ce dernier peut activer S6K par phosphorylation. S6K phosphoryle à son tour le facteur eIF4B (*eukaryotic translation initiation factor 4B*) et la protéine ribosomique S6, ce qui entraîne la linéarisation de l'ARN messager, favorise le recrutement des ribosomes et par conséquent l'initiation de la traduction (Figure 33). Il a récemment été montré que MID1 s'associe avec l'ARN messager du RA au niveau des régions répétées du NTD. En conditions physiologiques, l'expression de MID1 est restreinte au compartiment stromal tandis que dans le CaP, MID1 se retrouve au niveau de l'épithélium prostatique et des métastases. De plus, son intensité est corrélée à l'avancée du cancer. Cette surexpression peut s'expliquer par le faible taux d'androgènes lors du traitement, réprimant ainsi le contrôle négatif exercé par le RA sur l'expression de MID1 (Köhler et al., 2014; Nalavade et al., 2013).



Figure 33 : Implication de MID1 dans la traduction des ARN messagers.

MID1 reconnaît les ARN messagers qui possèdent des régions répétées CAG. Il permet le recrutement de PP2A par le biais de sa sous-unité $\alpha 4$ et du régulateur de la traduction S6K. MID1 inhibe la sous-unité catalytique PP2Ac et active mTOR qui phosphoryle alors à son tour S6K, stimulant ainsi la traduction de l'ARN messager. (d'après de Nalavade et al., 2013)

Les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la cancérogenèse. En effet, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) permettent l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale, la promotion de l'angiogenèse et l'échappement des cellules cancéreuses de la sénescence (Lu et al., 2017; Di Mitri et al., 2014; Murdoch et al., 2008). Un enrichissement important de ces cellules est observé au sein des CRPC par comparaison aux tumeurs hormono-naïves (Calcinotto et al., 2018; Mehra et al., 2016). Une étude récente a permis de mettre en évidence l'action paracrine de l'interleukine-23 sécrétée par les MDSC sur les cellules de CaP. Celle-ci se traduit par l'activation de la voie STAT3 / ROR γ (*Retinoic acid receptor (RAR)-related orphan receptor γ*), ce qui entraîne la transcription accrue du gène du RA et permet ainsi d'augmenter le pool protéique du récepteur (Calcinotto et al., 2018).

Enfin, la demi-vie de la protéine peut également être modifiée, notamment par la diminution de sa dégradation. Ce mécanisme est mis en place lorsque le facteur SPOP (*Speckle-type POZ (pox virus and zinc finger protein) protein*) est muté. Il s'agit d'un adaptateur d'ubiquitine-ligases E3 comme le complexe culline 3-RBX1 (*Ring box 1*) capable de cibler le RA pour l'adresser au protéasome. Ce gène apparaît muté dans 15% des CaP dans lesquels SPOP n'est plus capable d'interagir et donc de polyubiquitinyler le RA (Figure 34) (Barbieri et al., 2012; Mani, 2014). Cependant, il n'y a pas d'enrichissement de cette mutation au sein des CRPC ce qui pose réellement la question de l'implication de ce mécanisme dans la résistance à l'hormonothérapie (Grasso et al., 2012; Mani, 2014). De plus, la surexpression de la protéine chaperonne HSP-27 pourrait être impliquée dans la stabilité protéique accrue du RA. En effet, HSP-27 protège le récepteur de la dégradation par le protéasome. Sa surexpression est fréquente et intervient dans 30% des CRPC (Bubendorf et al., 1999b; Wadosky and Koochekpour, 2016).

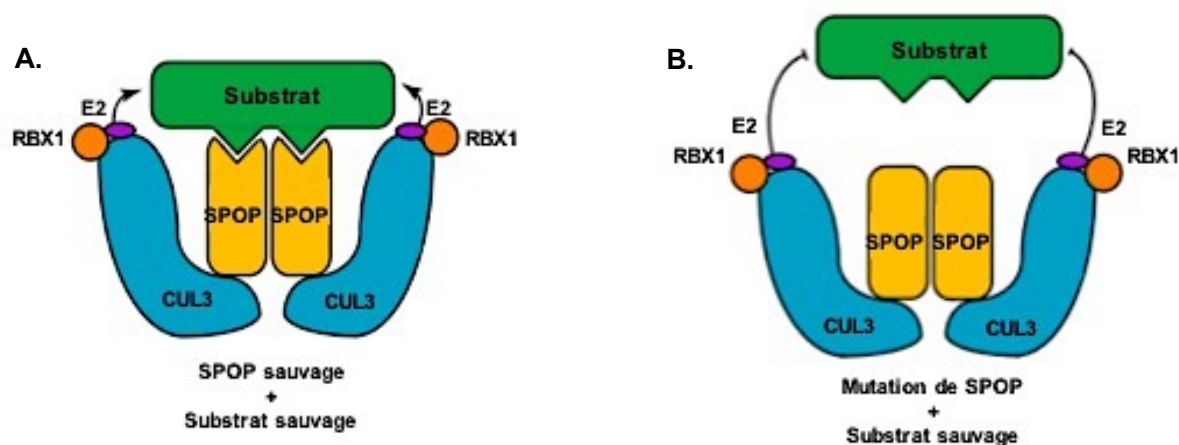


Figure 34 : Implication de la mutation de SPOP dans le cancer de la prostate.

A. En conditions physiologiques, SPOP reconnaît un substrat comme le RA et permet sa polyubiquitinylation par le complexe E2-culline 3 (CUL3)-Ring box1 (RBX1) qui entraîne sa dégradation par le protéasome. **B.** Les formes mutées de SPOP ne reconnaissent plus leurs substrats, leur permettant ainsi d'échapper à la dégradation. (d'après Mani, 2014)

- **Surexpression de cofacteurs**

L'activité du RA dépend de son interaction avec de nombreux cofacteurs. La surexpression des acteurs de la famille p160 est un phénomène fréquemment observé dans le CaP. En effet, l'analyse de biopsies a permis de mettre en évidence la surexpression de SRC-1 et SRC-2 dans les tumeurs résistantes à la castration par rapport aux tumeurs hormono-naïves (Gregory et al., 2001). La surexpression de SRC-3 a également été reportée et corrélée avec l'évolution tumorale (Gnanapragasam et al., 2001; Zhou et al., 2005). De plus, le facteur ARA55 (*Androgen receptor-associated protein 55*) est surexprimé dans les échantillons de CaP par comparaison aux tissus non-tumoraux et cette surexpression est corrélée à une diminution de la survie des patients (Mestayer et al., 2003; Miyoshi et al., 2003). Ce cofacteur interagit avec le RA et augmente son activité transcriptionnelle. Ainsi, l'augmentation de la quantité protéique de ces co-activateurs permet d'accroître l'activité transcriptionnelle du RA même en présence d'une faible concentration d'androgènes.

- **Activation aberrante du récepteur des androgènes**

L'état de phosphorylation du RA est altéré dans les CRPC (Karantanos et al., 2013). Or, il est décrit que la phosphorylation du RA, qu'il soit activé ou non par son ligand, le protège de la dégradation et augmente sa translocation nucléaire ainsi que son activité transcriptionnelle (Bennett et al., 2010). Ainsi, l'activation aberrante du RA pourrait se produire par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine-kinases. La surexpression de récepteurs membranaires dans les CRPC est en accord avec cette hypothèse. En effet, l'EGFR est exprimé dans près de 20% des tumeurs prostatiques de manière corrélée avec le grade tumoral et se retrouvent dans 100% des métastases de CRPC (Schlomm et al., 2007). Lorsqu'il est activé, l'EGFR déclenche une cascade de signalisation qui entraîne la phosphorylation du co-activateur SRC-2 mais aussi du RA lui-même par l'intermédiaire de la kinase Src. Ces deux mécanismes permettent d'augmenter l'activité transcriptionnelle du RA en absence d'androgènes (Gregory et al., 2004; Guo et al., 2006).

De même, la surexpression du récepteur HER-2 est associée à la progression tumorale avec 25% des CaP avant traitement hormonal surexprimant HER-2 contre 58% de ceux soumis à une castration médicale et 77% des CRPC (Signoretti et al., 2000). L'activation du récepteur par son ligand favorise le recrutement du RA au niveau de l'ADN et son activité transcriptionnelle (Liu et al., 2005). La kinase ACK1 qui phosphoryle le RA a été décrite comme un acteur essentiel de ce mécanisme d'activation (Gregory et al., 2005; Mahajan et al., 2007).

La tyrosine-kinase ETK (*Epithelial and endothelial tyrosine kinase*) est également surexprimée en réponse à la privation androgénique. Son niveau d'expression est associé à la progression tumorale et à la phosphorylation du RA sur le résidu Y535. De plus, l'interaction de ETK avec le RA empêche sa reconnaissance par MDM2, enzyme E3 impliquée dans l'ubiquitinylation du récepteur en vue de sa dégradation par le protéasome (Dai et al., 2010).

Lors de la privation androgénique, la progression tumorale peut aussi s'accompagner d'une augmentation des cellules à différenciation neuroendocrine. Ces cellules sécrètent des facteurs solubles comme le peptide de libération de la gastrine, la neurotensine, la sérotonine ou encore les interleukines 6 et 8 (Amorino and Parsons, 2004; Hirano et al., 2004; Reubi et al., 2002). Ces facteurs sont capables d'initier une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation du RA par les kinases Src ou ETK (Hobisch et al., 1998; Lee et al., 2001, 2004). Ils pourraient ainsi exercer une action paracrine pour soutenir la prolifération tumorale dans un contexte androgéno-indépendant (Moore et al., 1999; Sehgal et al., 1994).

De nombreuses adaptations à la castration reposent sur le RA lui-même. Ainsi, le récepteur est la cible de mutations gain de fonctions qui permettent d'augmenter la sensibilité du RA aux androgènes ou d'entraîner son activation par d'autres ligands. Des variants ayant perdu le LBD présentent également une activité constitutive. Un chapitre sera consacré pleinement à ce sujet.

- **Modification de la biosynthèse des androgènes**

La prise en charge des patients atteints d'un CRPC par hormonothérapie entraîne une chute de la testostéronémie. Cependant, le taux de testostérone dans le sang n'est pas corrélé à celui mesuré au sein de la tumeur qui reste quant à lui élevé (Mostaghel et al., 2011). Cette observation traduit la capacité des cellules de CaP à synthétiser des androgènes par le biais de modifications de la machinerie enzymatique. Ainsi, la surexpression de l'isoforme AKR1C3 (*Aldo-keto reductase family 1 member C3*) de 17 β HSD, enzyme responsable de la conversion d'androstènedione en testostérone est observée dans les biopsies de CRPC (Miller and Auchus, 2011; Montgomery et al., 2008; Stanbrough et al., 2006). La surexpression de la 5- α -réductase qui convertit la testostérone en DHT est également un phénomène décrit au sein des tumeurs prostatiques (Fankhauser et al., 2014; Locke et al., 2008). Cependant, d'autres études rapportent plutôt une diminution de l'expression de l'isoforme SDR5A2 (*Steroid 5- α -reductase 2*), suggérant que la production de testostérone serait plus importante que celle de DHT (Armandari et al., 2014; Mohler et al., 2004; Montgomery et al., 2008).

La production intratumorale d'androgènes repose sur la voie canonique, qui produit la testostérone à partir des précurseurs surrénaliens ou des stocks internes de cholestérol mais peut aussi provenir de la mise en place de mécanismes détournés. En effet, les cellules de CaP semblent avoir la capacité de produire de l'androstènedione à partir de progestérone. L'androstènedione est ensuite transformé en DHT par l'intermédiaire de 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol (Stuchbery et al., 2017). Le cytochrome P450 17A1 est l'acteur clé de cette biosynthèse détournée. Son expression semble fortement augmentée dans les métastases de patients soumis à la castration médicale (Montgomery et al., 2008) bien que cette observation soit débattue par la communauté scientifique (Hofland et al., 2010; Sakai et al., 2016).

La voie dite « 5α -dione » permet également la biosynthèse *de novo* de DHT au niveau de la tumeur mais cette fois sans la nécessité de testostérone comme substrat. Elle repose sur la réduction de l'androstènedione en 5α -androstanedione qui est à son tour réduit en DHT (Stuchbery et al., 2017). Peu de données sont aujourd'hui disponibles sur cette voie décrite pour la première fois en 2011 (Chang et al., 2011).

Enfin, les cellules de CaP présentent également des adaptations leur permettant de tirer profit des faibles taux de précurseurs surrénaliens tels que le DHEA et sa forme sulfatée (DHEA-S). En effet, la surexpression du transporteur OATP1A2 (*Organic anion transporting polypeptide 1A2*) a été observée dans des modèles de cellules prostatiques cancéreuses soumises à une privation androgénique (Arakawa et al., 2012). Cette protéine facilite le transport membranaire du DHEA et du DHEA-S, ce qui suggère la promotion de l'influx de précurseurs androgéniques dans les cellules tumorales pour permettre la synthèse de testostérone et de DHT (Labrie et al., 2001; Tamae et al., 2015).

b. Modifications indépendantes du récepteur des androgènes

Si la plupart des mécanismes décrits dans l'échappement à l'hormonothérapie impliquent la voie de signalisation du RA, d'autres en sont indépendants. Ils reposent notamment sur d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur des glucocorticoïdes (RG), sur l'activation des voies de prolifération, l'inhibition de l'apoptose, la différenciation neuroendocrine des cellules ou encore la contribution des cellules immunitaires.

- ***Bypass du récepteur des androgènes par le récepteur des glucocorticoïdes***

L'utilisation d'anti-androgènes de seconde génération comme l'Enzalutamide ou l'Apalutamide restaure l'inhibition du RA et permet d'augmenter la survie des patients atteints de CRPC. Cependant, cet effet n'est que transitoire et un nouveau mécanisme de résistance est rapidement mis en place. Des travaux basés sur l'étude de xénogreffes sur des souris traitées avec des anti-androgènes ont permis de mettre en évidence une surexpression significative du gène *NR3C1* (*Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*) codant pour le RG. Dans ce modèle, l'inhibition du RG est suffisante pour lever la résistance à l'Enzalutamide (Arora et al., 2013). De plus, la surexpression du RG a été mise en évidence dans des biopsies localisées et des métastases osseuses de patients soumis à une privation androgénique (Arora et al., 2013; Yemelyanov et al., 2012). Ainsi, l'hypothèse d'un mécanisme selon lequel le RG pourrait remplacer le RA au sein des cellules tumorales a été formulée. En effet, les deux récepteurs partagent non seulement une structure très proche mais également un transcriptome partiellement commun dû à la reconnaissance des mêmes éléments de réponse. Ainsi, le RG est capable d'induire l'expression de certains gènes RA-dépendants (Arora et al., 2013; Sahu et al., 2013). De plus, le RG est également impliqué dans l'activation de la prolifération et la survie des cellules tumorales (Isikbay et al., 2014; Puhr et al., 2018). Toutes ces données appuient l'implication du RG dans la résistance au traitement et la progression tumorale.

- ***Activation des voies prolifératives et anti-apoptotiques***

De nombreuses modifications génétiques permettent de favoriser la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses. Ainsi, la surexpression de l'EGFR ou de ses ligands comme l'EGF ou le TGF- β est corrélée au stade tumoral. En plus de son action sur l'activation du RA, elle permet également de favoriser la prolifération, la survie et la motilité cellulaire par l'intermédiaire des voies PI3K/AKT, MAP kinases ou encore NF κ B (Scher et al., 1995; Traish and Morgentaler, 2009). De la même manière, la surexpression de la cycline D1 impliquée dans le cycle cellulaire a été décrite dans les stades avancés de CaP et associée à un mauvais pronostic (Pereira et al., 2014). Enfin, l'oncogène *c-myc*, impliqué dans la prolifération cellulaire, peut être la cible d'une amplification génique permettant sa surexpression au sein des tumeurs prostatiques. Cette surexpression est plus fréquente lors d'un traitement par hormonothérapie (Bernard and Pourtier-Manzanedo, 2003; Kaltz-wittmer et al., 2000).

La surexpression de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 ou la clusterine est aussi associée à la résistance à la castration (Katsogiannou et al., 2015). De plus, la protéine chaperonne HSP-27, surexprimée dans 30% des CRPC, permet de protéger le RA de la dégradation mais elle peut aussi inhiber l'apoptose induite par la privation androgénique. Ce mécanisme semble reposer sur l'interaction avec le facteur TCTP (*Translationally controlled tumor protein*), connu pour entraîner une diminution de p53 (Baylot et al., 2012; Rocchi et al., 2004). Pour finir, la répression de suppresseurs de tumeur comme PTEN, p53 ou RB1 (*Retinoblastoma 1*) est aussi décrite dans les CRPC (Kaltz-wittmer et al., 2000; Katsogiannou et al., 2015).

- **Différenciation neuroendocrine**

Si les cellules neuroendocrines constituent une population mineure dans la prostate saine, un profil de différenciation neuroendocrine est fréquemment observé au sein des CRPC, bien que ce ne soit pas le cas lors du diagnostic initial (Matei et al., 2012). L'émergence de ces cellules se produit lors de la privation androgénique par sélection de la population initiale par le traitement ou transdifférenciation des cellules prostatiques cancéreuses qui acquièrent des caractéristiques neuroendocrines. Leur caractère androgéno-indépendant contribue à la résistance à la privation androgénique (Nouri et al., 2014; Terry and Beltran, 2014).

3) Variants du récepteur des androgènes

La résistance à la castration peut également s'expliquer par la présence de formes mutées du RA. En effet, de nombreuses mutations gain de fonction entraînent l'augmentation de sa sensibilité aux androgènes, son activation par d'autres ligands ou encore une activité constitutive. Si ces mutations sont rares dans les tumeurs primaires, leur fréquence augmente dans les CRPC et atteint jusqu'à 20% voire 40% chez les patients traités à l'aide d'anti-androgènes (Grasso et al., 2012; Robinson et al., 2015). Plus de 160 mutations du RA sont aujourd'hui recensées dans le CaP, (Gottlieb et al., 2012).

a. Mutations faux-sens et insertions

La plupart des mutations du RA sont des substitutions dues à des mutations somatiques plutôt que germinales (Gottlieb et al., 2012). Un tiers de ces mutations survient au niveau du NTD. Elles pourraient permettre de moduler les capacités de transactivation du récepteur et son interaction avec des cofacteurs. Ainsi, les mutations G144V et D223H identifiées dans les CRPC procurent au RA des capacités de transactivation plus importantes que celles du RA sauvage en présence de faible dose de DHT (Chen et al., 2005). Cependant, les données de séquençage haut-débit ont mis en évidence une fréquence faible de survenue des mutations ciblant le NTD (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

Peu de mutations faux-sens sont aujourd'hui décrites dans le DBD. En raison de leur localisation, elles pourraient avoir un impact sur la liaison à l'ADN, la dimérisation du récepteur ou encore le recrutement de co-régulateurs. La mutation T576A a été isolée chez un patient atteint d'un CRPC en combinaison ou non avec la substitution T878A (Marcelli et al., 2000; Monge et al., 2006). Elle se situe dans le premier doigt de zinc du DBD, juste en amont de la P-box. L'étude transcriptionnelle de cette mutation a permis de mettre en évidence une différence de reconnaissance de l'ADN par rapport au RA sauvage. En effet, elle confère au RA une activité transcriptionnelle renforcée sur des promoteurs contenant des éléments de réponse non spécifiques des androgènes également reconnus par le RG (Monge et al., 2006).

La région charnière et le LBD concentrent la majorité des mutations du RA. Elles sont responsables d'une hypersensibilité du récepteur aux androgènes ou de son activation par d'autres ligands. Les mutations L702H, N706D, Q712R, Q739R, W742C, M750V et T787A sont situées dans la poche de liaison du ligand. La substitution L702H, mise en évidence chez des patients traités avec de l'Abiratérone et de la Prednisone, permet l'activation du RA par le cortisol et la cortisone (Attard et al., 2012; Carreira et al., 2014; Robinson et al., 2015; Zhao et al., 2000). La mutation W42C entraîne l'activation du récepteur par le Bicalutamide, antagoniste utilisé pour le traitement du CaP (Hara et al., 2003). En présence des substitutions H875Y et T878A, l'activation du RA est favorisée par les précurseurs androgéniques surrénaliens, la progestérone, l'œstradiol ou encore le Flutamide (Tan et al., 1997; Veldscholte et al., 1990). Ces 4 substitutions représentent les mutations ponctuelles majeures du RA et se retrouvent dans 15 à 20% des CRPC (Wadosky and Koochekpour, 2016; Watson et al., 2015).

Les mutations intervenant dans la région charnière et le LBD peuvent également modifier le recrutement de partenaires protéiques. Ainsi, les substitutions A645T et T649N se situent dans le motif d'interaction avec le facteur SPOP. Ce dernier ne reconnaît plus le RA,

ne pouvant donc plus diriger sa polyubiquitinylation. Cela permet au récepteur d'échapper à la dégradation par le protéasome (Barbieri et al., 2012; Mani, 2014). De plus, les mutations E873Q et M887I augmentent l'activité transcriptionnelle du récepteur en présence de DHT lorsque des co-activateurs comme SRC-2 ou CBP sont surexprimés (Chen et al., 2005).

Certaines formes mutées du RA ne proviennent pas de mutations faux-sens. C'est le cas du RA23 présentant une insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc du DBD. L'épissage alternatif est à l'origine de cette insertion. Identifié dans des métastases osseuses de CRPC, ce variant voit ses propriétés de translocation altérées. En effet, même en présence de DHT, la localisation du RA23 est cytoplasmique (Jagla et al., 2007). Cependant, ce variant favorise l'activité transcriptionnelle du RA sauvage lorsqu'ils sont co-exprimés et module son inhibition par les anti-androgènes comme le Flutamide ou le Bicalutamide (Steinkamp et al., 2009). De plus, il est également capable d'activer le facteur NF κ B et de diminuer l'activité de AP-1 (*Activator protein 1*) (Jagla et al., 2007). Ainsi, l'activité de ce variant reposerait sur ces fonctions non-génomiques.

b. Perte du domaine de liaison au ligand

La présence de variants constitutifs du RA est également un des mécanismes de l'échappement hormonal. Ces variants sont dépourvus du domaine carboxy-terminal et de ce fait, leur activation n'est plus contrôlée par la liaison du ligand. Le clivage du RA sauvage par la calpaïne 2, l'épissage alternatif ou encore la survenue de mutations non-sens peuvent être à l'origine de ces variants constitutifs.

- **Protéolyse par la calpaïne 2**

La calpaïne 2 est une protéase dépendante du calcium. Son expression est augmentée avec la progression tumorale (Rios-Doria et al., 2003). Le RA a été décrit comme un substrat de cette enzyme qui produit ainsi un récepteur dépourvu du LBD et présentant une activité constitutive. En effet, le traitement de cellules prostatiques cancéreuses avec de la calpaïne 2 résulte en la diminution de l'expression du récepteur endogène entier et l'augmentation de formes tronquées (Libertini et al., 2007). La protéolyse du RA par cette enzyme passe par un mécanisme dépendant de la kinase ERK (Chen et al., 2010).

- **Mutations non-sens**

Les variants constitutifs peuvent provenir de mutations non-sens. Localisées au niveau de l'exon 4, ces mutations donnent naissance à des codons STOP prématurés, entraînant ainsi la perte de la partie carboxy-terminale du récepteur (Figure 35). Ce mécanisme a été décrit pour la première fois en 2004 avec la découverte du RA-Q641X dans les métastases osseuses de patients atteints d'un CRPC (Céraline et al., 2004; Lapouge et al., 2007; Marcias et al., 2010).

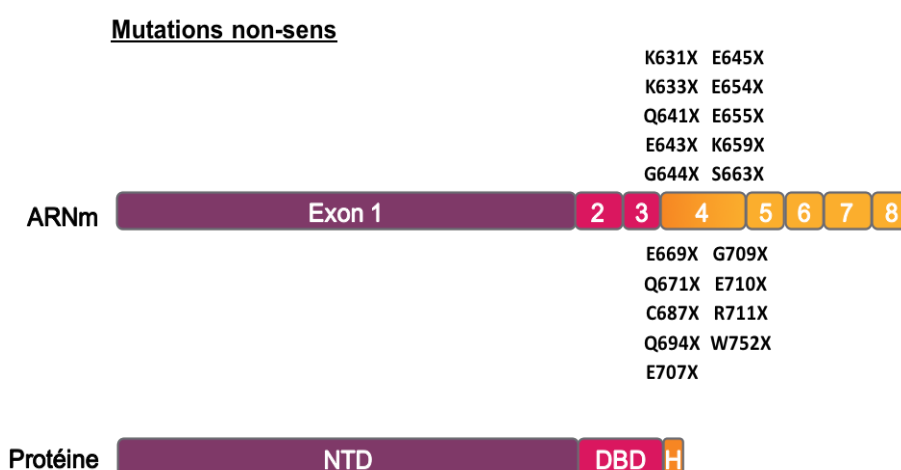


Figure 35 : Variants du récepteur des androgènes issus de mutations non-sens.

Les mutations ponctuelles aboutissant à l'expression de variants constitutifs du RA se localisent au niveau de l'exon 4.

- **Épissages alternatifs**

La transcription inverse suivie de l'amplification des ADN complémentaires de cellules prostatiques cancéreuses a permis la découverte de transcrits courts comportant les exons 1, 2 et 3 du RA puis une nouvelle séquence nucléotidique jusqu'alors inconnue. Ces transcrits codent des formes tronquées du RA dépourvues du LBD. Ils sont issus de l'épissage alternatif de l'ARNm immature du récepteur avec, pour la plupart, la rétention d'un exon cryptique (Dehm et al., 2008). Aujourd'hui, plus de 20 variants d'épissage sont recensés. Si la perte du LBD n'est pas une caractéristique commune à tous ces variants, elle intervient de manière significative pour la plupart d'entre eux, leur conférant une activité constitutive (Figure 36) (Cao et al., 2016).

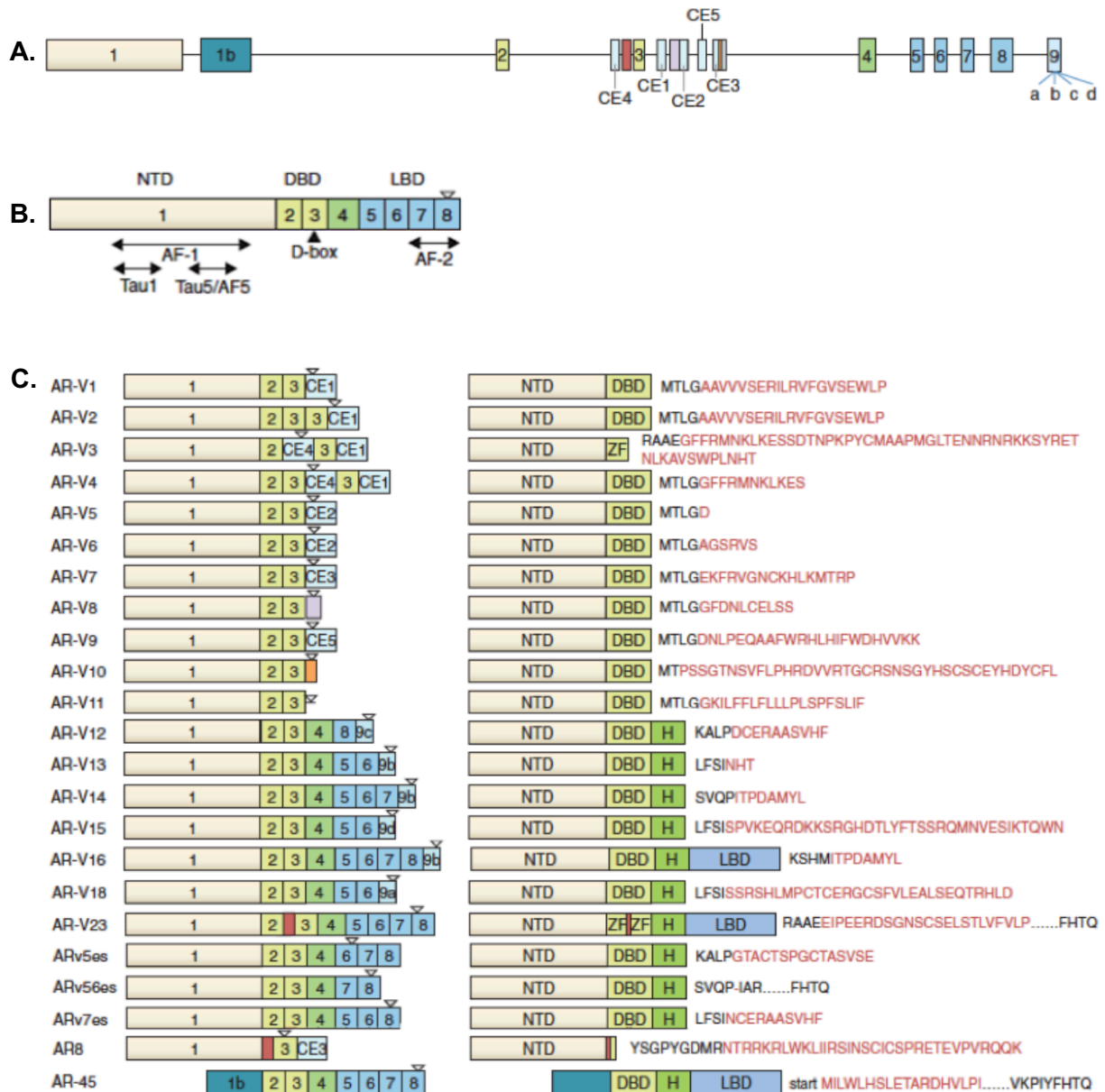


Figure 36 : Structure des variants d'épissage du récepteur des androgènes.

A. Représentation du gène du RA contenant des exons canoniques et des exons cryptiques (CE). L'exon 9 contient 4 sites cryptiques d'épissage; les exons cryptiques correspondant sont appelés 9a, 9b, 9c et 9d. **B.** Représentation de l'ARNm du RA et des domaines protéiques codés par les exons. **C.** Représentation des transcrits et des protéines des variants d'épissage du RA. Les séquences spécifiques sont inscrites en rouge. Les flèches indiquent les codons STOP. (d'après Cao et al., 2016)

De nombreux mécanismes semblent réguler l'épissage alternatif de ces variants. Ainsi, dans un modèle cellulaire résistant à l'Enzalutamide, la surexpression du RA-V7 est associée à celle de hnRNPA1 (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*), facteur recruté au niveau des ARN messagers du RA-V7 et du RA-V3 mais pas des transcripts du RA entier. Ces observations suggèrent l'implication de hnRNPA1 dans la génération de ces variants (Nadiminty et al., 2015). Dans d'autres modèles cellulaires, les facteurs U2AF65 (*U2 snRNP auxiliary factor 65-kDa subunit*) et ASF/SF2 (*Alternative splicing factor / pre-mRNA-splicing factor 2*) ont également été impliqués dans l'épissage du RA-V7 (Liu et al., 2014). La protéine chaperonne HSP-90 pourrait aussi jouer un rôle important. En effet, son inhibition entraîne la diminution de l'expression du RA-V7 et la perturbation du complexe d'épissage (Ferraldeschi et al., 2016). Enfin, lors d'une privation androgénique, l'ARN non-codant PCGEM1 (*Prostate cancer gene expression marker 1*) est redistribué au sein du noyau et s'associe avec U2AF65 pour promouvoir l'épissage du RA-V7 (Zhang et al., 2016). Les mécanismes gouvernant l'épissage alternatif des variants du RA pourraient donc être multiples et dépendre du contexte cellulaire.

Le variant d'épissage le plus étudié est le RA-V7. Son transcrit regroupe les exons 1, 2 et 3 ainsi qu'une séquence dérivée de l'exon cryptique 3 aboutissant à l'insertion de 16 acides aminés à la fin du DBD. Il existe une coopération étroite entre le RA-V7 et les formes longues du RA. En effet, si le variant peut s'homodimériser pour exercer ses fonctions transcriptionnelles, il peut aussi s'hétérodimériser avec d'autres variants ou avec le RA entier (Xu et al., 2015). Ce processus permet la translocation nucléaire des formes longues même en absence de ligand (Cao et al., 2014).

L'expression du RA-V7 dans les tumeurs hormono-naïves est associée à un risque accru de récurrence après prostatectomie et une progression plus rapide vers l'échappement hormonal (Guo et al., 2009; Qu et al., 2015). En effet, le RA-V7 a été identifié dans les résistances à l'Acétate d'Abiratéron et l'Enzalutamide lors d'études précliniques (Mostaghel et al., 2011; Yamamoto et al., 2015). De plus, l'étude de biopsies de métastases de CRPC a permis de corréliser sa présence avec la résistance primaire à l'Enzalutamide (Efsthathiou et al., 2015). Ainsi, il a été suggéré d'en faire un marqueur de la progression tumorale et de la résistance au traitement. Bien que la communauté scientifique soit divisée à ce sujet, la plupart des études confirment sa valeur pronostique en recherchant sa présence dans les cellules tumorales circulantes ou les exosomes (Figure 37) (Antonarakis et al., 2014; Del Re et al., 2017).

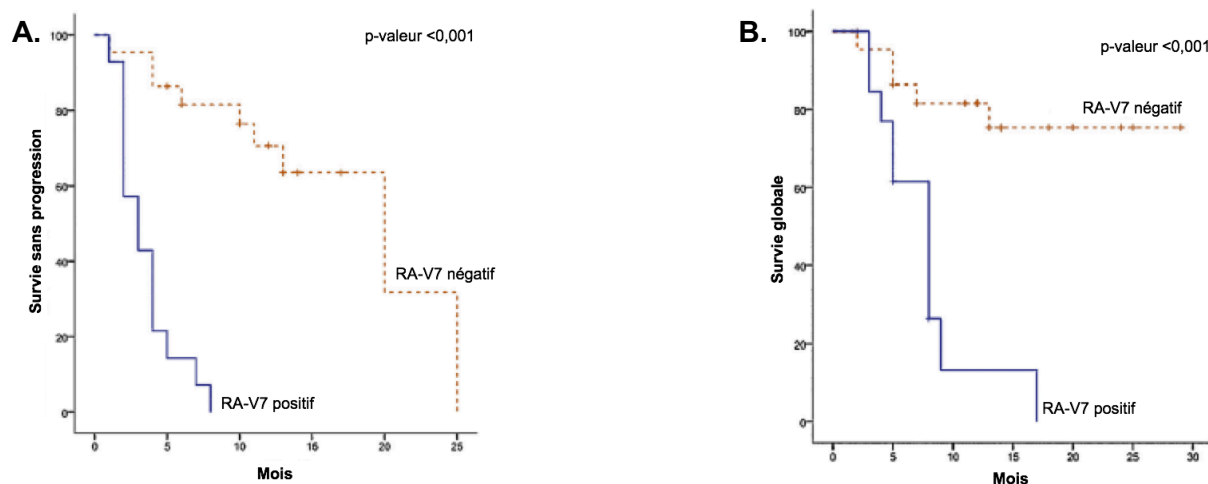


Figure 37 : Détection du RA-V7 dans les exosomes et survie des patients.

A. La présence du RA-V7 est associée à une diminution drastique de la survie sans progression des patients atteints d'un CaP métastatique et pris en charge par hormonothérapie. **B.** La survie globale diminue également de manière significative lorsque le RA-V7 est détecté. (d'après Del Re et al., 2017)

Les variants du RA constituent un mécanisme de résistance à la castration important, permettant à la signalisation du récepteur de s'affranchir de la présence d'androgènes. Cependant, ils sont aussi associés à la progression tumorale (Cottard et al., 2013; Kong et al., 2015; Sun et al., 2014), ce qui suggère un impact crucial de l'expression des variants constitutifs au sein des tumeurs prostatiques et témoignent de l'importance du développement de nouvelles thérapies permettant de contrecarrer leur action.

PARTIE 1 :
Fonctions génomiques des
variants RA-Q641X et RA-V7

I. Objectifs de recherche

Le traitement du CaP métastatique grâce à son caractère hormono-dépendant a été illustré au cours de l'introduction bibliographique. Ainsi, le RA reste la cible principale des thérapies actuelles. Cependant, les effets sont transitoires et la maladie progresse inéluctablement vers un stade de résistance à la castration. Si les mécanismes à l'origine des CRPC sont multiples, la plupart implique des altérations de la voie de signalisation du RA telles que l'expression de variants constitutivement actifs.

Les variants constitutifs du RA, dont le plus étudié est le RA-V7, contribuent également à la progression tumorale. En effet, ils induisent l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, SNAIL ou encore ZEB1 (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*) par les cellules de CaP, permettant la mise en place d'une transition épithélio-mésenchymateuse partielle (Cottard et al., 2013; Kong et al., 2015). Ils sont également associés à l'augmentation de TWIST dans un modèle murin (Sun et al., 2014). De plus, ils favorisent la migration cellulaire et la formation de sphéroïdes et semblent être à l'origine d'un switch métabolique en faveur de la glutaminolyse qui permettrait la croissance des cellules dans un environnement dépourvu d'oxygène (Shafi et al., 2015; Sun et al., 2014). Ces données suggèrent que les variants constitutifs, s'ils sont capables de mimer le récepteur sauvage, confèrent également un gain de fonction aux cellules de CaP permis par l'induction d'un panel de gènes distinct de celui du RA sauvage. Cependant, peu de données sont aujourd'hui disponibles en ce qui concerne l'activité transcriptionnelle de ces variants.

Ce travail de thèse a pour objectif de mieux caractériser les fonctions génomiques des variants RA-Q641X et RA-V7 et s'articule en deux volets. Le premier repose sur la régulation de la N-cadhérine, un marqueur mésenchymateux exprimé uniquement en présence des variants constitutifs. Dans un second temps, l'activité transcriptionnelle de ces formes du RA a été étudiée de façon plus globale, de manière à appréhender l'ensemble du transcriptome qu'ils induisent dans les cellules cancéreuses prostatiques.

II. Régulation de la N-cadhérine

1) Introduction

Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence une augmentation de marqueurs mésenchymateux en présence des variants constitutifs du RA (Cottard et al., 2013). L'expression de ces marqueurs est associée à la progression tumorale.

Pour mieux comprendre le mode d'action de ces variants, les mécanismes de régulation de la N-cadhérine ont été étudiés. Mon travail de thèse s'est focalisé sur l'hypothèse d'une régulation directe de ce marqueur. En effet, 13 ARE ont été mis en évidence dans l'intron 1 du gène codant la N-cadhérine appelé *CDH2* (*cadherin 2*) (Takayama et al., 2007). Ainsi, les variants du RA pourraient reconnaître ces ARE et induire l'expression du gène. Pour étudier cette possibilité, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été réalisées dans des cellules prostatiques cancéreuses. De plus, afin de définir le rôle du RA entier exprimé dans le modèle cellulaire utilisé, l'impact des variants constitutifs sur l'expression de ce dernier a été étudié par qPCR et Western Blot.

Les résultats obtenus ont été intégrés dans une publication qui développe plusieurs hypothèses concernant la régulation de la N-cadhérine. Ils ont permis de définir un modèle complexe, intégrant à la fois une action directe des variants constitutifs du RA au niveau du gène *CDH2* mais aussi une action indirecte passant par la répression du RA endogène des cellules utilisées.

2) Publication 1

[Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer](#)

Félicie Cottard, **Pauline Ould Madi - Berthélémy**, Eva Erdmann, Frédérique Schaff-Wendling, Céline Keime, Tao Ye, Jean-Emmanuel Kurtz and Jocelyn Céraline

Publiée dans Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 42), pp: 72008- 72020.

Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer

Félicie Cottard¹, Pauline Ould Madi-Berthélémy¹, Eva Erdmann¹, Frédérique Schaff-Wendling^{1,3}, Céline Keime², Tao Ye², Jean-Emmanuel Kurtz^{1,3} and Jocelyn Céraline^{1,3}

¹Université de Strasbourg, INSERM, FMTS, Strasbourg, France

²Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch-Graffenstaden, France

³Service d'Onco-Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

Correspondence to: Félicie Cottard, **email:** felicie.cottard@sfr.fr

Keywords: *androgen receptor, constitutively active androgen receptor variants, N-cadherin, EMT, prostate cancer*

Received: August 29, 2016

Accepted: May 12, 2017

Published: May 29, 2017

Copyright: Cottard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Constitutively active androgen receptor (AR) variants have been involved in the expression of mesenchymal markers such as N-cadherin in prostate cancer (PCa). However, the underlying molecular mechanisms remain elusive. It remains unclear, whether N-cadherin gene (CDH2) is a direct transcriptional target of AR variants or whether the observed upregulation is due to indirect effects through additional regulatory factors. Moreover, the specific contribution of full-length AR and AR variants in N-cadherin regulation in PCa has never been explored deeply. To investigate this, we artificially mimicked the co-expression of AR variants together with a full-length AR and performed miRNA-seq, RNA-seq and ChIP assays. Our results were in favor of a direct AR variants action on CDH2. Our data also revealed a distinctive mode of action between full-length AR and AR variants to regulate N-cadherin expression. Both wild type AR and AR variants could interact with a regulatory element in intron 1 of CDH2. However, a higher histone H4 acetylation in this genomic region was only observed with AR variants. This suggests that full-length AR may play an occluding function to impede CDH2 upregulation. Our data further highlighted a negative effect of AR variants on the expression of the endogenous full-length AR in LNCaP. These differences in the mode of action of AR variants and full-length AR for the control of one key gene for prostate cancer progression could be worth considering for targeting AR variants in PCa.

INTRODUCTION

The androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor superfamily, is a ligand-dependent transcription factor that controls the development and the normal function of the prostate gland [1]. The AR is also involved in the development of prostate cancer (PCa) and current treatments for metastatic disease are based on the inhibition of androgen signaling pathways [2–4]. Unfortunately, this therapy is highly, but only transiently effective, as most patients relapse after approximately 1.5 years of treatment

and progress toward castration resistant PCa (CRPC). To date, it is clearly accepted that the reactivation of the androgen/androgen receptor-signaling axis is a major event in the onset of CRPC. The mechanisms of this reactivation are numerous and include molecular events such as AR amplification, AR mutations, overexpression of AR cofactors, increased intratumoral androgen synthesis, ligand-independent AR activation by cytokines or growth factors, and constitutively active AR variants [5–9].

Constitutively active AR variants are due to nonsense mutations in exon 4 (e.g. AR-Q640X) [6, 10–12]

or alternative splicing of the AR mRNA (e.g. AR-V7) [12–19] resulting in premature termination of the AR protein. These AR variants are defective in ligand binding and display ligand-independent transcriptional activities in PCa cells [10, 11, 13]. AR variants support PCa cells growth both *in vitro* and *in vivo* in an androgen-depleted environment and lead to resistance to novel therapies such as enzalutamide and abiraterone acetate [14, 20–23]. Hence, there is an urgent need to understand the mode of action of constitutively active AR variants in order to find novel therapeutic targets in CRPC.

In addition to their role in castration resistance, a number of studies suggest that constitutively active AR variants are involved in PCa progression. In the first place, AR^{v567es} induces autonomously prostate tumorigenesis and furthermore leads to invasive adenocarcinoma after castration [21]. Moreover, our previous data show that AR variants are associated with a partial epithelial mesenchymal transition (EMT) as evidenced by the co-expression of epithelial and mesenchymal markers in PCa cells. Indeed, AR-Q640X and AR-V7 lead to an upregulation of N-cadherin, vimentin and ZEB1 in LNCaP cells without decreasing the expression of E-cadherin [24]. Besides, a link between AR-V7 and ZEB1 upregulation has been reported in 22RV1 and LNCaP cells [25]. An increased expression of N-cadherin, vimentin, Snail and Twist is observed in an AR-V7 transgenic mouse model [26]. EMT promotes a modification of cell shape favoring tumor migration and invasion and increasing evidences have demonstrated a role of AR variants in PCa cells migration [25, 27–29]. All together, these data show that constitutively active AR variants induce a particular set of genes contributing to tumor progression during CRPC. This was reinforced by several studies showing that the full-length AR (AR-FL) and AR variants induce distinct transcriptional programs [28, 30]. However, the mechanisms leading to this differential expression of genes are currently unknown and need to be elucidated in order to have a better understanding towards the role of AR variants in tumor progression.

N-cadherin is involved in cell adhesion and promotes tumor progression owing to its role in cell migration, invasion and survival [31]. As mentioned above, we have shown that constitutively active AR variants induce N-cadherin expression [24]. Interestingly, AR-FL and AR variants compete against each other to regulate N-cadherin expression [24]. In the present study, we explored the mechanisms leading to N-cadherin expression in the presence of constitutively active AR variants. We hypothesized that at least four mechanisms may be involved in N-cadherin upregulation in the presence of AR variants. In the first place, AR variants may induce the expression of a transcription factor known to regulate N-cadherin expression. Secondly, as AR-FL induces or represses miRNAs, AR variants may differentially

modulate these miRNAs, potentially resulting in N-cadherin upregulation. Thirdly, as 13 androgen response elements (AREs) have been described in intron 1 of the N-cadherin *CDH2* gene [32], we postulated that AR variants may directly regulate N-cadherin expression by interacting with these AREs. Finally, as we have shown that AR-FL and AR variants compete against each other to regulate N-cadherin expression, we hypothesized that AR variants may downregulate AR-FL in PCa cells. In this work, we have deciphered the mechanisms of AR variants-induced N-cadherin differential expression, showing that N-cadherin upregulation in prostate cancer cells appears to result from the binding of AR variants to AREs in intron 1 of the *CDH2* gene followed by histone H4 acetylation, but also from a decrease of endogenous AR-FL. These data emphasize the role of AR variants in the progression of CRPC.

RESULTS

Analysis of the impact of AR variants on potential N-cadherin regulators

We have previously shown a difference in the capacity of full-length AR (AR-FL) and AR variants to upregulate N-cadherin expression in PCa cells [24]. We investigated whether AR variants could directly deregulate known N-cadherin transcriptional regulators. We performed an RNA-seq experiment in LNCaP cells overexpressing AR-WT or AR-V7. From this analysis, we identified 751 upregulated genes and 108 downregulated genes in LNCaP cells overexpressing AR-V7 compared to AR-WT (Filter criteria: log2Fold-Change > 1 and an adjusted *p*-value for multiple testing < 0.05). First, biological functions of deregulated genes were studied using IPA software. Interestingly, deregulated genes in the presence of AR-V7 in LNCaP cells were associated with functions such as cellular movement, cell morphology or cellular assembly and organization (Supplementary Figure 1). As expected, *CDH2* was found in the list of upregulated genes involved in these functions. In the next step, we searched, using two different methods, the differentially expressed genes that encode for transcription factors able to regulate N-cadherin expression. First, we identified differentially expressed transcription factors in the presence of AR-V7 with predicted binding sites in *CDH2* gene using SABiosciences proprietary database DECODE (DECipherment Of DNA Elements) (Figure 1A). Among these factors, only SOX9 has been experimentally linked to N-cadherin expression [33]. We further looked to confirm the increased expression of SOX9 in the presence of AR-V7 compared to AR-WT in our LNCaP model. We used a doxycycline inducible system for the expression of AR variants in LNCaP cells followed by qRT-PCR and Western Blot analyses.

Unfortunately, we did not observe any increase in SOX9 expression in the presence of AR-V7 (data not shown). We continued the RNA-seq analysis using the IPA software and identified a network in which ETV5 was a direct regulator of N-cadherin in our model (Figure 1B). The increase of ETV5 mRNA levels in the presence of AR-V7 was confirmed with the doxycycline inducible AR-V7 expression system (Supplementary Figure 2, Figure 1C). Nevertheless, ETV5 protein was not detected in immunoblots from LNCaP cells overexpressing AR variants (Supplementary Figure 3). Finally, we investigated whether ETV5 silencing could decrease N-cadherin upregulation in the presence of AR variants. We used the doxycycline inducible AR-V7 expression system and ETV5 specific siRNAs (Figure 1D, left panel) and could not observe any change in N-cadherin

expression in the presence of AR-V7 (Figure 1D, right panel). Taken together, our data exclude two main potential transcription factors that could indirectly lead to N-cadherin expression in the presence of AR variants.

MiR-221-3p and miR-26b-5p are not involved in N-cadherin upregulation in the presence of AR variants

MicroRNA deregulation could be another mechanism that indirectly links AR variants to N-cadherin expression. Indeed, microRNAs targeting N-cadherin mRNA could be decreased in the presence of AR variants and, in turn, could explain the upregulation of N-cadherin in our model. Hence, from the same samples used for RNA-seq, we performed a miRNA-seq analysis in order

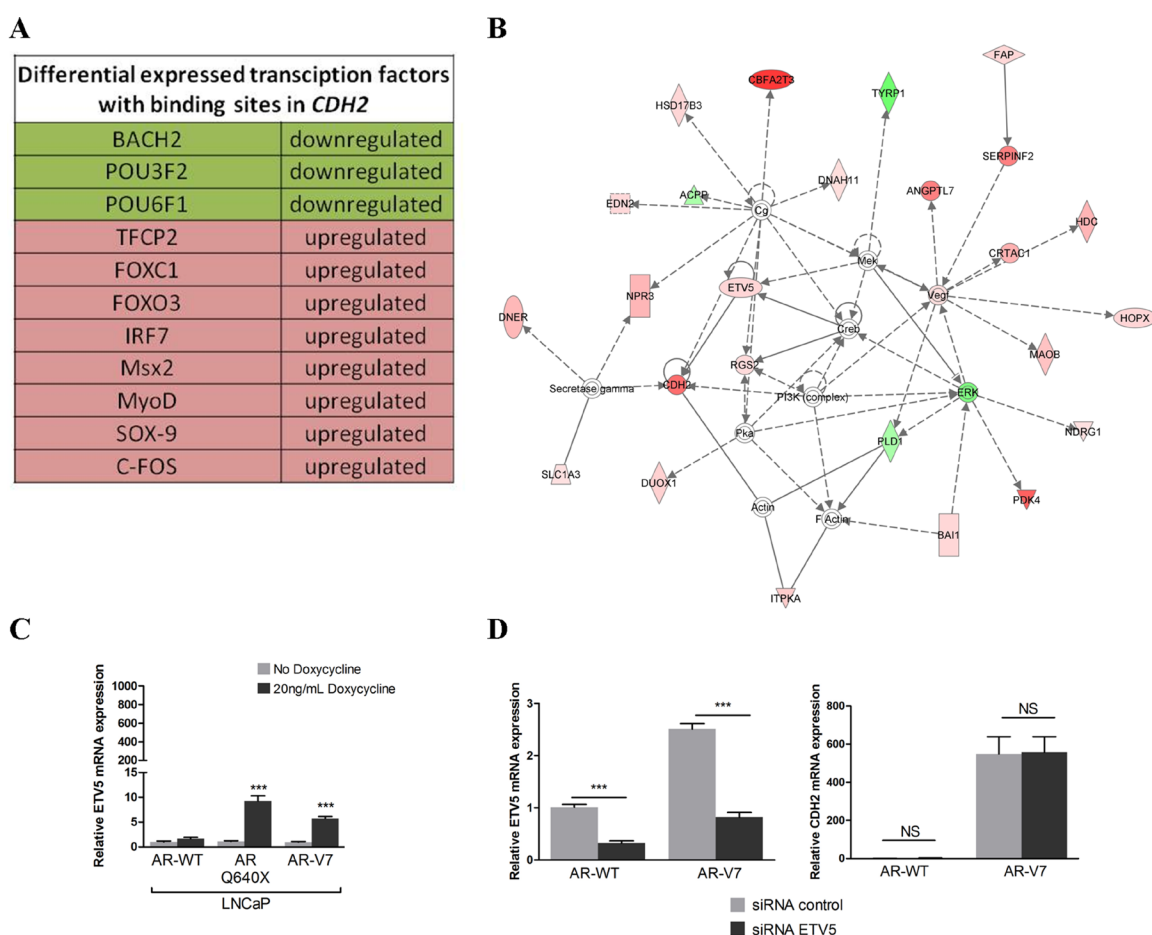


Figure 1: ETV5 and SOX9 do not regulate N-cadherin. (A) Transcriptional regulators deregulated in the presence of AR-V7 compared to AR-WT with known binding sites in *CDH2* gene are listed. (B) IPA analysis from deregulated genes in the presence of AR-V7 highlighted a network in which ETV5 was a direct regulator of CDH2. Green: downregulated expression; Red: upregulated expression. (C) A lentiviral inducible system was used to verify ETV5 expression in the presence of AR variants observed in our RNA-seq data. AR-WT and AR variants expression were induced with 20 ng/mL doxycycline. LNCaP expressing AR-WT and AR variants were cultured in the presence of 10nM DHT and ETV5 mRNA expression level was analyzed by real-time PCR 4 days after induction. (D) To analyze the impact of ETV5 on N-cadherin expression, AR-WT and AR-V7 were induced in LNCaP with 20 ng/mL doxycycline and cells were transfected with 50 nM of siRNA against ETV5 (left panel). After 48 h, total mRNA was extracted and *CDH2* mRNA expression level was assessed by qRT-PCR (right panel). For all qRT-PCR analyses, the results were normalized to β -ACTIN. Relative expression is represented as the mean of $\Delta\Delta Ct \pm SEM$ of three independent experiments. NS: not significant, *** $P < 0.001$, two-tailed Student's *t*-test.

to identify deregulated microRNAs in the presence of AR variants. This analysis highlighted 12 downregulated microRNAs and 24 upregulated microRNAs in the presence of AR-V7 compared to AR-WT with an adjusted *p-value* ≤ 0.05 (Figure 2).

First, we checked if microRNAs known to directly regulate N-cadherin were modulated by the presence of AR variants. To date, few microRNAs are described as direct regulators of N-cadherin expression. Indeed, miR-145 is able to modulate N-cadherin expression in the prostate cancer cell line PC-3 [34]. Moreover, miR-218 is known to directly regulate N-cadherin expression in aggressive lung adenocarcinoma [35]. miR-369-3p, miR-496 and miR-543 are also direct regulators of N-cadherin during neurogenesis and neuronal migration [36]. However, according to our miRNA-seq, the expression levels of miR-145, miR-218, miR-369-3p, miR-496 and miR-543 were not affected in our model.

To go further in our analysis, we performed an integrative analysis between the RNA-seq and miRNA-seq using “micro RNA target filter” in IPA software to search for potential targets of microRNAs and we obtained a list of mRNA-microRNA pairs. Because microRNAs negatively regulate the expression of mRNA, we have selected only pairs with an anticorrelated expression pattern. Finally, we have obtained 75 potential pairs for upregulated microRNAs and 279 pairs for downregulated microRNAs (Figure 2).

In particular, the miRNA-seq analysis revealed that miR-221-3p and miR-26b-5p could regulate N-cadherin expression. However, according to our miRNA-seq data, the expression of miR-221-3p and miR-26b-5p is only decreased by a 1.2-fold and 1.1-fold respectively in the presence of AR-V7 compared to AR-WT. Moreover, this slight decrease was not confirmed by qRT-PCR (data not shown). Taken together, these results reveal that neither miR-221-3p nor miR-26b-5p is involved in N-cadherin upregulation in our model.

AR variants bind androgen response elements in intron 1 of CDH2 to upregulate N-cadherin expression

It has been shown that AR-FL can be recruited to the 13 ARE repeats present in intron 1 of *CDH2* [32]. To highlight a potential difference between the recruitment of AR-FL and AR variants to these AR binding sites, ChIP-qPCR experiments were conducted in LNCaP cells 24 h after doxycycline-induced expression of the full-length AR-WT (EGFP-AR-WT) or the AR-V7 variant (EGFP-AR-V7) (Figure 3; Supplementary Figure 4). As expected, N-cadherin upregulation was only observed in the presence of AR-V7 (Figure 3A). Surprisingly, there was no significant difference between AR-WT and AR-V7 recruitment to the AREs present in intron 1 of *CDH2* (Figure 3B). Hence, it seems that additional mechanisms

A

Upregulated miRNA	Number of anti correlated pairs mRNA-miRNA	Name of targets
hsa-miR-129-2-3p	7	C1QTNF3, C6orf222, CAMK2N1, CXorf36, EXPH5, MAN1A1, SYT4
hsa-miR-129-5p	2	CAMK2N1, MAN1A1
hsa-miR-455-5p	5	CD274, EXPH5, MAN1A1, PLCXD3, PLD1
hsa-miR-7705	NA	
hsa-miR-1908-3p	NA	
hsa-miR-153-5p	NA	
hsa-miR-1908-5p	1	C1orf95
hsa-miR-584-5p	2	CXorf36, EXPH5
hsa-miR-210-5p	NA	
hsa-miR-23a-3p	5	LRR31, PLCXD3, SFRP1, SRGAP3, SYT4
hsa-miR-4510	6	FAM131B, IL1RN, KRT75, NKAIN1, PLCXD3, PTGES
hsa-miR-210-3p	1	ANTXR1
hsa-miR-5690	NA	
hsa-miR-30b-3p	4	CECR1, OR51E1, PTGES, TMEM178A
hsa-miR-744-5p	1	IL36RN
hsa-miR-30d-3p	1	AQP4
hsa-miR-1180-3p	1	C6orf222
hsa-miR-21-3p	2	NKAIN1, PEG3
hsa-miR-30d-5p	11	BEST4, CAMK2N1, CHST2, CNGB3, FAM131B, NAV3, PLCXD3, SLC30A4, SRGAP3, SYT4, TLL1
hsa-miR-30b-5p	11	BEST4, CAMK2N1, CHST2, CNGB3, FAM131B, NAV3, PLCXD3, SLC30A4, SRGAP3, SYT4, TLL1
hsa-miR-324-3p	7	C1orf95, FAM131B, FAM221B, NKAIN1, PLD1, SH2D3C, SRGAP3
hsa-miR-23b-3p	5	LRR31, PLCXD3, SFRP1, SRGAP3, SYT4
hsa-miR-941	2	GLP1R, SFRP1
hsa-miR-1307-3p	1	MAN1A1
Total	75	

B

Downregulated miRNA	Number of anti correlated pairs mRNA-miRNA	Name of targets
hsa-miR-100-5p	8	FKBP5, GPR26, GRHL1, IGF1R, PCSK9, PNLP3P, PTPRN2, SCNN1G
hsa-miR-1247-3p	NA	
hsa-miR-10a-5p	15	ANKRD1, B3GNT5, CASK, CECR6, CHST3, DCAF4L1, GPR26, IGDC4, ITGB2, NR5A2, NYAP1, RNF112, SLC6A19, SSX2IP, TMEM132B
hsa-miR-767-5p	19	ACSM5, AHNK, ANXA2, COL2A1, KLF6, LOX, MUC7, NECAB2, OPRL1, PAPLN, PLCL1, PYLPL1, TM4SF18, TMEM56, TPBG, TPM1, TRANK1, TLL6, UVRAG
hsa-miR-221-3p	24	AJAP1, ANXA1, APOLD1, BEAN1, CACNB4, CASR, CBWD1, CDH2, CDKN1C, CHST3, CTSE, FOS, IGDC4, KDR, KIF16B, MYOD1, PMPA1, SLC40A1, SPOCK1, TIPARP, TMEM132B, TMEM132C, TPBG, TRPC3
hsa-miR-125a-5p	39	ABLIM3, ASB11, ATOH8, C6orf223, CDKN2B, CXCL13, DCAF4L1, DUOX1, FAM129B, FLG, GP2, GPR153, GRHL1, HMGB3, ID1, ID2, KCNH1, KIAA1644, KRT19, LIFR, LRR31, LRR38, MAF, MMP25, PSAPL1, RET, RP1, SCN5A, SFRP5, SLA2, SLC37A2, SLC20A1, SNX33, SP6, SPSB1, THY1, TMEM37, USP2, UVRAG, ZNF80
hsa-miR-30e-5p	49	ADRA2B, AHNK, AP3S1, ATRNL1, B3GNT5, BEAN1, C1orf168, CD80, CECR6, CELF3, CTGF, DLL4, ELL2, ELM01, ELOVL5, ERRF1, FAM104A, FAM26E, FAM43A, GPR26, GRHL1, HMGB3, HTRA3, IGF1R, IP6K3, KIF16B, LIFR, LOX, MAF, MAL, MEIS2, NID1, NPR3, NR5A2, PNMA1, PROM1, RASD1, RFX6, RHOB, RUNX1, SLC6A3, SNX33, SOX9, SSX2IP, TENM1, TMEM56, TNXB, TRPC5OS, USP2
hsa-miR-106b-5p	35	AHNK, ATOH8, ATP1A2, CYP2U1, F3, FAM129B, FGD4, FKBP5, FRMD4B, FSTL4, GLIS3, GPR6, HIF1A, HMGB3, LDLRAD3, LIN7B, NTN4, PLAG1, PRR15, PTHLH, PYLPL1, RASD1, RUNX1, SLC40A1, SLC41A1, SMOG1, SSX2IP, STOM, TENM1, TGM2, TLE4, TTR, UBE2QL1, VCL, VLDLR
hsa-miR-30a-5p	49	ADRA2B, AHNK, AP3S1, ATRNL1, B3GNT5, BEAN1, C1orf168, CD80, CECR6, CELF3, CTGF, DLL4, ELL2, ELM01, ELOVL5, ERRF1, FAM104A, FAM26E, FAM43A, GPR26, GRHL1, HMGB3, HTRA3, IGF1R, IP6K3, KIF16B, LIFR, LOX, MAF, MAL, MEIS2, NID1, NPR3, NR5A2, PNMA1, PROM1, RASD1, RFX6, RHOB, RUNX1, SLC6A3, SNX33, SOX9, SSX2IP, TENM1, TMEM56, TNXB, TRPC5OS, USP2
hsa-miR-191-5p	9	AJAP1, CASK, CBFA2T3, DNABJ3, F5, LRR38, PCSK9, PLXNA4, SLA
hsa-miR-26b-5p	32	ACSL3, ATP1A2, B3GNT5, BHLHE40, CACNB4, CDKN1C, CHST3, CTGF, FMO5, FRMD4B, GPR146, HSGS1, INSC, KY, LIFR, MAP1A, NAMPT, NID1, NTN4, PLAG1, PLCL1, PLOD2, PPM1B, PYLPL1, SCN5A, SLC2A3, SSX2IP, TM4SF18, TMEM56, TRPC3, UBE2QL1
hsa-miR-125b-2-3p	NA	
Total	279	

Figure 2: Integrative analysis between RNA-seq and miRNA-seq. An integrative analysis was performed using “micro RNA target filter” in IPA software to identify potential targets of microRNAs. Targets of upregulated (A) and downregulated (B) microRNAs are listed in the following table.

are required to explain why only AR variants are associated with N-cadherin upregulation. To go further, ChIP-qPCR experiments were conducted to analyze histone H4 acetylation level, a mark of active chromatin in the region encompassing the AREs in intron 1 of *CDH2*. The level of histone H4 acetylation in LNCaP cells expressing AR-WT was comparable to that one obtained in non-induced control cells (Figure 3C). Moreover, AR-V7 led to a significant increase of histone H4 acetylation at AR binding sites in *CDH2* intron 1 (Figure 3C), but not at the control β -GLOBIN promoter (Figure 3D). Similar results were obtained 72 h after AR-V7 or AR-Q640X induction in LNCaP cells (Supplementary Figure 5) and also in the prostate cancer C4-2B cells (Supplementary Figure 6). Furthermore, we highlighted the necessity of a functional AR DNA binding domain (DBD) for N-cadherin upregulation using a mutant AR-V7 with the C576Y mutation in the first Zinc finger (Supplementary

Figure 7). In conclusion, our data indicate that both AR-FL and AR variants can be recruited to the AREs present in intron 1 of *CDH2*, but only AR variants lead to an increase of histone H4 acetylation.

The loss of AR-FL in the presence of AR variants increases N-cadherin upregulation

The above mentioned results indicating that AR-FL binds AREs in intron 1 of *CDH2* but without effect on N-cadherin expression coupled with our previous observation that DHT-activated AR-FL antagonizes the ability of AR variants to activate N-cadherin gene [24], suggests that DHT-activated AR-FL may occlude these AR binding sites in intron 1 of *CDH2* and prevent AR variant binding. This model argues that the AR variants must have additional properties in order to overcome the occluding effects of DHT-activated AR-FL and to

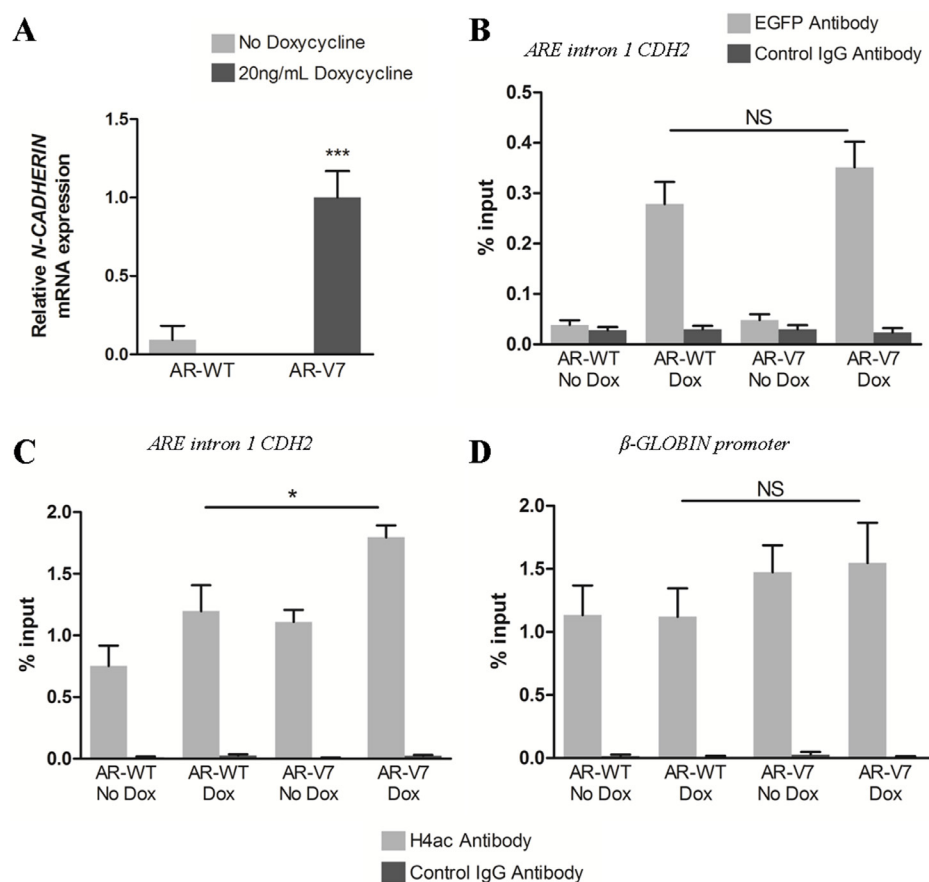


Figure 3: Both AR-FL and AR variants are recruited at ARE in *CDH2* intron 1 but AR variants are associated with increased histone H4 acetylation. EGFP-tagged AR-WT and AR-V7 expression were induced with 20 ng/mL doxycycline in LNCaP cells and cells were cultured in complete medium supplemented with 10 nM DHT. (A) Twenty-four hours after induction, N-cadherin expression was analyzed by qRT-PCR. Recruitment of AR-WT and AR-V7 (B) and histone H4 acetylation level (C) at ARE in *CDH2* intron 1 were analyzed by ChIP-qPCR using respectively anti-EGFP antibody or anti-Acetyl H4 (H4ac) antibody. (D) Histone H4 acetylation level at β -GLOBIN promoter was examined as control. Control IgG antibody was used to determine the specificity of the reaction. The enrichment of EGFP-AR and histone H4 acetylation was calculated using a standard curve with serial dilutions of the input for each primer. Results were represented as the mean of %input $\pm$ SEM of three independent experiments. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, NS: Not significant, two-tailed Student's t -test.

enhance N-cadherin expression. To explore this issue, we evaluated by Western Blot, the expression kinetics of N-cadherin and endogenous AR-FL in LNCaP cells in the presence of DHT-activated AR-WT or AR variants (Figure 4). Interestingly, N-cadherin upregulation by AR variants was concomitant with a loss of endogenous AR-FL expression (Figure 4A, 4B). Moreover, the decrease of endogenous AR expression was only observed in LNCaP overexpressing AR-V7 but not in the presence of DHT-activated AR-WT (Figure 4C, Supplementary Figure 8). This downregulation was also observed when C4-2B cells overexpressed AR-Q640X variant (Supplementary Figure 6). These data indicate that AR variants downregulate AR-FL to overcome its occluding effects on AR binding sites in intron 1 of *CDH2*.

DISCUSSION

To date, it is accepted that constitutively active androgen receptor variants play a key role in castration resistance owing to their exclusively nuclear localization

and their constitutive transcriptional activity in the absence of androgens [10–14, 16–19]. Moreover, during these last years, several data suggested that AR variants could also promote tumor progression. Indeed, AR variants were associated with an expression of EMT markers such as N-cadherin, vimentin or SNAIL in *in vitro* and *in vivo* models [21, 24, 25]. Furthermore, RNA-seq data reveal that AR variants regulate a subset of genes preferentially involved in cell cycle [15, 30]. However, the mechanisms associated with this distinct expression profile are poorly studied. Hence, in the present study, we have explored the mechanisms by which AR variants induce this distinct subset of genes through focusing our research on N-cadherin expression.

Our data from ChIP-qPCR evidenced that both AR-FL and AR variants were able to bind to the AREs present in intron 1 of the *CDH2* gene. In accordance with our findings, the analysis of previously reported ChIP-seq data confirms AR-FL binding to an ARE in intron 1 of *CDH2* [37]. Our observation corroborates the ChIP-seq analysis performed in 22rv1 CRPC cells showing an enrichment

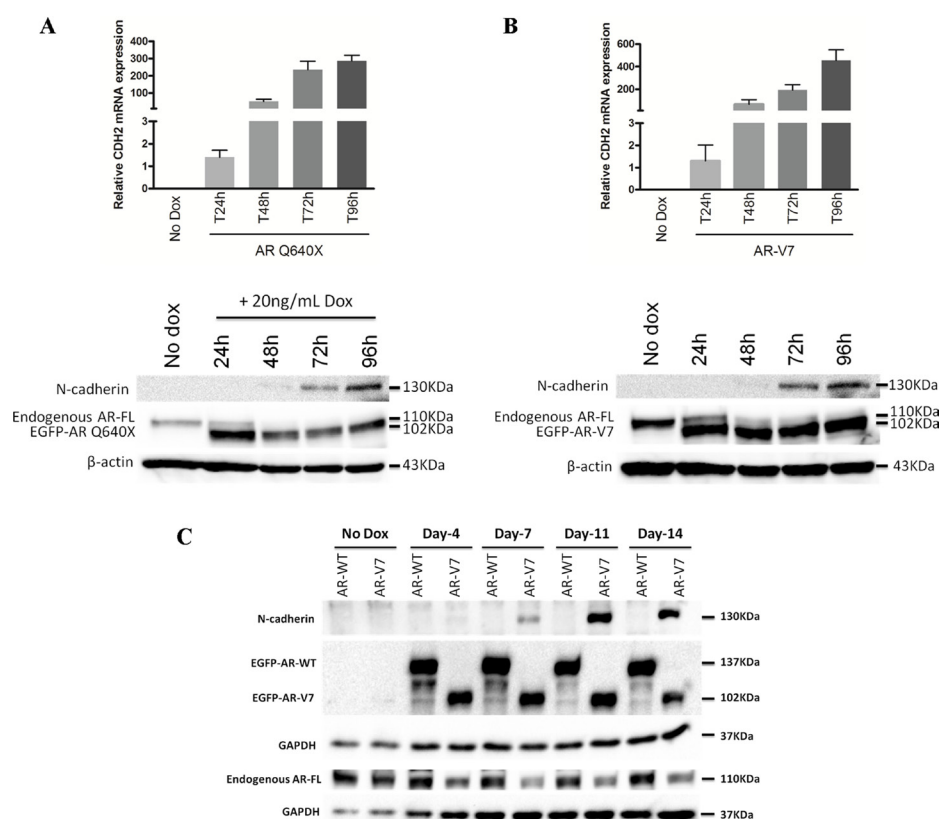


Figure 4: The expression of AR variants is associated with a loss of endogenous AR-FL. EGFP-tagged AR-WT, AR-Q640X and AR-V7 expression were induced with 20 ng/mL doxycycline in LNCaP and cells were cultured in complete medium supplemented with 10 nM DHT. (A) (B) Short-term effects of AR variants (from 24 h to 96 h after induction) on N-cadherin and AR-FL expression by qRT-PCR (upper panel) and Western Blot (lower panel). Results show a gradual decrease of AR-FL upon induction of AR variants. (C) Long-term effects of AR variants (from 4 days to 14 days) on N-cadherin and AR-FL expression by Western Blot. Endogenous AR-FL was detected using a specific antibody targeting the C-terminal extremity of AR (AR-C19 antibody). β -actin and GAPDH were used as a loading control. These experiments were repeated at least three times. The images from Western Blot were cropped to remove the parts which contain no information.

of AR variants in this region [38]. Furthermore, another ChIP-seq analysis supports the concept that the genome-wide binding preference of AR variant AR^{V567es} is identical to androgen-activated AR-FL [39]. However, our ChIP experiment data highlighted a remarkable difference between AR-FL and AR variants following their binding to AREs in two different cell lines. Indeed, AR variant binding to AREs in intron 1 of the *CDH2* gene was associated with an increase in histone H4 acetylation, a positive marker of gene activation. These data provide a novel stage of knowledge regarding the mode of action of AR variants in prostate cancer cells. Both AR-FL and AR variants bind to the same regulatory region, but the signal triggered is different. In the context of *CDH2* gene, AR variant binding is a positive signal for gene transcription, while this is not the case for DHT-activated AR-FL. Indeed, AR variants could be involved in a transcriptional activation complex by the recruitment of histone acetyltransferase (HAT) to induce N-cadherin expression. Besides, AR-FL could occlude the AR binding sites and prevent AR variant activity. Since the ligand-binding domain (LBD) is an important platform for the interaction of cofactors, the loss of this region in AR variants could partly explain the distinct transcriptional programs in the presence of AR-FL or AR variants [40]. Consistent with this hypothesis, the recruitment of the co-activator GRIP-1 was impaired in the presence of AR-Q640X [41].

In our model, as observed in human CRPC samples, we have a co-expression of AR-FL and AR variants.

As suggested in our previous work, AR-FL and AR variants could compete each other to regulate N-cadherin expression [24]. Here, we have shown that AR variants were associated with a decrease of endogenous AR-FL in LNCaP cells and C4-2B cells. A similar decrease was also observed in the absence of DHT. This AR-FL downregulation was also reported in the presence of a different truncated AR variant [28]. Moreover, the AR-FL loss was concomitant with the upregulation of N-cadherin. Taken together, our results and recently published data led us to propose the following model (Figure 5) [42–44]. The loss of AR-FL may attenuate competitive DNA binding between AR-FL and AR variants, and potentiate AR variants activities on *CDH2* gene. Further analyses need to be performed to validate this model and to understand how AR variants induce a decrease of endogenous AR-FL in prostate cancer cells. In the present study, we focused only on N-cadherin expression, but, it may be interested to study if the increased expression of other mesenchymal markers observed in the presence AR variants occurs following the same mechanism. Indeed, in our previous study, we showed an increased expression of vimentin, ZEB1 and SNAIL [24]. Interestingly, Miao and colleagues showed recently that AR-FL is a negative regulator of SNAIL expression by interacting with AREs in the promoter region. Conversely, AR variants are unable to bind this locus [45]. These data combined with our results suggest that the upregulation of SNAIL in the presence of AR variants in our model could result from the loss

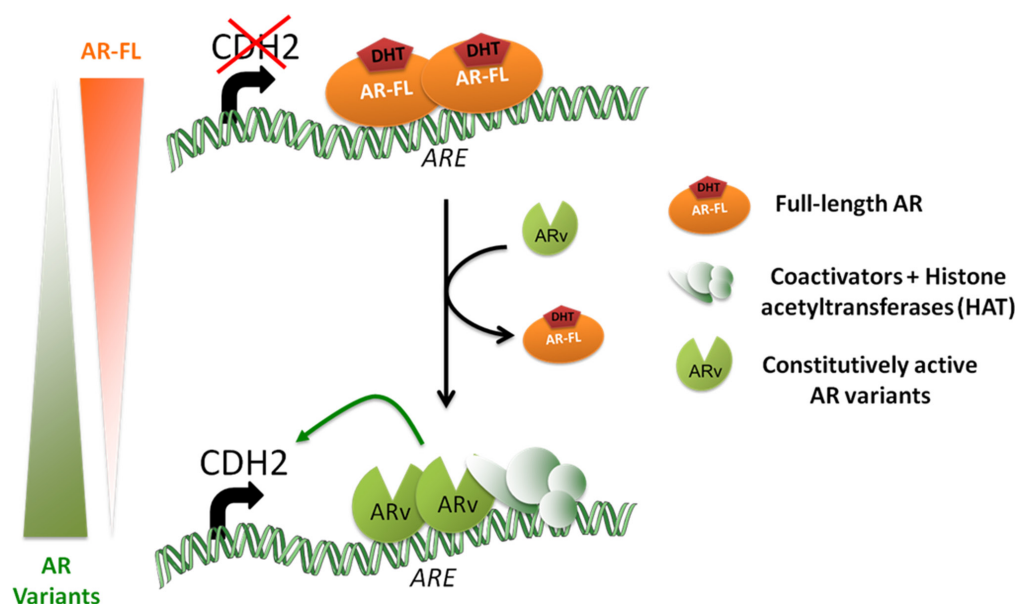


Figure 5: Proposed model of N-cadherin regulation by androgen receptor in LNCaP cells. AR-FL and AR variants differ in their mode of action to regulate N-cadherin. AR-FL binds AREs in intron 1 of *CDH2* but is unable to induce N-cadherin expression. In contrast, AR variants binds also AREs and promote N-cadherin transcription by the recruitment of a transcriptional activation complex with histone acetyltransferase (HAT) activity as evidenced by the more important histone H4 acetylation of this region in the presence of AR variants compared to AR-FL. Moreover, the gradual loss of AR-FL observed when AR variants are expressed may potentiate their effects on N-cadherin expression.

of AR-FL induced by AR variants. This could be another mechanism whereby AR variants induce mesenchymal markers expression, but, this hypothesis remains to be studied.

Using RNA-seq analysis, we identified ETV5 and SOX9 as potential regulators of N-cadherin. Indeed, previous studies have reported a link between N-cadherin and ETV5 or SOX9 expression. For example, the overexpression of ETV5 in endometrial cancer cells was associated with an increased expression of N-cadherin [46]. Moreover, SOX9 could regulate N-cadherin by interacting with *CDH2* promoter [33]. There are also two other SOX9 motifs in the intron 1 of *CDH2*. Here, in our model the increased expression of ETV5 revealed in the RNA-seq was confirmed by qRT-PCR, but at the protein level, ETV5 expression was not detectable in immunoblots. Moreover, ETV5 downregulation by siRNA was not associated with N-cadherin downregulation, suggesting that ETV5 could not be the leading transcription factor induced by AR variants to upregulate N-cadherin expression in our model. The upregulation of SOX9 expression observed in our RNA-seq data was not confirmed at mRNA and protein levels. Anyway, the association between ETV5 or SOX9 expression level and the presence of AR variants in prostate cancer cells is not clear. In a first study, a DNA microarray analysis performed in LNCaP cells overexpressing AR-V7 revealed an upregulation of ETV5, but not SOX9 [30]. Conversely, ETV5 and SOX9 were not affected by AR-V7 knockdown in CWR-R1 and 22Rv1 cancer cells [14]. Likewise, the overexpression of a truncated AR variant in LNCaP cells was not associated with an overexpression of these transcription factors [28]. However, we cannot exclude the possibility that another transcription factor not studied here could lead to N-cadherin expression in our model.

Since Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) was generally associated with a particular miRNA expression profile, we wondered whether N-cadherin induced by AR variants could be also regulated by microRNAs. So, using an integrative analysis between miRNA-seq and RNA-seq, we have examined microRNAs with a decreased expression in the presence of AR-V7 compared to AR-WT and selected the ones that were known to target the 3'UTR extremity of *CDH2*. From this analysis, we have identified two microRNAs, miR-221-3p and miR-26b-5p, able to target 3'UTR extremity of *CDH2* with a high score of prediction. However, the decreased expression of miR-221-3p and miR-26b-5p observed in the miRNA-seq analysis was not confirmed by qRT-PCR. The link between these two microRNAs and N-cadherin was only based on bioinformatics prediction. Indeed, the direct regulation of N-cadherin by miR-221-3p or miR-26b-5p was never described in previous reports. Nevertheless, in hepatocellular cancer cells, miR-26b-5p regulates Epithelial Mesenchymal Transition.

Indeed, its overexpression is associated with an increase of E-cadherin expression and a decrease of vimentin expression. However, the authors have not analyzed N-cadherin expression in the presence of miR-26b-5p [47]. In contrast, miR-221-3p is rather overexpressed in cancer and its expression is associated with a more proliferative and invasive phenotype [48, 49]. In the presence of AR variants, only miR-100-5p and miR-1247-3p were downregulated with a fold change of at least 1.5. However, their impact on N-cadherin expression is unknown. In conclusion, our findings are not in favor of N-cadherin regulation by microRNAs in our model.

In summary, in this study we bring evidence that N-cadherin upregulation in prostate cancer cells appears to result from the binding of AR variants to AREs in intron 1 of the *CDH2* gene followed by histone H4 acetylation, but also from a decrease of endogenous AR-FL. These data emphasize the role of AR variants in the progression of CRPC and highlight the importance to develop drugs targeting these variants or their mode of action.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

LNCaP cells, clone FGC (ECACC) and C4-2B cell line (ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN, USA) were maintained in RPMI-1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) and 1 mM pyruvate (Invitrogen) (complete medium). HEK 293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich).

Plasmids

For lentiviral infection, the full-length wild type androgen receptor (AR-WT) and the constitutively active AR variants, AR-Q640X and AR-V7, were excised from previously described pEGFP-AR [11, 12] using XhoI/BamHI and cloned in pENTR4-GFP-C3 (Addgene) between XhoI and BamHI restriction sites. Then, pENTR4-GFP-AR was recombined with pLenti PGK Blast DEST (Addgene) using Gateway LR clonase II enzyme mix (Life Technologies). For lentiviral inducible expression, the Lenti-X™ Tet-ON® 3G Inducible Expression System (Clontech) was used. Briefly, cDNA of EGFP-AR-WT, EGFP-AR-Q640X and EGFP-AR-V7 were amplified from previously described pEGFP-AR using specific primers (Supplementary Table 1). Each cDNA amplicon was cloned in pLVX-TRE3G vector between BamHI/MluI using the In fusion® HD Cloning Kit (Clontech).

Lentiviral transduction

Lentivirus expressing GFP, AR-WT, AR-Q640X and AR-V7 were prepared by co-transfecting 6×10^6 HEK 293T with 9 μ g of packaging plasmids (pLP1, pLP2, and pLP/VSVG, ratio 1:1:1) and 3 μ g of pLenti-PGK-AR or 1 μ g pLenti-PGK-GFP as control using respectively 36 μ l or 30 μ l of lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were transfected in antibiotic-free medium (DMEM containing 10% FBS and 2 mM L-glutamine). Culture media were changed the day after and 72 h after transfection, culture media were recovered, centrifuged at 3000 rpm for 15 min to pellet debris. The viral supernatants were filtered through a Millex-HV 0.45 μ m, concentrated 10x with Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters Ultracell®-100K (Millipore). Then, LNCaP cells were incubated with 1:10 of concentrated viral supernatant in LNCaP complete medium supplemented with 10 nM DHT and 6 μ g/mL of polybrene (Sigma Aldrich) for maximal transduction efficiency. These conditions lead to almost 100% of transduced cells. For miRNA-seq and RNA-seq experiments, a pool of transduced cells was used and the transduction efficiency was determined by analyzing EGFP level by fluorescent microscopy and qRT-PCR.

Lentiviral inducible system

To establish Tet-3G-expressing stable LNCaP and C4-2B clones, Tet-3G lentiviral particles produced in HEK 293T cells were used to transduce LNCaP and C4-2B cells. Stable clones were selected with 400 μ g/mL geneticin (Life Technologies). For an inducible expression of AR variants, Tet-3G stable LNCaP and C4-2B cells were transduced with pLVX-TRE3G-EGFP-AR-WT, pLVX-TRE3G-EGFP-AR-Q640X and pLVX-TRE3G-EGFP-AR-V7 lentiviral particles, and transduced LNCaP and C4-2B cells were selected with 300 μ g/mL geneticin and 400 ng/mL or 100 ng/mL puromycin (Life Technologies) respectively. AR expression was induced using 20 ng/mL doxycycline (Life Technologies).

siRNA transfection

Two days before transfection, AR doxycycline-inducible LNCaP cells were plated into 12-wells plates. Prior to transfection, medium was refreshed with RPMI-1640 supplemented with 10% Tet System Approved FBS (catalog no. 8630-1, BD biosciences), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), 1 mM pyruvate (Invitrogen), 10 nM DHT and 20 ng/mL doxycycline (Life technologies). Cells were transfected with 50 nM siRNA against ETV5 (Hs_ETV5_5, catalog no. SI03019394, Qiagen) using 3 μ l of JET-PRIME (Polyplus Transfection, Ozyme). AllStars Negative Control siRNA (catalog no. 1027280, Qiagen) was used as control. After 48 h, total

RNA was extracted and ETV5 and CDH2 expression levels were analyzed by qRT-PCR.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using NucleoSpin® RNA II assay (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's procedure and 400 ng of total RNA were reverse transcribed using iScript kit (Bio-Rad). Real-time PCR was conducted using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) and validated primers (Supplementary Table 2, QuantiTect Primers, Qiagen). *PBGD* and *B-ACTIN* mRNA expression were used as internal control for normalization. The relative expression of target gene was determined by the $\Delta\Delta$ Ct method.

Western blot analysis

Transduced cells were lysed in RIPA buffer (Pierce, Thermo Scientific) supplemented with 1x phosphatase inhibitor, 1x protease inhibitor (Sigma Aldrich) and 250 U/mL Benzonase (Millipore). Protein concentration was quantified using BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology) according to the manufacturer's protocol. An equivalent quantity of total proteins was separated by 7.5% SDS-PAGE or by TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide gel, 12% (cat. #161-0184) and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with PBS/0.1% Tween/4% nonfat dry milk and probed with primary antibodies against EGFP (1:200, sc-9996, Santa Cruz Biotechnology), ETV5 (1:2000, catalog no. #MABN683, Millipore), AR (clone G122-434) (1:500, catalog no. 554225, BD Biosciences), AR-C19 (1:200, sc-815, Santa Cruz Biotechnology), N-cadherin (1:2500, catalog no. 610920, BD Biosciences), b-actin (1:2000, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) or GAPDH (1:1000, sc-20357, Santa Cruz Biotechnology) at 4°C overnight. Blots were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:2000, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology), goat anti-rabbit (1:5000, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-goat (1:2000, sc-2768, Santa Cruz Biotechnology) or rat anti-mouse IgG2a (1:1000, catalog no. 553391, BD Biosciences) secondary antibodies for 1 h. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence (Immobilon™ Western, Millipore). For Stain-Free gels, total protein normalization was performed using Image Lab™ Software (Bio-Rad Laboratories).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

To analyze the occupancy of AR in *CDH2* gene, we have performed a ChIP using ChIP-IT® High Sensitivity (Active Motif) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 24 h or 72h after doxycycline induction, LNCaP and C4-2B overexpressing AR-WT, AR-V7 or non-

induced cells as control were crosslinked with 1.1% of paraformaldehyde and fixation buffer for 15 min at room temperature and the reaction was quenched with Stop Solution. After cell lysis, chromatin was sonicated 2.5 h using qSONICA Q800R (20sec ON/40sec OFF). Then, 30 µg of chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of anti-EGFP antibody (kindly provided by Dr. K. WHITE, Institute for Genomics and Systems Biology, University of Chicago) or goat IgG isotype (sc-2028, Santa Cruz Biotechnology). Immunoprecipitated DNA was incubated with agarose beads for 3 h, extensively washed, eluted, reverse-crosslinked and purified according to the protocol. To analyze histone H4 acetylation in *CDH2* gene, 10 µg of chromatin was incubated overnight with 10 µg of Histone H4ac (pan-acetyl) antibody (n° 39925, Active Motif) or rabbit IgG isotype control (# 3900, Cell Signaling Technology).

ChIP DNA was analyzed by real-time PCR using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). The primers used for DNA amplification are listed in Supplementary Table S3. QPCR reactions were run using LightCycler 480 (Roche Applied Sciences) following the amplification program: 10 min at 95°C, followed by 50 cycles at 95°C for 20 sec and 60°C for 1 min. Results were normalized against a standard curve generated using dilution of the input for each primer and represented as % input.

RNA-seq analysis

LNCaP cells were transduced with lentivirus expressing AR-WT and AR-V7 in complete medium containing 10 nM DHT. Three days after transduction, total RNA was extracted using TriPure Reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. For RNA-seq analysis, three samples per condition were analyzed. The library of cDNA and the sequencing were performed by IGBMC Microarray and Sequencing platform (Illkirch, France).

RNA-seq reads were mapped onto the hg19 assembly of the human genome using Tophat v2.0.10 [50] and the bowtie2 v2.1.0 aligner [51]. Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.5.4p3 [52] using gene annotations from Ensemble release 75. The normalization of read counts across libraries was performed with the method proposed by Anders and Huber [53]. For statistical analysis, comparison of samples was performed using the method proposed by Love et al. [54] implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.0.19). Resulting *p*-values were adjusted for multiple testing by using the Benjamini and Hochberg (1995) method [55] (GEO dataset GSE71334). Functional and pathway analysis of differentially expressed genes in the presence of AR variants were performed using Ingenuity® Pathway Analysis tool (IPA, www.ingenuity.com, Qiagen).

miRNA-seq analysis

RNA samples used for RNA-seq were also analyzed by miRNA-seq. As mentioned above, the library of cDNA and the sequencing were performed by IGBMC Microarray and Sequencing platform.

For data analysis, adapters were trimmed from total reads using FASTX_Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Only trimmed reads with a length between 15 and 40 nucleotides were kept for the further analysis. Data analysis was performed according to published pipeline ncPRO-seq [56]. Briefly, reads were mapped onto the Hg19 genome assembly with Bowtie v0.12.8 [57]. The annotations were done with miRBase release 20 for the microRNAs, with Rfam for the repeats and with Rfam for the other small non-coding RNAs. The normalization and differential expression analysis were done with DESeq2 R package v1.0.12 [53] (GEO dataset GSE71335).

Integrative analysis

Integrative analysis between RNA-seq and miRNA-seq was performed by comparing a list of differentially expressed genes (DEG) and differentially expressed miRNA (DEM). The list of DEG comprised all the genes with a fold change $\leq$ or $\geq$ 1.5 and adjusted *p*-value $\leq$ 0.05 and for the list of DEM, we have selected all the miRNA differentially expressed with adjusted *p*-value $\leq$ 0.05. These two lists were separately uploaded in Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (www.ingenuity.com, Qiagen) and the putative targets of DEM were identified using microRNA Target Filter. Briefly, this tool is the combination of four databases based on prediction binding (TargetScan) and experimentally validated interaction (miRecords, Tarbase and Ingenuity® Knowledge base). For further analyses, only pairs of mRNA-miRNA with anticorrelated expression were selected.

Abbreviations

Androgen Receptor (AR); full-length Androgen Receptor (AR-FL); Androgen Response Element (ARE); Castration Resistant Prostate Cancer (CRPC); Epithelial Mesenchymal Transition (EMT); Prostate Cancer (PCa)

ACKNOWLEDGMENTS

Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, member of the France Genomique program. We would like to thank Irwin Davidson and Igor Martjanov at the IGBMC for their support for ChIP experiments. Also, we would like to thank Dr. Kevin White at Institute for Genomics and Systems Biology, University of Chicago for EGFP antibody providing.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the University of Strasbourg, the Ligue Contre le Cancer, the Association Alsace Contre le Cancer, and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Prostatiques.

REFERENCES

1. Cunha GR, Rieke W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, Hayward SW, Wang YZ, Donjacour AA, Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 92:221–236.
2. Chen Y, Clegg NJ, Scher HI. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol*. 2009; 10:981–991.
3. Perlmutter MA, Lepor H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol*. 2007; 9 Suppl 1:S3–8.
4. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA*. 2005; 294:238–244.
5. Antonarakis ES, Armstrong AJ, Dehm SM, Luo J. Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016; 19:231–241.
6. Bergerat JP, Ceraline J. Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat*. 2009; 30:145–157.
7. Devlin HL, Mudryj M. Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett*. 2009; 274:177–186.
8. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1:34–45.
9. Karantanos T, Evans CP, Tombal B, Thompson TC, Montironi R, Isaacs WB. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level. *Eur Urol*. 2015; 67:470–479.
10. Ceraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz JE, Duclos B, Jacqmin D, Chopin D, Bergerat JP. Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2004; 108:152–157.
11. Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, Monge A, Kessler P, Serra S, Lang H, Jacqmin D, Bergerat JP, Ceraline J. Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation—a new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int J Cancer*. 2007; 121:1238–1244.
12. Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, Barthelemy P, Duclos B, Bergerat JP, Ceraline J, Kurtz JE. Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum Mutat*. 2010; 31:74–80.
13. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res*. 2008; 68:5469–5477.
14. Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, Chen H, Chen H, Kong X, Melamed J, Tepper CG, Kung HJ, Brodie AM, Edwards J, et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res*. 2009; 69:2305–2313.
15. Hornberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, Widmark A, Bergh A, Wikstrom P. Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One*. 2011; 6:e19059.
16. Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, Humphreys E, Han M, Partin AW, Vessella RL, Isaacs WB, Bova GS, Luo J. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 2009; 69:16–22.
17. Hu R, Isaacs WB, Luo J. A snapshot of the expression signature of androgen receptor splicing variants and their distinctive transcriptional activities. *Prostate*. 2011; 71:1656–1667.
18. Sun S, Sprenger CC, Vessella RL, Haugk K, Soriano K, Mostaghel EA, Page ST, Coleman IM, Nguyen HM, Sun H, Nelson PS, Plymate SR. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J Clin Invest*. 2010; 120:2715–2730.
19. Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, Viale A, Kim K, Sawyers CL. Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:16759–16765.
20. Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KA, Dehm SM. Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2013; 73:483–489.
21. Liu G, Sprenger C, Sun S, Epilepsia KS, Haugk K, Zhang X, Coleman I, Nelson PS, Plymate S. AR variant ARv567es induces carcinogenesis in a novel transgenic mouse model of prostate cancer. *Neoplasia*. 2013; 15:1009–1017.
22. Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, Vessella RL, Balk S, Matsumoto AM, Nelson PS, Montgomery RB. Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone

- in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:5913–5925.
23. Nadiminty N, Tummala R, Liu C, Yang J, Lou W, Evans CP, Gao AC. NF-kappaB2/p52 induces resistance to enzalutamide in prostate cancer: role of androgen receptor and its variants. *Mol Cancer Ther.* 2013; 12:1629–1637.
 24. Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat JP, Kurtz JE, Ceraline J. Constitutively active androgen receptor variants upregulate expression of mesenchymal markers in prostate cancer cells. *PLoS One.* 2013; 8:e63466.
 25. Kong D, Sethi S, Li Y, Chen W, Sakr WA, Heath E, Sarkar FH. Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *Prostate.* 2015; 75:161–174.
 26. Sun F, Chen HG, Li W, Yang X, Wang X, Jiang R, Guo Z, Chen H, Huang J, Borowsky AD, Qiu Y. Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J Biol Chem.* 2014; 289:1529–1539.
 27. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119:1420–1428.
 28. Tsai HC, Boucher DL, Martinez A, Tepper CG, Kung HJ. Modeling truncated AR expression in a natural androgen responsive environment and identification of RHOB as a direct transcriptional target. *PLoS One.* 2012; 7:e49887.
 29. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1796:75–90.
 30. Hu R, Lu C, Mostaghel EA, Yegnasubramanian S, Gurel M, Tannahill C, Edwards J, Isaacs WB, Nelson PS, Bluemn E, Plymate SR, Luo J. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 2012; 72:3457–3462.
 31. Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol.* 2004; 48:463–476.
 32. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S. Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene.* 2007; 26:4453–4463.
 33. Panda DK, Miao D, Lefebvre V, Hendy GN, Goltzman D. The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:41229–41236.
 34. Ren D, Wang M, Guo W, Zhao X, Tu X, Huang S, Zou X, Peng X. Wild-type p53 suppresses the epithelial-mesenchymal transition and stemness in PC-3 prostate cancer cells by modulating miR145. *Int J Oncol.* 2013; 42:1473–1481.
 35. Sher YP, Wang LJ, Chuang LL, Tsai MH, Kuo TT, Huang CC, Chuang EY, Lai LC. ADAM9 up-regulates N-cadherin via miR-218 suppression in lung adenocarcinoma cells. *PLoS One.* 2014; 9:e94065.
 36. Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. miR379–410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J.* 2014; 33:906–920.
 37. Wang D, Garcia-Bassets I, Benner C, Li W, Su X, Zhou Y, Qiu J, Liu W, Kaikkonen MU, Ohgi KA, Glass CK, Rosenfeld MG, Fu XD. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature.* 2011; 474:390–394.
 38. Lu J, Lonergan PE, Nacusi LP, Wang L, Schmidt LJ, Sun Z, Van der Steen T, Boorjian SA, Kosari F, Vasmatazis G, Klee GG, Balk SP, Huang H, et al. The cistrome and gene signature of androgen receptor splice variants in castration resistant prostate cancer cells. *J Urol.* 2015; 193:690–698.
 39. Chan SC, Selth LA, Li Y, Nyquist MD, Miao L, Bradner JE, Raj GV, Tilley WD, Dehm SM. Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:5880–5897.
 40. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42:813–827.
 41. Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Kessler P, Cruchant M, Serra S, Bergerat JP, Ceraline J. Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 617:529–534.
 42. Jennbacken K, Tesan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, Welen K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17:469–479.
 43. Sun Y, Wang BE, Leong KG, Yue P, Li L, Jhunjhunwala S, Chen D, Seo K, Modrusan Z, Gao WQ, Settleman J, Johnson L. Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res.* 2012; 72:527–536.
 44. Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, Shimomura T, Fazli L, Wada R, Huang J, Vessella RL, An J, Horvath S, Gleave M, et al. Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med.* 2010; 16:1414–1420.
 45. Miao L, Yang L, Li R, Rodrigues DN, Crespo M, Hsieh JT, Tilley WD, de Bono J, Selth LA, Raj GV. Disrupting androgen receptor signaling induces Snail-mediated epithelial-mesenchymal plasticity in prostate cancer. *Cancer Res.* 2017; 77:3101–12.
 46. Colas E, Muinelo-Romay L, Alonso-Alconada L, Llauro M, Monge M, Barbazan J, Gonzalez M, Schoumacher M, Pedrola N, Ertekin T, Devis L, Ruiz A, Castellvi J, et al. ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. *Oncogene.* 2012; 31:4778–4788.

47. Shen G, Lin Y, Yang X, Zhang J, Xu Z, Jia H. MicroRNA-26b inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting USP9X. *BMC Cancer*. 2014; 14:393.
48. Song C, Chen H, Wang T, Zhang W, Ru G, Lang J. Expression profile analysis of microRNAs in prostate cancer by next-generation sequencing. *Prostate*. 2015; 75:500–516.
49. Yang X, Yang Y, Gan R, Zhao L, Li W, Zhou H, Wang X, Lu J, Meng QH. Down-regulation of mir-221 and mir-222 restrain prostate cancer cell proliferation and migration that is partly mediated by activation of SIRT1. *PLoS One*. 2014; 9:e98833.
50. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013; 14:R36.
51. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9:357–359.
52. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015; 31:166–169.
53. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010; 11:R106.
54. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15:550.
55. Benjamini Y HY. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1995; 57(B):289–300.
56. Chen CJ, Servant N, Toedling J, Sarazin A, Marchais A, Duvernois-Berthet E, Cognat V, Colot V, Voinnet O, Heard E, Ciaudo C, Barillot E. ncPRO-seq: a tool for annotation and profiling of ncRNAs in sRNA-seq data. *Bioinformatics*. 2012; 28:3147–3149.
57. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009; 10:R25.

Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer

Supplementary Materials

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

To study the importance of DNA binding properties of AR variants for upregulation of N-cadherin, cysteine in position 576 was substituted to a tyrosine to yield to the AR-V7-C576Y mutant. This mutant was unable to bind DNA. Briefly, the mutation was introduced in AR-V7 sequence using the following polymerase chain reaction (PCR) primers: a HindIII site-linked primer containing the G2845A mutation 5'GCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTC ACTATGGAGCTCTCACAT ATGGAAGCTCAA3' (NM_000044.3; nucleotides 2784-2853) as the forward primer and a BamHI site-linked primer 5'CAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCCTTTCTTCAG GGTCTGGTCATTTTGAGATGCTTGCAATTGC 3' (FJ235916.1; nucleotides 2230-2272 in italics; U57607.1; nucleotides 1387-1409 underlined) as the reverse primer. pE-AR-V7-C576Y and pEGFP-AR-V7-C576Y were constructed from previously described pE-AR-V7 and pEGFP-AR-V7 respectively, by replacing the HindIII/BamHI fragment with the C576Y mutant sequence using In fusion® HD Cloning Kit (Clontech).

For luciferase assay, the *CDH2* promoter (NC_000018.10, position 28177782-28177023) and intron 1 *CDH2* genomic sequence (NC_000018.10, position 28157248-28156350) containing 13 AREs were inserted into pGL4.14 vector (Promega) to yield to the pARE_CDH2luc plasmid. *CDH2* promoter and intron 1_ *CDH2*_ARE sequences were amplified from genomic DNA of LNCaP cells using the following primers: the forward primer incorporating KpnI restriction site 5'TATTATGGTACCACGGAGCCGCGCGGGAG AGACCGC3' and the reverse primer incorporating Hind III restriction site 5'TATTATAAGCTTGGAGG

CGGAG AGGGGCCGAGCGAAGA3' for promoter; the forward primer with BamHI restriction site 5'TATTATGGATCCTATAAGCGTGTTCAGTCTCTG CTG3' and the reverse primer with SalI restriction site 5'TATTACGTCGACGGACAAAAATCTGGGTCAAAA TCTGGG3' for ARE sequence. The amplicons were cloned by ligation into pGL4.14 vector between KpnI/HindIII and BamHI/SalI for *CDH2* promoter and ARE sequence respectively.

Transient transfection

LNCaP cells were transfected using JetPEI™ (Polyplus Transfection, Ozyme) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 2.5×10^5 LNCaP cells were seeded in 6-wells plates and transfected three days later with 3 µg of pE-AR-V7 or pE-AR-V7-C576Y plasmid using 6 µL of JET-PEI (Polyplus Transfection, Ozyme). Cells were incubated during 4 days in complete medium supplemented with 10 nM dihydrotestosterone (DHT) and RNA was isolated using NucleoSpin® RNA II assay (Macherey-Nagel).

Luciferase assay

LNCaP cells (1.5×10^4 /well) were plated in 96-wells plates for three days. Cells were then co-transfected with 75 ng of pE-AR-V7 or pE-AR-V7-C576Y, 150 ng of luciferase reporter plasmid pARE_CDH2luc and 7.5 ng of Renilla luciferase plasmid as an internal control using 0.5 µL of JET-PEI/well. Twenty-four hours after transfection, medium was replaced with phenol red-free RPMI 1640 containing 5% charcoal-stripped FBS (CSS) with 10 nM DHT. Firefly and Renilla luciferase activities were measured 72 h after transfection using Dual-Glo Luciferase Assay according to the manufacturer's protocol (Promega).

Supplementary Table 1: Sequence of primers used for cloning of pLVX-TRE3G-AR

Name	Sequence	Position Information
FOR-LVXTRE3G	5' <i>TCTTATACTTGGATCCATGGTGA</i> GCAAGGGCGAGGAGCT 3'	pLVX-TRE3G: nucleotides 2576-2561 in italics; EGFP sequence in bold characters
REV-LVX_WT	5' <i>ATTCCATATGACGCGTTC</i> ACTGG GTGTGGAAATAGA 3'	pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; NM_000044.3: nucleotides 3859-3879 in bold characters
REV-LVX_Q640X	5' <i>ATTCCATATGACGCGTCTATAG</i> TTTCAGATTACCA 3'	pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; NM_000044.3: nucleotides 3020-3038 in bold characters
REV-LVX_V7	5' <i>ATTCCATATGACGCGTTCAGGG</i> TCTGGTCATTTTGA 3'	pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; FJ235916.1: nucleotides 2246-2266 in bold characters

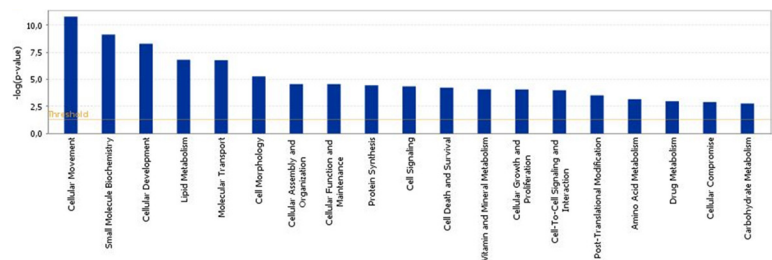
BamHI (lane 1) and MluI (lanes 2,3,4) restriction sites were underlined.

Supplementary Table 2: List of primers used for qRT-PCR

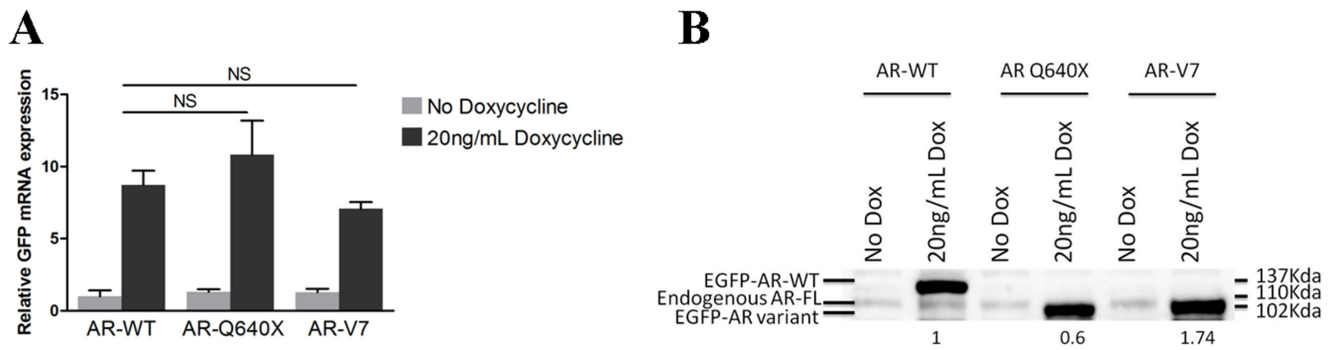
Name	Genbank or Sanger Accession	GeneGlobe Reference/Sequence	Position or Exons	Amplicon length (bp)
<i>β-ACTIN (ACTB)</i>	NM_001101	QT01680476	NA	104
<i>N-CADHERIN (CDH2)</i>	NM_001792	QT00063196	14/15	102
<i>ETV5</i>	NM_004454.2	QT0009485	7/8	89
<i>GFP</i>	NA	QT01171611	NA	NA
<i>PBGD (HMBS)</i>	NM_000190	QT00014462	7/8/9	107

Supplementary Table 3: Sequence of primers used for ChIP experiment

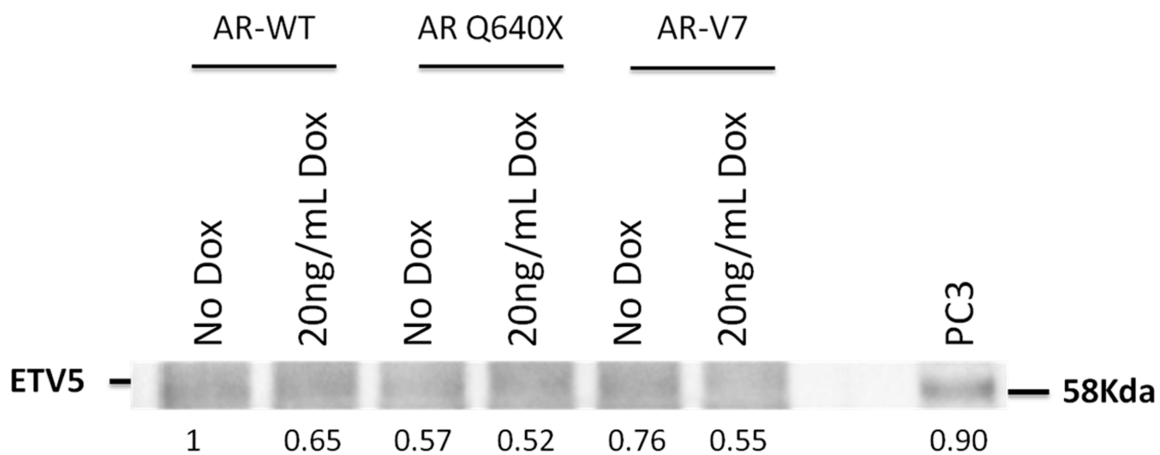
Name	Sequence	Accession number	Position	Amplicon length (bp)
ARE of <i>CDH2</i> forward	5' AGACCCAGATTTTGACCCAG 3'	NC_000018.10	28156379–28156360	97pb
ARE of <i>CDH2</i> reverse	5' CAGGAACCTGCAAACTGTTGA 3'	NC_000018.10	28156282–28156302	
Promoter of <i>β-GLOBIN</i> forward	5' AGGACAGGTACGGCTGTCATC 3'	NC_000011.10	5227207–5227187	90pb
Promoter of <i>β-GLOBIN</i> reverse	5'TTTATGCCAGCCCTGGCTC 3'	NC_000011.10	52277098–5227117	



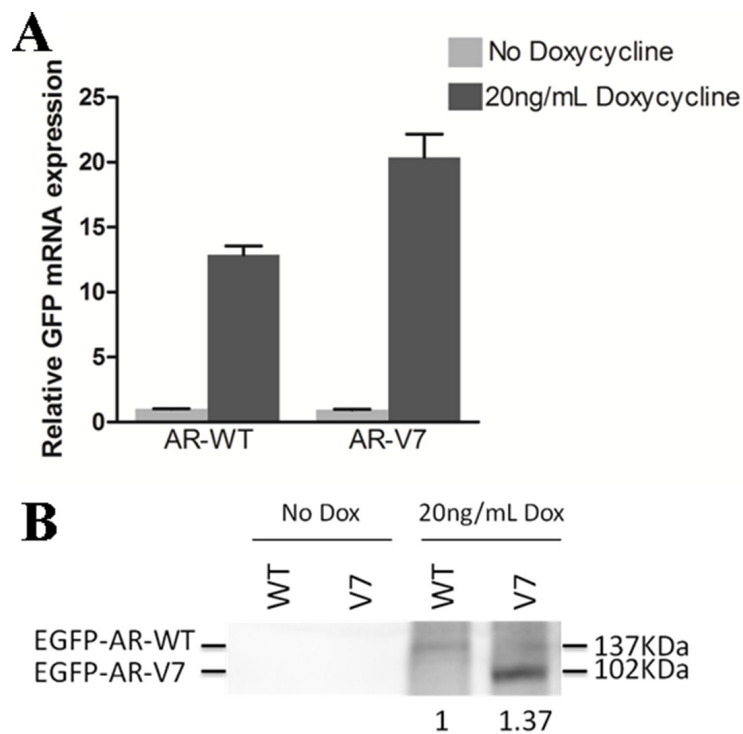
Supplementary Figure 1: Functional analysis of deregulated genes in the presence of AR-V7. RNA-seq analysis was performed in LNCaP cells overexpressing AR-WT and AR-V7. From this experiment, we identified 751 upregulated genes and 108 downregulated genes in cells overexpressing AR-V7 compared to AR-WT (log2Fold-Change >1 and adjusted p-value for multiple testing $P < 0.05$). The list of deregulated genes was uploaded in IPA software to check altered functions in the presence of AR-V7. Interestingly, the expression of AR-V7 affects functions involved in cellular movement or cell morphology.



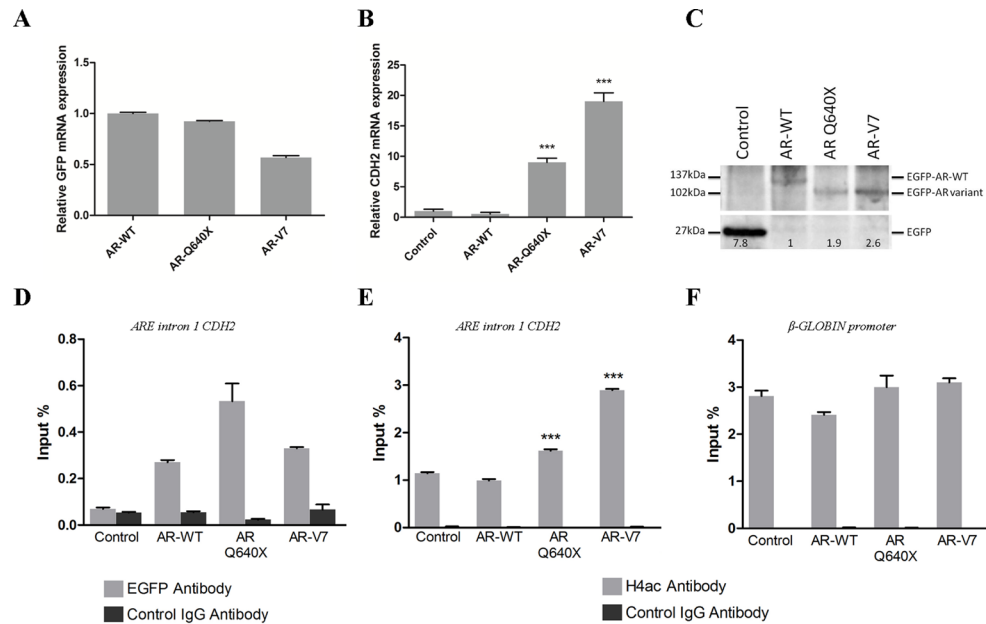
Supplementary Figure 2: Expression of AR-WT, AR-Q640X and AR-V7 using lentiviral inducible system. The Lenti-X™ Tet-ON® 3G Inducible Expression System was used to generate a tetracycline-regulated AR expression system in the LNCaP cells. AR-WT, AR-Q640X and AR-V7 expression were induced with 20 ng/mL of doxycycline. **(A)** After 4 days of induction by doxycycline, EGFP RNA level was analyzed by qRT-PCR. **(B)** A Western Blot using TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Gel was performed to assess AR protein levels. Total protein normalization (indicated at the bottom of each lane) was quantified according the manufacturer's protocol and reported as a relative value to doxycycline induced AR-WT. Western Blot image was cropped to eliminate the parts containing no information. NS: Not statistically significant.



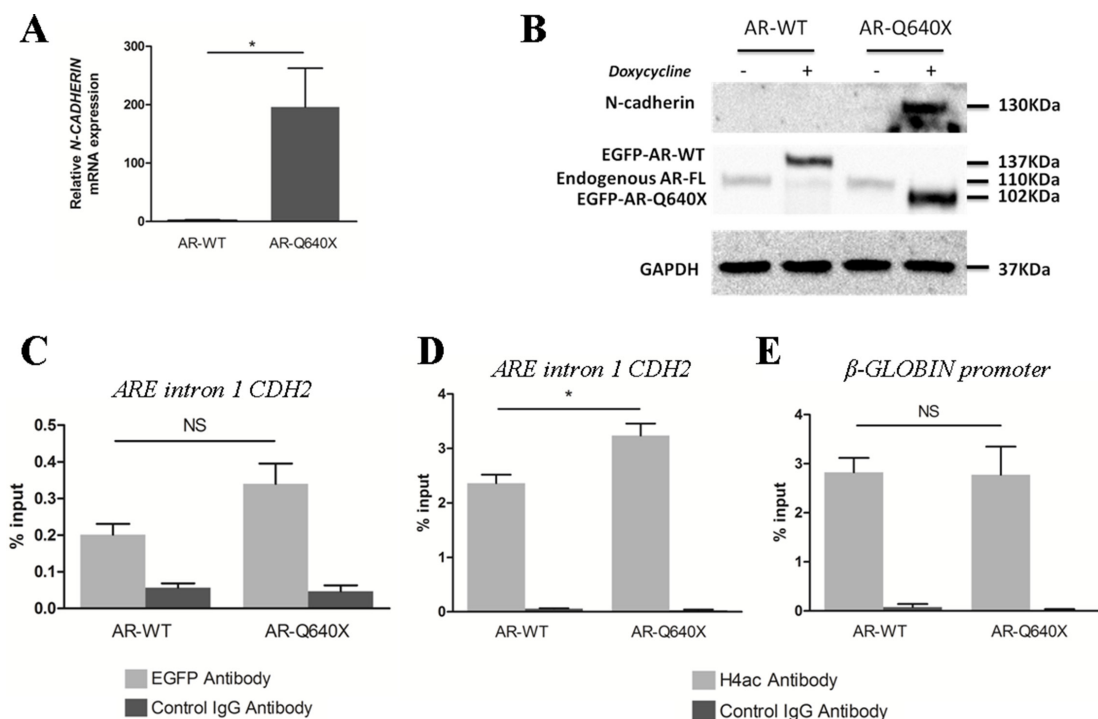
Supplementary Figure 3: ETV5 expression in the presence of AR-WT or AR variants. AR-WT and AR variants were induced with 20 ng/mL of doxycycline and proteins were extracted after 4 days of induction. A Western Blot (cropped image) using TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Gel was performed to assess ETV5 protein expression level. Prostate cancer cells PC3 were used as positive control for ETV5 expression.



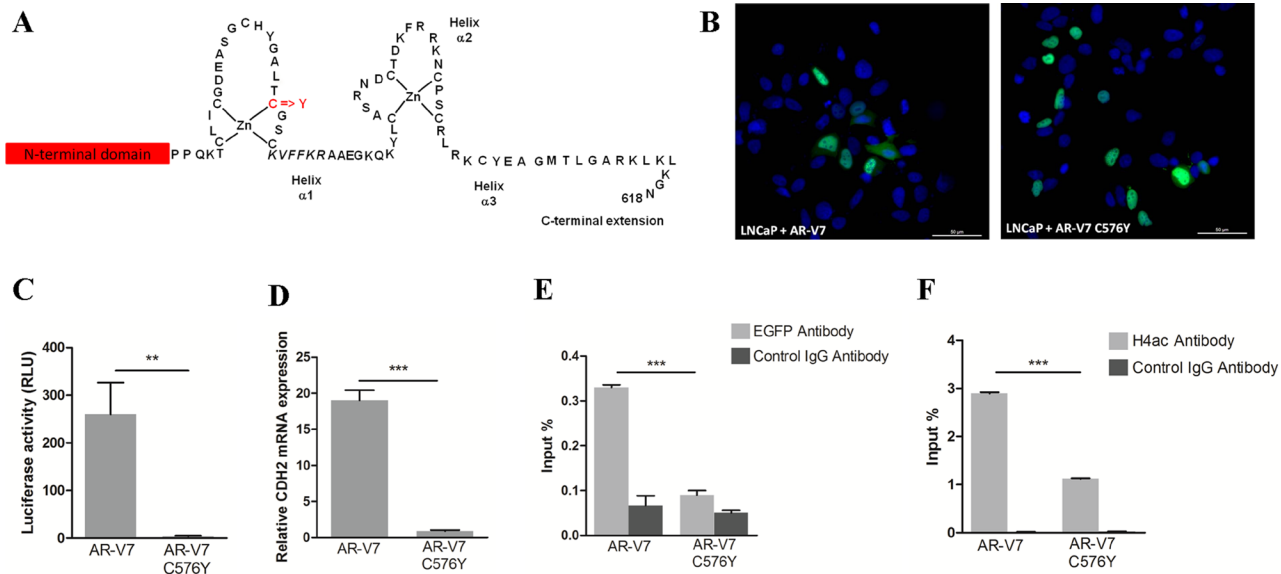
Supplementary Figure 4: AR-WT and AR-V7 expression after doxycycline induction. EGFP-AR-WT and EGFP-AR-V7 were induced using 20 ng/mL of doxycycline. Twenty-four hours after induction, GFP expression was analyzed by qRT-PCR (**A**) or by Western Blot from chromatin extracts (**B**). A band at 137 KDa and 102 KDa was respectively detected in lane 3 (AR-WT) and lane 4 (AR variants) attesting the absence of degradation of AR. No band was detected in non-induced LNCaP cells used as negative control. For Western Blot, TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide gel was used and total protein normalization (indicated at the bottom of each lane) was performed according the manufacturer's protocol. Western Blot image was cropped to only show the region containing AR bands.



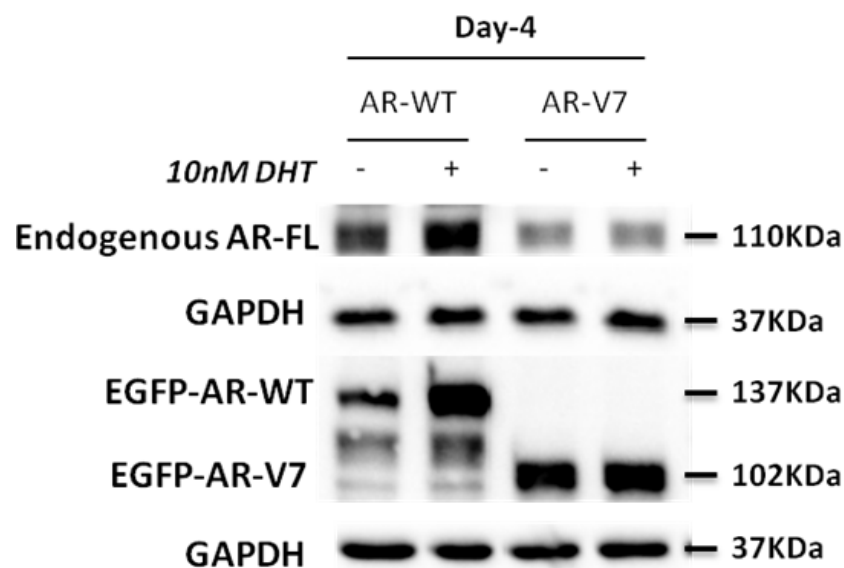
Supplementary Figure 5: AR variants bind to ARE in intron 1 of *CDH2* and are associated with increased histone H4 acetylation in LNCaP cells. LNCaP cells were transduced with lentivirus expressing AR-WT, AR variants (AR-Q640X; AR-V7) or EGFP (Control). Transduced cells were cultured in complete medium supplemented with 10 nM DHT. After 72 h, qRT-PCR was performed to verify the expression level of GFP (**A**) and *CDH2* (**B**). The $\Delta\Delta C_t$ method was used to calculate relative expression and the results were presented as the mean of $\Delta\Delta C_t \pm$ SEM. *** $P < 0.001$, two-tailed Student's t -test. (**C**) Western Blot analysis from chromatin extracts using EGFP antibody. Intensity of each band was normalized to total proteins using TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide gel and indicated at the bottom of each lane. Image was cropped to only show the part of the blot containing AR bands. (**D**) Binding of AR-WT and AR variants to AREs in *CDH2* intron 1 was assessed by ChIP experiment using anti-EGFP antibody and analyzed by real-time PCR. Acetylation level at AREs in *CDH2* intron 1 (**E**) and β -*GLOBIN* promoter (**F**) was assessed by ChIP experiment using anti-Acetyl H4 (H4ac) antibody and examined by qPCR with specific primers. EGFP and histone H4 acetylation level at AREs in *CDH2* intron 1 and β -*GLOBIN* promoter were normalized by input. *** $P < 0.001$.



Supplementary Figure 6: AR-Q640X variant binds to ARE in intron 1 of *CDH2* and leads to an increased histone H4 acetylation level in C4-2B cells. C4-2B cells were transduced with inducible EGFP-AR-WT and EGFP-AR-Q640X lentiviral particles. The expression of AR-WT and AR-Q640X was induced with 20 ng/mL of doxycycline and cells were cultured in the presence of 10 nM DHT. mRNA and protein extractions were performed 72 h after induction to analyze N-cadherin and AR expression by qRT-PCR (A) and Western Blot (cropped image) (B). (C) ChIP-qPCR experiment was conducted with anti-EGFP antibody to analyze AR-WT and AR-Q640X recruitment at ARE in *CDH2* intron 1. (D) H4 acetylation level in C4-2B cells expressing AR-WT or AR-Q640X was analyzed at ARE in *CDH2* intron 1 using anti-Acetyl H4 (H4ac) antibody. (E) H4 acetylation level was determined at β -GLOBIN promoter as control. * $P < 0.05$, NS: Not statistically significant.



Supplementary Figure 7: N-cadherin upregulation requires AR functional DNA binding domain. (A) Schematic representation of AR-V7 C576Y. This variant contains a mutation in position 576 (cysteine → tyrosine) in DNA binding domain. (B) Subcellular location of EGFP-AR-V7 or EGFP-AR-V7 C576Y was assessed by fluorescence microscopy 24 h after transient transfection of LNCaP cells. AR-V7 and AR-V7 C576Y were both located in the nucleus, suggesting that translocation properties of AR variants were not impaired in the presence of C576Y mutation. (C) LNCaP cells were co-transfected with pE-AR-V7 or pE-AR-V7 C576Y and pARE_CDH2luc reporter and cultured in phenol red-free RPMI 1640 containing 5% charcoal-stripped FBS (CSS) with 10 nM DHT. Luciferase activities were measured 72 h after transfection. The luciferase activity was normalized to the Renilla luciferase activity, and the results are presented as means ± SEM. Contrary to AR-V7, AR-V7 C576Y was unable to induce a luciferase activity. ** $P < 0.01$. (D) N-cadherin (*CDH2*) expression was analyzed by qRT-PCR in LNCaP cells expressing AR-V7 or AR-V7 C576Y. *CDH2* mRNA expression level was normalized to *PBGD*. Relative expression is presented as the mean ± SEM from three independent experiments. (E, F) LNCaP cells were transduced with lentivirus expressing AR-V7 or AR-V7 C576Y and cultured in complete medium supplemented with 10 nM DHT. After 72 h hours, AR recruitment at AREs (E) and histone H4 acetylation level (F) were assessed by ChIP-qPCR. *** $P < 0.001$.



Supplementary Figure 8: Downregulation of AR-FL in the presence of AR variants. EGFP tagged AR-WT and AR-V7 expression were induced with 20 ng/mL doxycycline and cells were maintained in medium containing 5% charcoal stripped serum supplemented with 10 nM of DHT or EtOH as control during 4 days. Endogenous AR-FL and transgene expression was analyzed by Western Blot using respectively a specific antibody targeting the C-terminal extremity of AR (AR-C19 antibody) or EGFP. GAPDH was used as a loading control. Western Blot image was cropped to only show the regions of interest.

3) Conclusion

Les résultats de cette publication illustrent l'action différente des formes longues du RA et des variants constitutivement actifs en ce qui concerne la régulation de la N-cadhérine. En effet, bien que les expériences de ChIP aient mis en évidence une fixation égale des variants RA-Q641X et RA-V7 et du RA sauvage au niveau des ARE contenus dans l'intron 1 du gène *CDH2*, seule la présence des variants constitutifs est associée à une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H4 dans cette région du génome. Cette modification post-traductionnelle de l'histone H4 est une marque activatrice de la transcription. Ainsi, ces données suggèrent que l'un des mécanismes permettant l'expression de la N-cadhérine passe par la formation d'un complexe de co-activateurs possédant une activité histone acétyltransférase par les variants du RA, complexe que le RA entier ne serait pas capable de recruter au niveau de ces ARE.

De plus, comme en témoignent les résultats de PCR quantitative (qPCR) et de Western Blot, l'expression des variants constitutifs est également associée à une diminution du RA entier endogène des cellules LNCaP. La répression de ce récepteur pourrait potentialiser l'action régulatrice des variants. En effet, une diminution du RA endogène pourrait être associée à une moindre liaison au niveau des ARE du gène *CDH2*, laissant ainsi la place aux variants constitutivement actifs.

D'autres mécanismes de régulation ont été étudiés dans cette publication. Ainsi, le rôle de SOX9 et ETV5 (*ETS variant 5*), deux facteurs de transcription potentiellement régulateurs de la N-cadhérine, a été investigué. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque impact de ces facteurs sur l'expression du gène *CDH2* dans notre modèle cellulaire. De la même manière, l'analyse des micro-ARN miR-221-3p et miR-26b-5p n'a pas permis de souligner leur importance dans ce processus de régulation.

L'ensemble de ces résultats suggère que la liaison des variants constitutivement actifs du RA aux ARE de l'intron 1 du gène *CDH2* est un prérequis pour l'induction de l'expression de la N-cadhérine. Cet hypothétique mode d'action direct est à confronter à la cinétique d'expression de la N-cadhérine en présence de ces variants qui témoigne plutôt d'un événement tardif (Cottard et al., 2013). En effet, dans le modèle cellulaire inductible des variants constitutifs du RA utilisé, seule une faible expression ARN de la N-cadhérine a pu être mise en évidence après 24 heures d'induction à la doxycycline. Ainsi, nous pourrions concevoir que tous les facteurs nécessaires à l'expression de la N-cadhérine ne sont pas présents au temps T0. La première vague d'activité transcriptionnelle des variants

constitutifs du RA pourrait donc conduire à un environnement chromatinien favorable à l'induction de l'expression de la N-cadhérine par liaison directe de ces derniers aux ARE de l'intron 1 de *CDH2*.

III. Analyse transcriptionnelle

1) Introduction

Les résultats précédents ont permis de mettre en évidence l'effet différent du RA sauvage et des variants constitutivement actifs sur l'expression de certains gènes tels que *CDH2*. De plus, il est décrit dans la littérature qu'ils sont également associés à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression tumorale comme *UBE2C* (*Ubiquitin conjugating enzyme E2 C*), *C-MYC*, *CDK1* ou encore les marqueurs mésenchymateux *SNAIL*, *ZEB1* ou *TWIST* (Cottard et al., 2013; Hörnberg et al., 2011; Hu et al., 2012; Kong et al., 2015; Sun et al., 2014).

De manière à mieux déterminer l'impact de ces variants sur le transcriptome des cellules cancéreuses prostatiques, un RNA-seq a été réalisé dans un modèle d'expression inductible du RA sauvage, du variant RA-Q641X ou du variant RA-V7. Le plan d'expérimentation permet ainsi de comparer l'activité de deux formes tronquées du RA et de mieux caractériser leurs fonctions génomiques en analysant les gènes différentiellement exprimés par rapport au RA sauvage.

2) Publication 2

[Transcriptional landscapes of constitutively active androgen receptor variants in prostate cancer](#)

Pauline Ould Madi - Berthélémy, Eva Erdmann, Edwige Schreyer, Mathieu Jung, Zoe Angel, Bruno Kieffer and Jocelyn Céraline.

En cours de soumission - Scientific Report.

Transcriptional landscapes of constitutive androgen receptor variants in prostate cancer

Pauline Ould Madi - Berthélémy¹, Eva Erdmann¹, Edwige Schreyer¹, Mathieu Jung¹, Zoe Angel², Bruno Kieffer¹ and Jocelyn Céraline¹.

¹ CNRS UMR 7104 - INSERM U1258 - IGBMC - University of Strasbourg - FRANCE.

² Genomic Medicine Research Group - BMSRI - Ulster University - UNITED KINGDOM.

Abstract

The androgen receptor (AR) signaling remains the key therapeutic target in metastatic prostate cancer (PCa). However, development of castration resistant PCa is frequently observed and can be in part attributed to the expression of mutant AR variants, which lack the ligand binding domain and are thus constitutively active. These constitutive AR variants have been associated with castration resistance but also with tumor progression. However, little data is available regarding their transcriptional activities. In this study, we depicted the transcriptional landscapes of the two constitutive AR variants AR-Q641X and AR-V7 by whole transcriptome sequencing and Gene Set Enrichment Analysis. Results showed that both shared a common transcriptome with wild-type AR but the two variants also induced additional cancer-regulating genes, including genes linking differentiation, epithelial-mesenchymal transition, and inflammation, which sheds light on their role in tumor progression. However, since their transcriptomes did not fully overlap, they may each evoke a different cellular response. We hypothesize that the constitutive AR variants have different transcriptomic effects, as a truncated form of the protein may affect recognition of DNA binding sites, or interaction with other cofactors.

Introduction

With an estimated 1.1 million diagnosed men worldwide in 2012, prostate cancer (PCa) remains the second most common cancer in men according to the GLOBOCAN project and is the fifth leading cause of death from cancer in men, which places it as a vitally important public health issue¹.

PCa cell growth and survival rely on the bio-availability of androgens, like testosterone and its derived dihydrotestosterone (DHT), whose action is mediated by the androgen receptor (AR). The AR is a ligand dependent transcription factor that belongs to the nuclear receptor superfamily. In a schematic view, in the absence of a ligand, the AR is localized in the cytoplasm, complexed with chaperon proteins that maintain it in a ligand-binding competent state^{2,3}. Upon androgen binding, the AR undergoes conformational and structural changes leading to the disruption of the AR-chaperon complex, the unmasking of the NLS and its nuclear translocation. In the nucleus, the AR recognizes androgen response elements and recruits co-regulators in order to regulate the transcription of target genes by RNA polymerase II^{4,5} (Fig. 1A). This pathway represents the AR canonical mechanism; however, AR has additional non-genomic activities by interacting with other signaling pathways in the cytoplasm. For instance, AR acts as cofactor for Src to regulated ERK and PI3K/AKT signaling^{6,7}.

Due to the hormone-dependency of PCa, the AR is an important therapeutic target in metastatic disease with androgen deprivation therapy as the main treatment. However, although this therapy is initially effective, the effects are transient and patients relapse after a mean period of 2 to 3 years⁸. Many mechanisms can explain the PCa progression despite ADT, which culminates in an androgen-independent state named castration resistant PCa (CRCP). Although some non-AR mechanisms have been reported⁸, most of them still involve abnormalities in the androgen axis, such as the overexpression of AR or its cofactors, inappropriate activation by growth factors or cytokines, increased production of intratumoral and adrenal androgens or AR variants. Among the AR variants, some mutations lead to AR activation by other ligands (e.g. AR-T878A, AR-W742C, AR-702H) and some others lead to constitutive activity of the receptor⁸⁻¹³.

Constitutively active AR variants arise from nonsense mutations localized in exon 4, such as AR-Q641X¹⁴⁻¹⁷ or from alternative splicing, such as AR-V7¹⁸⁻²¹. Both events lead to truncated proteins lacking the LBD, which explains their constitutive activity^{15,16,18} (Fig. 1B). Supporting resistance to treatment in an ADP context, these autonomous AR variants play an important role in CRPC^{15,19,22-25}. Furthermore, they may play a critical role in PCa progression. Indeed, AR-Q641X and AR-V7 induced the overexpression of mesenchymal markers like N-cadherin, Vimentin, SNAIL and ZEB1 in PCa cells and lead to a partial epithelial-mesenchymal transition²⁶⁻²⁸. Besides, autonomous AR variants upregulated TWIST expression in a mouse model²⁹. In addition, AR-V7 promoted cell migration in wound healing and Boyden chamber experiments and favored spheroid formation of PCa cells^{27,29}. Moreover, expression of MDH1 and OGDH was described in AR-V7 cells and could be associated with increased growth in an oxygen-depleted environment by enhancing glutaminolysis for glucose metabolism³⁰.

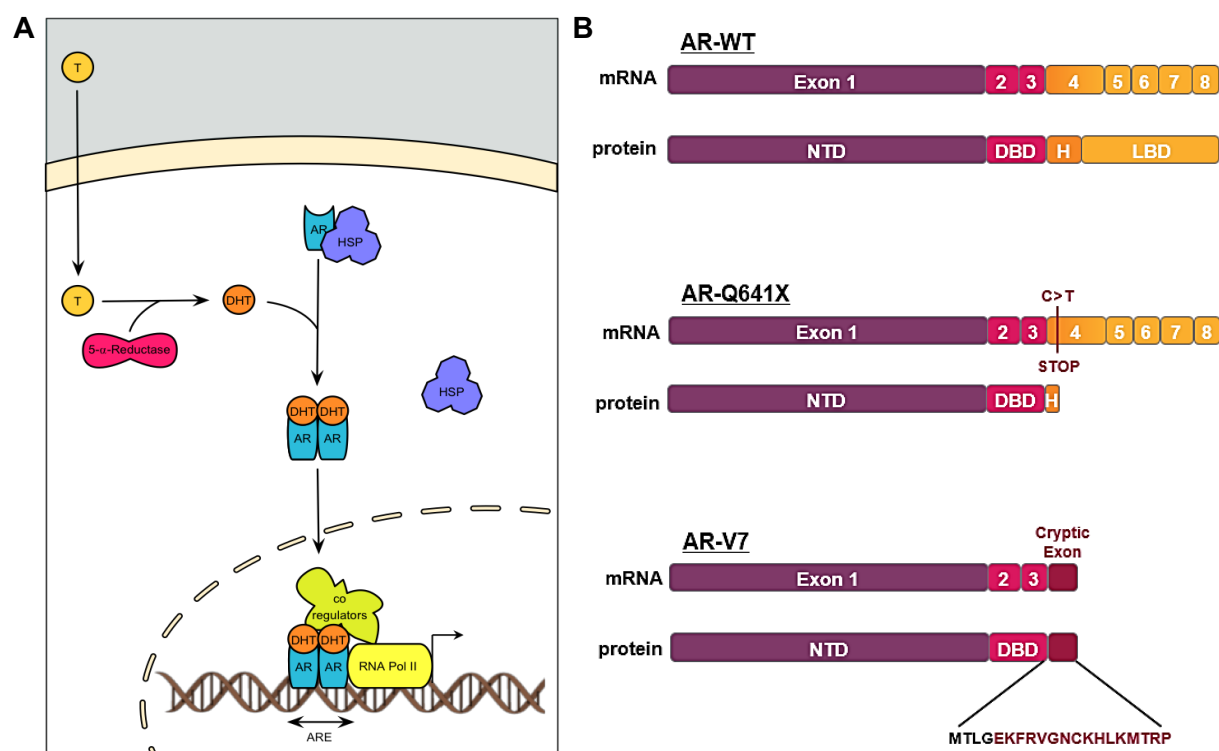


Figure 1. Schematic representation of wild-type AR (AR-WT) and constitutive AR variants AR-Q641X and AR-V7. **(A)** AR-WT canonical signaling pathway after DHT activation. **(B)** mRNA and protein of AR-WT, AR-Q641X which arises from a non-sense mutation and AR-V7 which is from a cryptic exon retention.

As a whole, these findings suggest that constitutively active AR variants are able to mimic AR full-length (AR-FL) but also confer gains of function mediated by the induction of specific sets of genes that are distinct from those activated by the AR-FL. However, little data is available with regard to constitutively active AR variant transcriptional activity. In this study, we present a transcriptional landscape of AR-Q641X and AR-V7 compared to AR-FL. Specific transcriptomes of autonomous AR variants revealed a partial common expression profile, including many cancer-associated or cancer-regulating genes. They were implied in various functions, notably the regulation of gene expression (e.g. transcription factors), supporting the idea of indirect effects of constitutively active AR variants.

Results

Analysis design. LNCaP cells were chosen for the RNA-seq experiment. These cells express an endogenous AR-FL containing the mutation T878A³¹. To run the transcriptome analysis, we selected the eGFP expressing cells treated with vehicle as a control condition and calculated the log₂(fold change) between this condition and the four following ones: eGFP or eGFP-AR-WT cells treated with DHT, eGFP-AR-Q641X cells or eGFP-AR-V7 cells treated with vehicle. These ratios enabled us to determine the impact of endogenous AR-FL, AR-WT, AR-Q641X and AR-V7, respectively. Then, to assess the difference between the AR-WT and the constitutive AR induced transcriptomes, we compared the AR-WT regulated genes with those regulated by AR-Q641X and AR-V7. The method and results are summarized in Fig. S1.

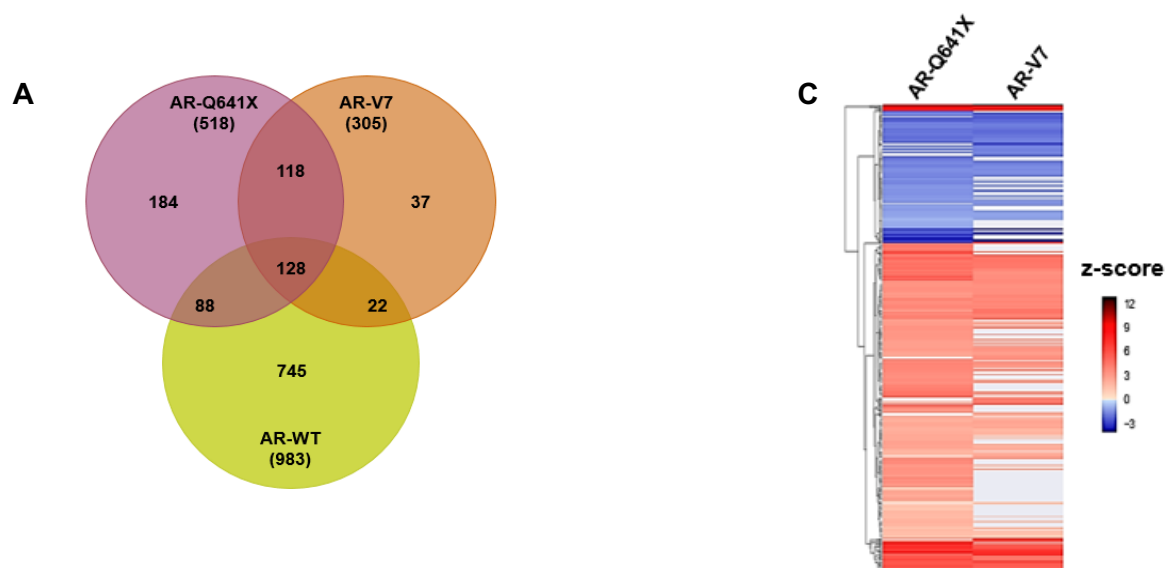
Experimental model validation. In order to determine the impact of DHT treatment on endogenous AR-FL of LNCaP cells, we performed the comparison between DHT or vehicle treated eGFP cells transcriptomes. In this way, 210 under-expressed and 390 over-expressed genes were observed (log₂(fold change) < -1 or > 1; p-value < 0.05) (Fig. S1, S2A, Supplementary file). To continue, we measured the transcriptional activity of AR-WT in presence of DHT or vehicle in eGFP-AR-WT expressing LNCaP cells. The AR-WT activation led to the down-regulation of 463 genes and the up-regulation of 520 genes (log₂(fold change) < -1 or > 1; p-value < 0.05) (Fig. S1, S2B, Supplementary file). By investigating these two lists of genes, we were able to confirm the regulation of known AR target genes such as Kallikein Related Peptidase 2 (*KLK2*), Kallikein Related Peptidase 3 (*KLK3*), FK506 Binding Protein 5 (*FKBP5*), Transmembrane Serine Protease 2 (*TMPRSS2*), Transmembrane 4 L Six Family Member 1 (*TM4SF1*), Prostate Transmembrane Protein Androgen Induced 1 (*PMEPA1*), NK3 Homeobox 1 (*NKX3-1*), 24-Dehydrocholesterol Reductase (*DHCR24*), Serine/Threonine Kinase 39 (*STK39*) and Dipeptidyl Peptidase 4 (*DPP4*) (Fig. S2C, S2D). Moreover, the enrichment analysis run in Gene Set Enrichment Analysis software (GSEA) showed that both of the two conditions were enriched in genes responding to androgens (Fig. S2E).

Differential transcriptomes of AR-WT and constitutive AR variants. By comparing the AR-WT regulated genes with the genes regulated by AR-Q641X and AR-V7, we highlighted that more than 40% of AR-Q641X regulated genes and near than 50% of the AR-V7 ones were common to those of DHT activated AR-WT condition (log₂(fold change) < -1 or > 1; p-value < 0.05) (Fig. 2A, Supplementary file). This also indicated that many genes were specifically regulated by the constitutive AR variants, supporting their gain of function and revealing that these variants have distinct transcriptional effects on the cells. ETS proto-oncogene 2 (*ETS2*)

and the endothelin 2 (*EDN2*), two genes previously described as specific AR-V7 targets³², appeared to be specifically expressed in the presence of AR-Q641X and AR-V7 in our model (Supplementary file).

Next, we used GSEA analysis to explore functions and pathways enhanced in each condition. It correlated the constitutive AR variants transcriptomes with an enrichment in epithelial-mesenchymal transition function, an observation which was in agreement with previously published data^{26,28}. Surprisingly, overexpression of both variants was associated with the loss of functions implicated in cell proliferation like E2F targets, G2M checkpoint or PI3K/AKT/mTOR signaling (Fig. 2B). This allowed us to hypothesize that AR variants expressing cells more likely undergo epithelial-mesenchymal transition and thus do not sustain a high proliferation rate. The loss of the spermatogenesis function further points towards a dedifferentiating process. This hypothesis needs further investigations to be confirmed. Furthermore, GSEA analysis revealed that AR-V7 was linked to the inflammatory response but not AR-Q641X.

This is the first time that two distinct constitutive AR variants transcriptomes were assessed in the same time in a cellular model, which enabled us to highlight the regulation of specific genes for each of them. Indeed, 272 genes were specific to the AR-Q641X condition and 49 to the AR-V7 condition ($\log_2(\text{fold change}) < -1$ or > 1 ; $p\text{-value} < 0.05$) (Fig. 2C, Supplementary file). Surprisingly, despite similarities in the protein structure of AR-V7 and AR-Q640X (Fig. 1B), the sets of genes dysregulated in each condition were strikingly different (Fig. 2A, 2C).



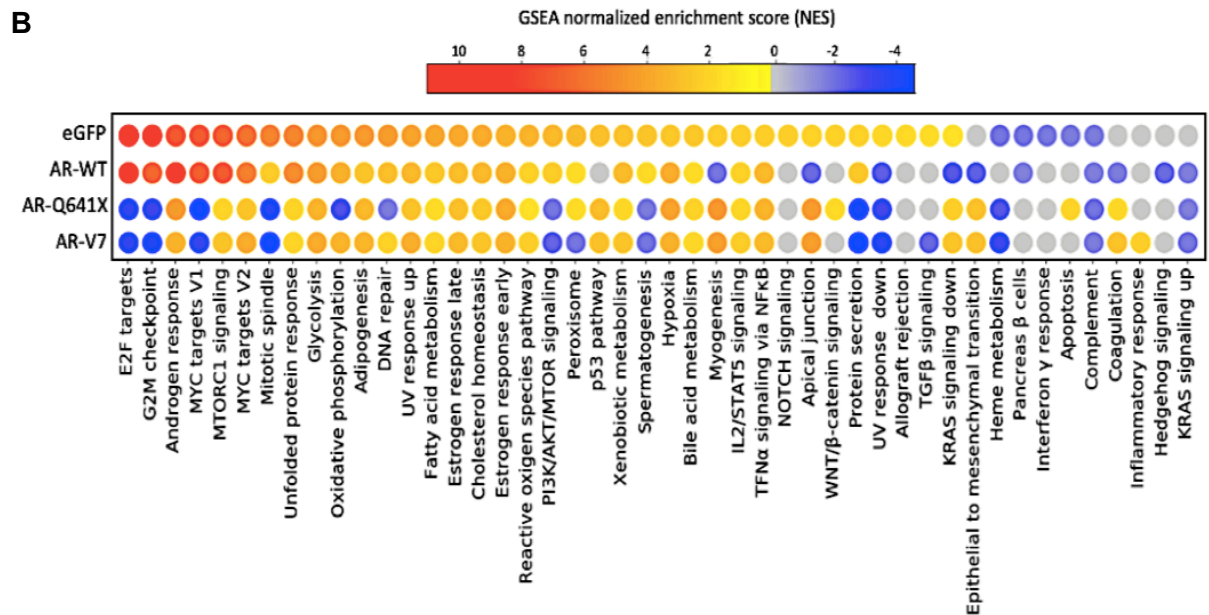


Figure 2. Differential transcriptome of AR-WT and constitutive AR variants AR-Q641X and AR-V7. **(A)** Schematic representation of regulated genes. **(B)** Functional enrichment analysis. **(C)** Hierarchical clustering of genes regulated by AR-Q641X and AR-V7. In **(B)** and **(C)**, P-values > 0.05 were colored in grey.

Regulation of transcription factors We previously showed that constitutive AR variants binding to the androgen response elements located in intron 1 of *CDH2*, the gene encoding N-cadherin, induced an increase of histone H4 acetylation from 24 hours of doxycycline induction, indicating a direct effect of these AR variants in N-cadherin regulation. However, in this cellular inducible model, the 24 hour time-point only induce a very few amount of this mesenchymal marker mRNA. This observation suggests that N-cadherin induction has more a delayed onset and that the first transcriptional wave of the constitutive AR variants may lead to an environment in favor of N-cadherin expression. Following this hypothesis, we decided to look at transcriptional regulators and more precisely at transcription factors. Expression of constitutive AR variants was associated with a switch in induced transcriptions factors. We observed that 32 transcription factors appeared regulated by AR-Q641X and 19 by AR-V7 but not by the endogenous AR of eGFP condition nor the AR-WT, 16 of them were common between the 2 AR variants ($\log_2(\text{fold change}) < -1$ or > 1 ; p-value < 0.05) (Fig. 3). These transcription factors could cooperate with the constitutive AR variants to induce the expression of their own transcriptome. Some of them have already been characterized in relation to cancer, such as the orphan nuclear receptor nuclear receptor subfamily 5 group A member 2

(*NR5A2*), CCAAT/enhancer-binding protein delta (*CEBPD*), Hes family BHLH transcription factor 1 (*HES1*), the nucleoside diphosphate kinase 2 (*NME2*), and *ETS2*.

	eGFP	AR-WT	AR-Q641X	AR-V7
Up-regulated genes	<i>SNAI2</i> , ZNF367, UHRF1, WWTR1, <i>TBX15</i> , ZNF492, E2F8, E2F7, ORC6, <i>HOPX</i> , <i>RUNX2</i> , E2F2, E2F1, CDCA7, TCF19, NKX3-1, TLR3, WDHD1, STIL, PCNA, ZNF724P, CDCA4, AFF3, CDK2, FBXO5, CDK1, ZNF695, CENPF, MCM8, MED30, ZNF530, C9orf40, FANCA, PLPP3, GMNN, LRP8, HMGB2, CHEK2	<i>TBX15</i> , RUNX1, <i>SNAI2</i> , RFX6, SLC26A3, CUX2, WWTR1, FHL2, <i>HOPX</i> , NKX3-1, MAF, SGK1, EGR1, ZNF367, <i>RUNX2</i> , <i>FOXD4</i> , TNFAIP3, <i>FOXD4L5</i> , TLR3, KLF5, ORC6, E2F7, TCF19, AFF3, E2F8, CDCA7, HMGB3, PRKCH, CTH, PLPP3, CREB3L4, <i>PSMA6</i> , ATF3, CDK2	<i>HOPX</i> , <i>SP6</i> , <i>FOXD4</i> , <i>SLC26A3</i> , <i>PER1</i> , <i>KLF15</i> , <i>TBX15</i> , <i>NR4A1</i> , <i>CEBPD</i> , ZNF541, <i>RFX6</i> , <i>ZBTB16</i> , ZGPAT, BHLHA15, PKD1, IL18R1, E4F1, IRF7, CAPN15, MAFK, <i>EGR1</i> , <i>NME2</i> , <i>ATOH8</i> , LMO7, <i>FOXD4L1</i> , <i>HES1</i> , SOX9, PDLIM1, <i>NR5A2</i> , <i>CEBPD</i> , <i>ETS2</i> , <i>RUNX2</i> , HMGB3, <i>PSMA6</i> , NFKBIA	<i>HOPX</i> , <i>FOXD4</i> , <i>KLF15</i> , <i>PER1</i> , <i>SLC26A3</i> , <i>RFX6</i> , <i>SP6</i> , <i>TBX15</i> , <i>NR4A1</i> , <i>ZBTB16</i> , THBS1, AKNA, <i>NR5A2</i> , <i>EGR1</i> , <i>CEBPD</i> , <i>ATOH8</i> , <i>NME2</i> , <i>SNAI2</i> , <i>FOXD4L5</i> , <i>FOXD4L1</i> , <i>HES1</i> , <i>ETS2</i>
Down-regulated genes	HOXC13, ETV5, <i>PBX1</i> , TOX3, LHX4, BHLHE41, CAMK1D, OPTN, MID1, <i>PGR</i> , DMRT1, IL1B, HDAC9	PARK2, ZBTB43, ZNF117, HOXA10, NR3C2, OPTN, LEF1, FZD4, TSHZ3, FBN1, ARNT2, IRX5, PAX1, <i>RELN</i> , ZNF629, MYB, HOXC13, <i>PBX1</i> , IRX3, <i>PELI1</i> , EBF2, HOXC9, SALL2, ZIC2, CAMK1D, SMARCD3, TRPS1, MID1, LHX4, TOX3, DLX3, LHX9, BHLHE41, DDR2, EOMES, DMRT1, <i>NKX1-2</i> , NFATC4, NR4A2, SMO, <i>PGR</i> , NR2F1, HDAC9, IL1B	<i>PBX1</i> , <i>RELN</i> , <i>ZNF624</i> , <i>PELI1</i> , <i>PGR</i> , <i>NKX1-2</i> , ZNF679	<i>PBX1</i> , <i>ZNF624</i> , <i>PELI1</i> , <i>RELN</i> , HDAC9, <i>PGR</i>

Transcription factors (Uniprot database):

■ Common between at least one control condition and one constitutive variant condition

■ Common between both constitutive variant conditions

Figure 3. Transcription factors (TF) identified in both sets of genes according to Uniprot database annotations. TF common between at least one control condition and one constitutive variant are represented in blue, TFs common to the constitutive AR variants are represented in red.

Discussion

Constitutive AR variants support castration resistance but they also promote tumor progression. Indeed, they have been associated with the expression of mesenchymal markers such as N-cadherin, vimentin, SNAIL and TWIST^{26,28,29}. Plus, they also favored cell migration^{27,28}. However, although both are mainly co-expressed in PCa samples³³, the impacts of constitutive AR variants are often investigated independently of full length AR. The present study provides an overview of their effects on AR transcriptome in a cellular model that takes into account the interplay between endogenous AR-FL and constitutive AR variants. We were able to highlight that both AR-WT and constitutive AR variants shared a common transcriptome but were also associated with the regulation of unique genes. Striking differences were observed between the transcriptome of cells expressing AR-Q641X and AR-V7, highlighting

the fact that each constitutive AR variant must be considered independently, with its own transcriptional activity and consequently its own impact on PCa cells.

Furthermore, the genes regulated by the AR variants were implied in various functions according to GSEA analysis. We observed the expression of a diverse range of types of AR-Q641X and AR-V7 transcriptomes seemed to be enriched in genes involved in epithelial-mesenchymal transition whereas they lost the functions of E2F targets or G2M checkpoint, pointing to a role in the regulation of cellular proliferation. Of particular interest was the switch in types of transcription factors that were regulated, which likely play an important role in shaping the constitutive AR genetic programs. AR-Q641X induced a switch with the expression of 25 transcription factors and AR-V7 regulated 12, among which 12 common ones. Some of them have well defined roles in cancer progression, such as *NR5A2* that has been shown to be involved in diverse pathways including differentiation, development, metabolism, and inflammation³⁴ and was upregulated by both variants in this experiment. *CEBPD* similarly links inflammatory signaling with metabolism and differentiation^{35–38} and was induced by both variants. *HES1* likewise has a well-known role in promoting a stem-like phenotype, regulating proliferation, migration, and metastasis, and in facilitating drug resistance^{39–42}. Upregulation of these factors may help explain to the increased malignancy observed in tumors with high expression of the AR variants. *NME2* is an enhancer of C-Myc⁴³ and was correlated with aggressiveness in neuroblastoma⁴⁴ and chronic myeloid leukemia⁴⁵, although conversely it was reported to suppress lung metastasis⁴⁶ and promote malignant behavior in gastric cancer cells *in vitro*⁴⁷, and so appears to have tissue-specific effects. This is the first report of *NME2* upregulation in PCa cells overexpressing constitutive AR variants. Interestingly, the circadian clock factor period circadian protein homolog 1 (*PER1*) was also induced by both variants and has previously been shown to be induced by AR, to physically interact with AR, and then decrease its transcriptional activity⁴⁸. However, the relationship between *PER1* and constitutive AR variants activity remains uncharacterized. Finally, *ETS2* was induced by AR-Q641X and AR-V7. Several studies have shown that *ETS2* increases the growth and survival of PCa cells^{49,50} although *ETS2* is very commonly deleted in CRPC normally via *TMPRSS2:ERG* fusion and is also frequently mutated⁵¹, therefore the importance of *ETS2* in the development of CRPC is unclear.

The doxycycline-inducible cellular system is an improvement on traditional retro/lentiviral transduction models since the gene of interest could be induced at a precise time-point and it allowed us to design a robust set of control conditions. A limitation of our model was that we were unable to determine that there was no interference between the expression of endogenous AR-FL in the AR variants conditions, although it is arguably an accurate

representation of PCa cells in which both full-length and truncated forms are co-expressed in varying proportions³³. As with all transduction experiments, a further limitation was that the high levels of overexpressed AR may not be physiological. Finally, it has been described that constitutive AR variants and AR-FL can directly interact together and form heterodimers⁵². Plus, AR-V7 and AR-FL have been shown to both occupy the *PSA* promoter, whereas only AR-V7 was detected on the promoter of *UBE2C*⁵³. This underlines the complex interplay between constitutive AR variants and AR-FL. ChIP-seq and Re-ChIP experiments could help us to identify the differences between AR-FL and AR variants homodimers and AR-FL/AR variant heterodimers and to understand better the transcriptional switch occurring in the presence of constitutive AR variants.

Little proteomic data is available regarding AR-variants interaction partners. However, more than 300 were described for the AR-WT, near than 40 of which interacting with the ligand-binding domain⁵⁴. Then the loss of the ligand-binding domain by constitutive AR variants could impair these cofactors' recruitment. Indeed, SRC-2 has been shown to interact with AR-WT but not with AR-Q641X⁵⁵. Moreover, the increase of histone H4 acetylation upon constitutive AR variants binding to the *CDH2* androgen response elements²⁷ suggests the formation of an activation complex with histone acetyltransferase activity in the presence of AR-Q641X and AR-V7 but not AR-WT. Thus, to better characterize their mode of action, it could be interesting to depict the differential interactome of AR-WT and constitutive AR variants.

To conclude, our study provides evidence that constitutive AR variants impair the AR transcriptome in PCa cells. In addition to constitutive activity, and being untargetable by current androgen antagonists, expression of the AR variants is associated with the acquisition of additional behaviours. We identified unique transcriptional signatures including cancer-regulating genes and links between differentiation, epithelial-mesenchymal transition, and inflammation, which sheds light on the mechanisms through which AR variant expressing cells become increasingly malignant. The expression of genes distinct from those induced by AR-WT may be attributed to epigenetic modifications that result from the binding of a truncated form of the protein, which requires further clarification. These results also highlight that the transcriptomes of the constitutive variants do not fully overlap and each must be considered individually. Finally, there is an important need to better depict their mode of action regarding to their cistrome and their interactome in order to find new strategies to develop drugs targeting these variants in CRPC.

Materials and Methods

Cell culture. Inducible expression of eGFP-AR-WT, eGFP-AR-Q641X, eGFP-AR-V7 or eGFP alone as a control was obtained from stable transduced LNCaP cells, as previously described²⁷. Cells were maintained in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10% of Tet-System approved fetal bovine serum (BD biosciences), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich), 200 µg/mL geneticin and 400 ng/ml puromycin (Life Technologies).

RNA extraction. Stable transduced LNCaP cells were seeded in RPMI-1640 complete medium with fetal bovine serum and without geneticin and puromycin. After 48 hours of growth, cells were treated for 24 hours with 20ng/ml of doxycycline to induce eGFP or eGFP-AR expression and 10nM of DHT or ethanol (EtOH) as vehicle. Total RNA was isolated using Nucleospin[®] RNA II assay (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. This experiment was performed in three biological replicates for each condition.

Reverse Transcription and real-time PCR. Reverse transcription was conducted from 300ng of total RNA using iScript kit (Bio-Rad) as recommended by the manufacturer. Then, real-time PCR was performed with GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega) and validated primers for *eGFP* (QT01171611, Qiagen). *PBGD* (QT00014462, Qiagen) housekeeping gene expression was used to normalized the results according to the $2^{-\Delta C_t}$ method.

RNA seq. Library preparation and high-throughput sequencing on the Illumina HiSeq 4000 as Single-Read 50 base reads were performed by the GenomEast genomic platform (IGBMC, Illkirch, France). Reads were mapped onto hg38 assembly of human genome using Tophat v2.0.14⁵⁶ and bowtie2 v2.1.0 aligner⁵⁷. Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.6.1⁵⁸ and gene annotations from Ensembl release 84. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber⁵⁹ and then normalized according to the gene length. Comparisons of interest were performed using the method proposed by Love et al⁶⁰ implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 1.6.3) in order to obtain $\log_2$ (fold change) and corresponding p-values.

Statistics. qPCR results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of three observations. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed using GraphPad Prism version 4 and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. For the

RNA-seq data, Log2(fold change) results are expressed as the mean ratio of three observations for each condition. P-values were adjusted for multiple testing using the guideline of Benjamini and Hochberg⁶¹ and differences were considered statistically significant when p-value <0.05. Differentially expressed genes were defined according the following criteria: p-value <0.05 and log2(Fold Change) >1 or <-1.

Data analysis. All RNA-seq data analysis and visualization were performed in python⁶² using the panda, numpy, matplotlib and bokeh packages. Functional enrichment analysis was done in Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)^{63,64}. For each condition, RNA-seq data was organized in matrix by applying the following formula: $-\log_{10}(\text{p-value}) \times \text{sign of log}_2(\text{fold change})$. Results with nominal p-value <0.05 were considered significant and represented according to their GSEA normalized enrichment score. For the transcription factor analysis, the list of reference was determined according to Uniprot Database annotations.

Data availability. All data have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO).

References

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
2. Azad, A. A., Zoubeidi, A., Gleave, M. E. & Chi, K. N. Targeting heat shock proteins in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* **12**, 26–36 (2015).
3. Querol Cano, L., Lavery, D. N. & Bevan, C. L. Mini-review: Foldosome regulation of androgen receptor action in prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **369**, 52–62 (2013).
4. Basu, S. & Tindall, D. J. Androgen action in prostate cancer. *Androg. Action Prostate Cancer* **1**, 223–228 (2010).
5. Shang, Y., Myers, M. & Brown, M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell* **9**, 601–610 (2002).
6. Zarif, J. C. & Miranti, C. K. The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cell. Signal.* **28**, 348–356 (2016).
7. Baron, S. *et al.* Androgen Receptor Mediates Non-genomic Activation of Phosphatidylinositol 3-OH Kinase in Androgen-sensitive Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 14579–14586 (2004).
8. Wadosky, K. M. & Koochekpour, S. Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget* **7**, (2016).
9. Chen, Y., Clegg, N. J. & Scher, H. I. Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol.* **10**, 981–991 (2009).

10. Devlin, H. L. & Mudryj, M. Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.* **274**, 177–186 (2009).
11. Karantanos, T., Corn, P. G. & Thompson, T. C. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 5501–5511 (2013).
12. Perlmutter, M. A. & Lepor, H. Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev. Urol.* **9 Suppl 1**, S3-8 (2007).
13. Antonarakis, E. S. *et al.* AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1028–1038 (2014).
14. Bergerat, J. P. & Céraline, J. Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum. Mutat.* **30**, 145–157 (2009).
15. Céraline, J. *et al.* Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: A new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **108**, 152–157 (2004).
16. Lapouge, G. *et al.* Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation - A new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int. J. Cancer* **121**, 1238–1244 (2007).
17. Marcias, G. *et al.* Identification of novel truncated Androgen Receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory Prostate Cancer (PCa) cell line. *Hum. Mutat.* **31**, 74–80 (2010).
18. Dehm, S. M., Schmidt, L. J., Heemers, H. V., Vessella, R. L. & Tindall, D. J. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* **68**, 5469–5477 (2008).
19. Guo, Z. *et al.* A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* **69**, 2305–2313 (2009).
20. Hörnberg, E. *et al.* Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One* **6**, (2011).
21. Hu, R. *et al.* Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 16–22 (2009).
22. Li, Y. *et al.* Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* **73**, 483–489 (2013).
23. Mostaghel, E. A. *et al.* Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: Induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5913–5925 (2011).
24. Nadiminty, N. *et al.* NF- B2/p52:c-Myc:hnRNPA1 Pathway Regulates Expression of Androgen Receptor Splice Variants and Enzalutamide Sensitivity in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 1884–1895 (2015).
25. Xu, J. & Qiu, Y. Role of androgen receptor splice variants in prostate cancer metastasis. *Asian J. Urol.* **3**, 177–184 (2016).
26. Cottard, F. *et al.* Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression

- of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
27. Cottard, F. *et al.* Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer. *Oncotarget* **8**, 72008–72020 (2017).
 28. Kong, D. *et al.* Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *Prostate* **75**, 161–174 (2015).
 29. Sun, F. *et al.* Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J. Biol. Chem.* **289**, 1529–1539 (2014).
 30. Shafi, A. A. *et al.* Differential regulation of metabolic pathways by androgen receptor (AR) and its constitutively active splice variant, AR-V7, in prostate cancer cells. *Oncotarget* **6**, (2015).
 31. Veldscholte, J. *et al.* 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**, 534–540 (1990).
 32. Krause, W. C., Shafi, A. A., Nakka, M. & Weigel, N. L. Androgen receptor and its splice variant, AR-V7, differentially regulate FOXA1 sensitive genes in LNCaP prostate cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **54**, 49–59 (2014).
 33. Miyamoto, D. T. *et al.* RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science* (80-.). **349**, 1351–1356 (2015).
 34. Cobo, I. *et al.* Transcriptional regulation by NR5A2 links differentiation and inflammation in the pancreas. *Nature* **554**, 533–537 (2018).
 35. Cardinaux, J. R. & Magistretti, P. J. Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J. Neurosci.* **16**, 919–29 (1996).
 36. Zannetti, C. *et al.* C/EBP{delta} and STAT-1 are required for TLR8 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **285**, 34773–80 (2010).
 37. Wu, Z., Bucher, N. L. & Farmer, S. R. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4128–36 (1996).
 38. Ko, C.-Y., Chang, W.-C. & Wang, J.-M. Biological roles of CCAAT/Enhancer-binding protein delta during inflammation. *J. Biomed. Sci.* **22**, 6 (2015).
 39. Liu, Z.-H., Dai, X.-M. & Du, B. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 353–359 (2015).
 40. Rani, A., Greenlaw, R., Smith, R. A. & Galustian, C. HES1 in immunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **30**, 113–117 (2016).
 41. Gao, F. *et al.* Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3β pathway in human colon cancer. *Oncotarget* **6**, 38667–80 (2015).
 42. Gao, F. *et al.* Hes1 is involved in the self-renewal and tumourigenicity of stem-like cancer cells in colon cancer. *Sci. Rep.* **4**, 3963 (2015).

43. Yao, Y. *et al.* PIWIL2 induces c-Myc expression by interacting with NME2 and regulates c-Myc-mediated tumor cell proliferation. *Oncotarget* **5**, 8466–77 (2014).
44. Carotenuto, M. *et al.* Neuroblastoma tumorigenesis is regulated through the Nm23-H1/h-Prune C-terminal interaction. *Sci. Rep.* **3**, 1351 (2013).
45. Tschiedel, S. *et al.* Bcr–Abl dependent post-transcriptional activation of NME2 expression is a specific and common feature of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **53**, 1569–1576 (2012).
46. Thakur, R. K. *et al.* Non-metastatic 2 (NME2)-mediated suppression of lung cancer metastasis involves transcriptional regulation of key cell adhesion factor vinculin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11589–11600 (2014).
47. Liu, Y. *et al.* NME2 Reduces Proliferation, Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells to Limit Metastasis. *PLoS One* **10**, e0115968 (2015).
48. Qi, C. *et al.* A role for the clock gene Per1 in prostate cancer. *Cancer Res.* **69**, 7619–7625 (2009).
49. Wernert, N., Lindstrot, A., Langer, B., Buettner, R. & Wernert, N. Differential expression of ETS family members in prostate cancer tissues and androgen-sensitive and insensitive prostate cancer cell lines. *Int. J. Mol. Med.* **28**, 89–93 (2011).
50. Carbone, G. M. *et al.* Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4358–4367 (2004).
51. Grasso, C. S. *et al.* The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* **487**, 239–243 (2012).
52. Xu, D. *et al.* Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes. *Cancer Res.* **75**, 3663–3671 (2015).
53. Cao, B. *et al.* Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget* **5**, 1646–1656 (2014).
54. Gottlieb, B., Beitel, L. K., Nadarajah, A., Paliouras, M. & Trifiro, M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum. Mutat.* **33**, 887–894 (2012).
55. Lapouge, G. *et al.* Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 529–534 (2008).
56. Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions Daehwan. *Genome Biol.* **14**, (2013).
57. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
58. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
59. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, (2010).
60. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 1–21 (2014).

61. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc.* **57**, 289–300 (1995).
62. Oliphant, T. E. Python for scientific computing. *Comput. Sci. @ Eng.* 10–20 (2007).
63. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
64. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273 (2003).

Author Contributions

J.C., E.E., E.S. and P.O.M.B. designed the experiment. P.O.M.B. realized the cell culture, the RNA extraction and the secondary RNA-seq analysis. M.J. ran the primary RNA-seq data treatment in order to obtain the genes differential expression. P.O.M.B. and Z.A. wrote the publication.

Additional Information

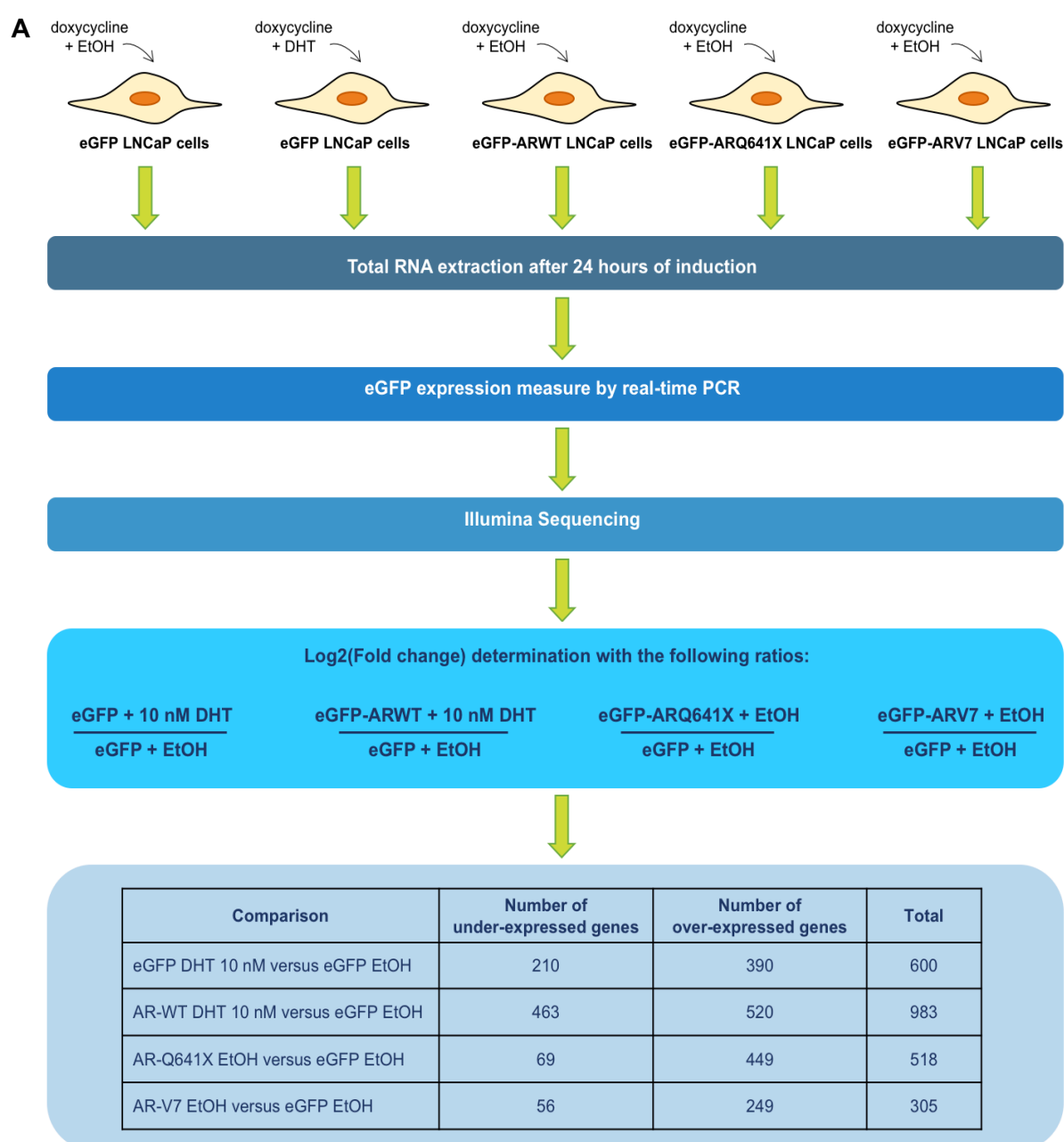
Supplementary information accompanies this paper.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Transcriptional landscapes of constitutive androgen receptor variants in prostate cancer

Pauline Ould Madi - Berthélémy, Eva Erdmann, Edwige Schreyer, Mathieu Jung, Zoe Angel, Bruno Kieffer and Jocelyn Céraline.

Supplementary data



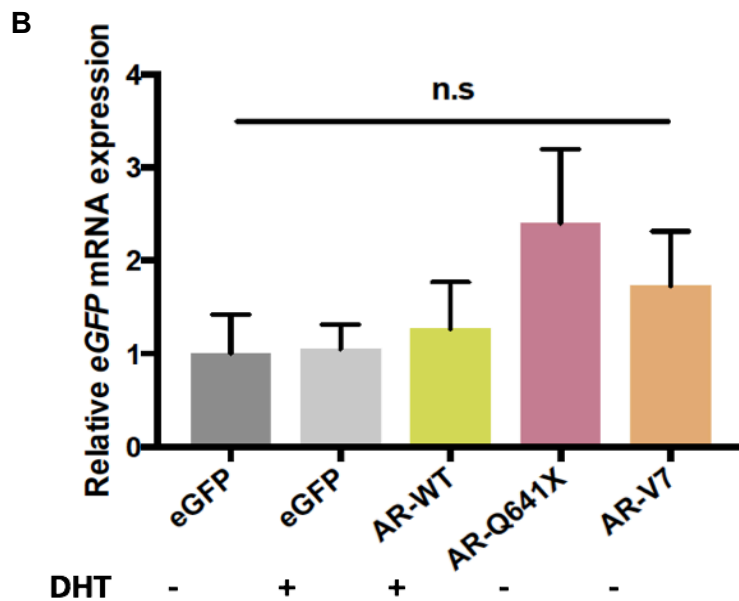


Figure S1. Overview of the analysis workflow. **(A)** Cells were treated with doxycycline to induce the expression of eGFP, eGFP-ARWT, eGFP-ARQ641X or eGFP-ARV7 and 10 nM of DHT or ethanol (EtOH) during 24 hours. Total RNA was extracted and transgene expression was assessed by real-time PCR. Sequencing was performed using Illumina technology. Gene expression was determined by the $\log_2(\text{fold change})$ method considering eGFP-inducible cells treated with EtOH as the control condition. P-value < 0.05 was considered significant. Over-expressed and under-expressed genes were selected with $\log_2(\text{Fold Change}) < -1$ or > 1 , respectively. **(B)** mRNA quantification of eGFP level.

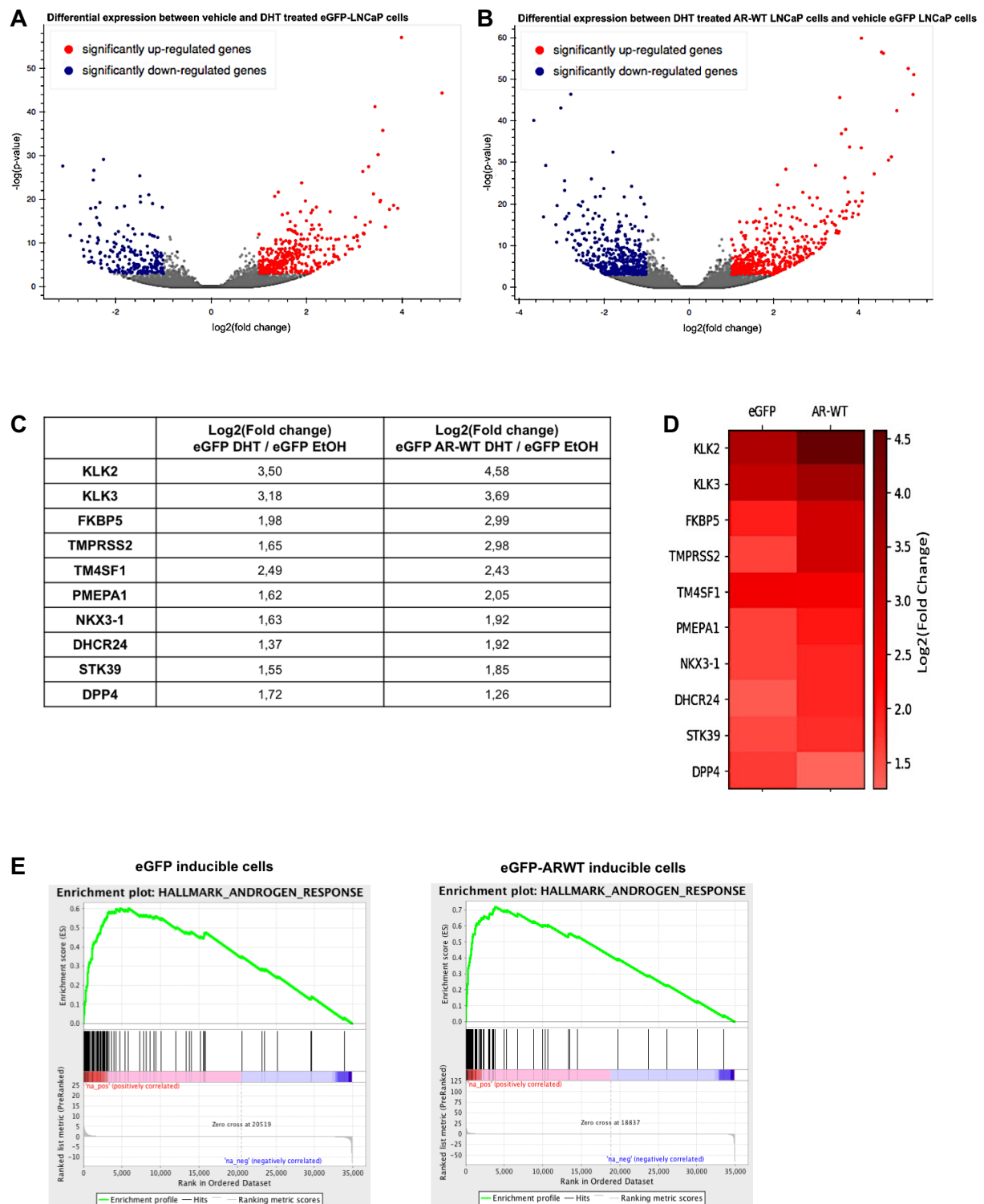


Figure S2. Control of the androgen response profiles of the AR-WT and the control condition. Volcano plot representations of the genome expression of (A) eGFP-inducible cells after DHT treatment and (B) eGFP-ARWT inducible cells after DHT treatment. (C) log2(fold change) values of AR target genes and (D) heatmap representation. (E) Gene set enrichment analysis (GSEA) showing the regulation of genes from the androgen response function.

3) Conclusion

L'analyse transcriptionnelle du RA endogène des cellules LNCaP, du RA sauvage ou encore des variants constitutivement actifs RA-Q641X et RA-V7 a permis de mettre en évidence l'induction d'un transcriptome différent en fonction de la forme du récepteur considérée. En effet, seuls 40 à 50% des gènes régulés par les variants constitutifs du RA sont communs à ceux régulés par le RA sauvage. Cette observation témoigne par conséquent de l'expression de gènes spécifiques en présence du RA-Q641X et du RA-V7, ce qui soutient l'effet gain de fonction apporté par ces variants.

De plus, l'analyse d'enrichissement fonctionnel réalisée à l'aide du logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) a souligné l'association entre les variants constitutifs du récepteur et la fonction de transition épithélio-mésenchymateuse mais aussi la perte des fonctions associées au cycle cellulaire comme l'induction des gènes cibles de E2F ou encore le contrôle G2/M permettant l'entrée en mitose des cellules. Ainsi, il est possible de formuler l'hypothèse suivante : comme les cellules subissent le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, elles ne sont plus capables de maintenir un taux de prolifération élevé. La perte de la fonction de spermatogenèse pourrait dès lors témoigner de ce phénomène de dédifférenciation. Cependant, ce modèle ne semble pas en adéquation avec les données de la littérature. En effet, l'expression des variants constitutivement actifs du RA a été associée à une prolifération accrue (He et al., 2018). Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation de lignées cellulaires différentes. Nous avons favorisé la lignée androgéno-dépendante LNCaP issue d'une métastase ganglionnaire et connue pour conserver des caractéristiques épithéliales tandis que les expériences précédentes ont été réalisées dans des cellules 22RV1 établies à partir d'un modèle murin de xénogreffe, présentant une moindre réponse aux androgènes et un phénotype plus agressif. Pour confirmer l'impact des variants RA-Q641X et RA-V7 dans notre modèle cellulaire, des expériences de mise en évidence du marqueur associé à la prolifération KI67 par immuno-marquage sont envisagées.

L'analyse des facteurs de transcription différentiellement exprimés en présence du RA sauvage et des variants constitutivement actifs a mis en évidence d'importantes différences. En effet, seuls 10 facteurs de transcription régulés par le RA sauvage le sont également par le RA-Q641X et le RA-V7. A l'inverse, 25 facteurs de transcription sont apparus régulés par le RA-Q641X et 12 par le RA-V7 mais pas par le RA sauvage. Parmi ces derniers, bon nombre ont déjà été associés au cancer. C'est le cas de NR5A2, (nuclear receptor nuclear receptor subfamily 5 group A member 2), CEBPD (CCAAT/enhancer-binding protein Δ), HES1 (Hes family BHLH transcription factor 1), NME2 (the nucleoside diphosphate kinase 2) ou encore

ETS2 (ETS proto-oncogene 2). Ces facteurs de transcription pourraient coopérer avec les variants du RA de manière à permettre la régulation des gènes qui leur sont spécifiques.

En conclusion, les variants constitutivement actifs du RA modulent le transcriptome du récepteur. De plus, la corrélation partielle entre les transcriptomes des deux variants montre l'intérêt de les considérer individuellement, amenant à penser que tous les variants constitutifs du RA ne sont pas équivalents et possèdent un programme génétique qui leur est propre et par extension des propriétés et des caractéristiques individuelles.

PARTIE 2 :
Fonctions génomiques
du variant RA-T576A

I. Description de la mutation

Découverte à partir d'échantillons de patients atteints d'un CaP métastatique, la mutation RA-T576A a été caractérisée dans deux publications, en association ou non avec la mutation T878A (Marcelli et al., 2000; Monge et al., 2006). Elle se situe dans le premier doigt de zinc du DBD, juste avant la P-box, et concerne une position pour laquelle la présence d'un groupement hydroxyle apporté par une thréonine ou une sérine est très conservée au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires. La substitution d'un résidu hydroxylé par une alanine n'est en effet observée que pour les récepteurs de l'acide rétinoïque RAR α et RAR β . Cette observation suggère que ce groupement hydroxyle pourrait être étroitement impliqué dans l'activité régulatrice du récepteur en modulant la reconnaissance des éléments de réponse (Figure 38) (Hay and Mc Ewan, 2012; Monge et al., 2006).

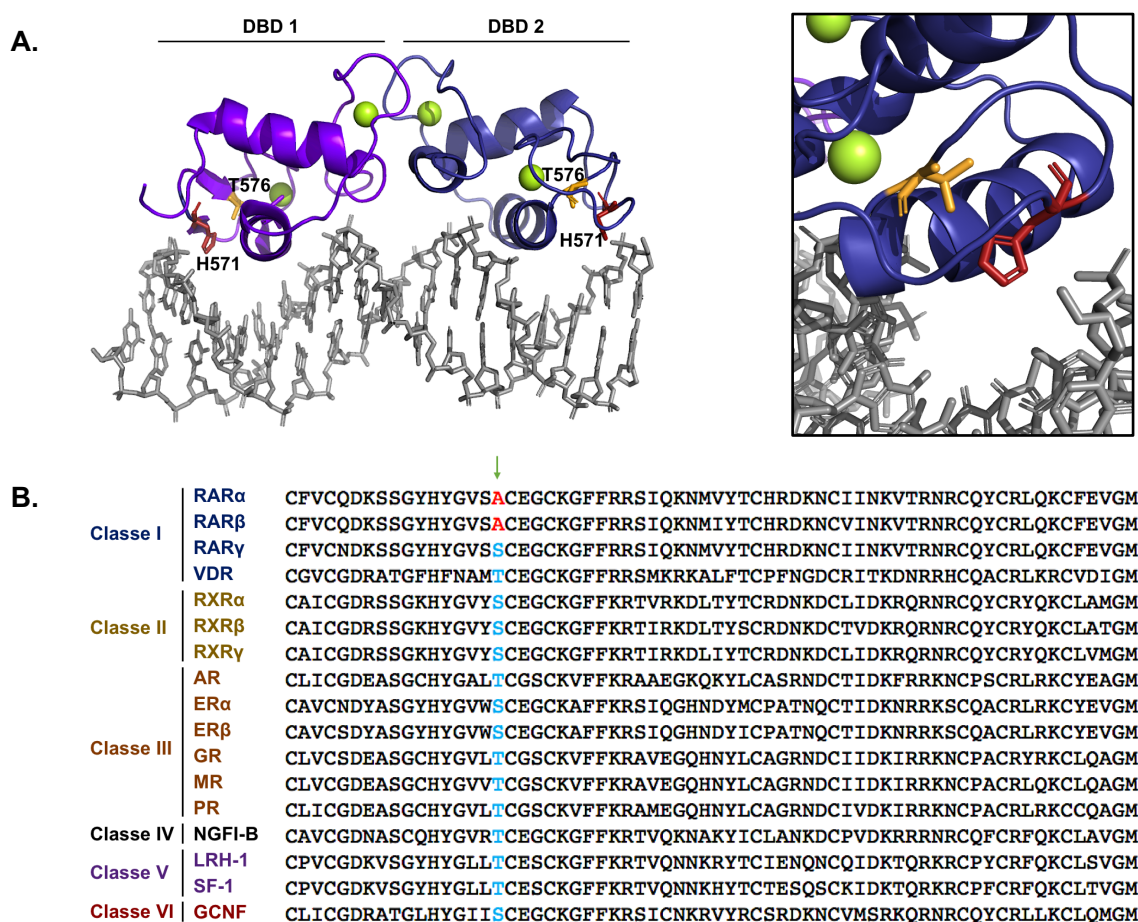


Figure 38 : Localisation du résidu T576 au sein du domaine de liaison à l'ADN. PDB 1R4I

A. Structure cristallographique d'un dimère de DBD du RA lié à l'ADN. Le résidu T576 est représenté en jaune et l'histidine H571 en rouge. Séquence protéique de référence (Genbank, NCBI) : P10275.3 **B.** Alignement des séquences de DBD de différents récepteurs nucléaires. La présence d'un groupement hydroxyle en position T576 du RA est une caractéristique conservée au sein de la superfamille.

L'étude de la fonction d'activation transcriptionnelle du mutant RA-T576A a mis en évidence une différence de reconnaissance de l'ADN par rapport au RA sauvage. En effet, la mutation semble favoriser l'activité du récepteur en présence d'éléments de réponse non-sélectifs tandis qu'elle la diminue sur des éléments de réponse spécifiques (Monge et al., 2006). La modulation de l'activité transcriptionnelle pourrait s'expliquer par l'impact direct de la mutation sur la formation de dimères, l'altération de l'organisation tridimensionnelle du récepteur ou encore la reconnaissance différentielle d'éléments de réponse. Cependant, ces hypothèses sont infirmées par la position du résidu 576 qui n'est localisé ni au niveau de l'interface de dimérisation, ni à l'interface protéine-ADN. De plus, l'étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) des DBD révèle que les structures du récepteur sauvage et du mutant sont hautement similaires (Figure 39) (Données non publiées).

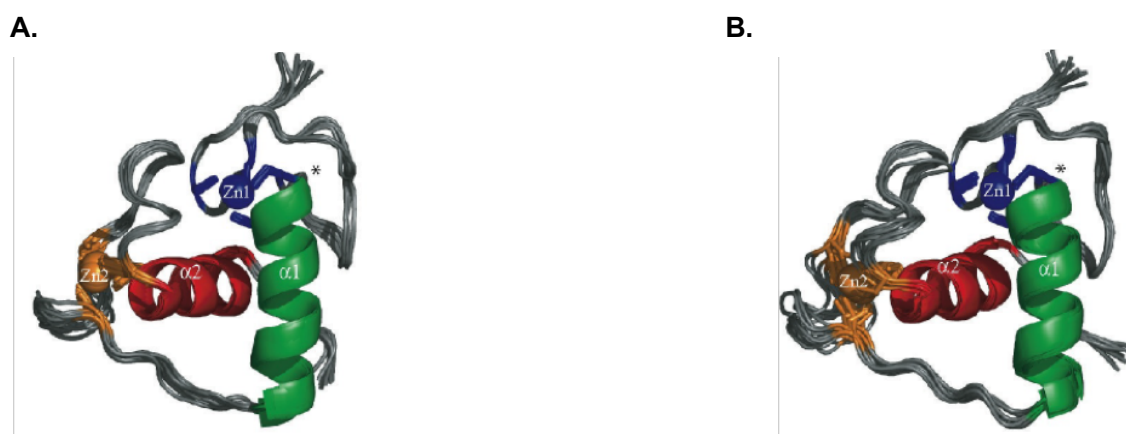


Figure 39 : Structure des domaines de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes sauvage ou porteur de la mutation T576A.

DBD du **A.** RA sauvage ou **B.** RA-T576A. La position 576 est indiquée par un astérisque.

Pour mieux comprendre l'effet de cette mutation sur le comportement du RA, une étude RMN plus approfondie a été menée. L'étude de la dynamique du squelette peptidique des DBD sauvage et mutant a montré une différence significative du comportement de l'histidine H571 (Données non publiées). Cet acide aminé, strictement conservé dans tous les DBD de récepteur nucléaire, interagit physiquement avec son voisin immédiat en position 576. De plus, ce résidu est localisé au contact de l'ADN et participe directement à la stabilisation du complexe en établissant une liaison hydrogène avec le squelette sucre-phosphate de l'ADN, tel un point d'ancrage du récepteur. Ainsi, la substitution T576A semble exercer un effet allostérique sur l'histidine H571 qui module les propriétés de reconnaissance de l'ADN de façon indirecte selon un mécanisme moléculaire qui reste à élucider.

De manière à approfondir les connaissances relatives au RA-T575A et définir son mode d'action au sein des CRPC, ses fonctions génomiques ont été étudiées. Pour cela, l'impact de la mutation sur la liaison du récepteur à l'ADN a été analysé par des expériences de ChIP suivies d'un séquençage (ChIP-Seq) et par tests luciférase. De plus, un RNA-seq a été réalisé dans le but de décrire le transcriptome spécifique de ce variant.

II. Matériel et méthodes

1) Plasmides

Le plasmide d'expression du RA-T576A fusionné à l'eGFP (*Enhanced green fluorescent protein*), pEGFP-ART576A, a été réalisé en remplaçant la séquence du récepteur sauvage (RA-WT) par celle du mutant entre les sites de restriction BstEII et BamHI du plasmide pEGFP-ARWT (Lapouge et al., 2007). Pour la mise en place du modèle d'expression inductible, le système Lenti-XTM Tet-ON 3G (Clontech) a été utilisé. La séquence du RA-T576A a été amplifiée du plasmide pEGFP-ART576A et insérée entre les sites de restriction BamHI et MluI du vecteur pLVX-TRE3G à l'aide du kit In fusion HD Cloning (Clontech). Les plasmides d'expression pE-ARWT (Cottard et al., 2013) et pE-ART576A ont été utilisés pour la réalisation des tests luciférase. Le dernier a été obtenu par mutagenèse dirigée du pE-ARWT en utilisant l'oligonucléotide oligo_RAT576A et le kit QuikChange Lightning Multi Site-directed Mutagenesis (Agilent). Le plasmide pGL4-ARE-PSA-Luc est issu de l'insertion de la séquence oligo_ARE_PSA entre les sites de restriction NheI et BglII du vecteur pGL4-Luc-2P (Promega) grâce au kit In fusion HD Cloning (Clontech). Le plasmide pGL4-AREa-Luc a été obtenu à partir du pGL4-ARE-PSA-Luc par insertion de la séquence oligo_AREa entre les sites HindIII et MluI. Les plasmides pGL4-AREb-Luc et pGL4-AREc-Luc ont été réalisés par mutagenèse du pGL4-AREa-Luc grâce au kit QuikChange Multi (Agilent). Les oligonucléotides utilisés sont regroupés dans la table 3.

Oligonucléotide	Séquence
oligo_RAT576A	5'-TGTCACATATGGAGCTCTGCAATGTGGAAGCTGCAAGG-3'
oligo_ARE_PSA	5'-ACCTGAGCTCGCTAGCCTTACGCGTGCCAGAACAGCAA GTGCTTGAAGGAATTCCTTGAAGCACTGCTGTTCTGGCA CGCGAGATCTAGACTCTAGA-3'
oligo_AREa	5'-GGAACAGCCTGTGCCTGAGGCACGCGAG-3'
oligo_AREb	5'-GGAACAGCCTATGCTTGAGGCACGCGAG-3'
oligo_AREc	5'-AGAACATACTGTTCTTGAGGCACGCGAG-3'

Table 3 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides.

2) Culture cellulaire

Les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP clone FGC (ECACC) ont été utilisées pour produire des clones stables exprimant le RA-WT ou le RA-T756A fusionnés à l'eGFP ou l'eGFP seule en contrôle de manière inducible selon le protocole décrit dans la publication 1 (Cottard et al., 2017). Elles sont cultivées dans un milieu complet RPMI-1640 contenant 10% de sérum de vœu fœtal, 10mM de HEPES, 2mM de L-glutamine, 100U/mL de pénicilline, 100µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich), 200µg/mL de généticine, 400µg/mL de puromycine et 1mM de pyruvate de sodium (Invitrogen, Fisher Scientific), à 37°C sous atmosphère enrichie de 5% de CO₂. L'expression des transgènes est induite par l'ajout de 20ng/mL de doxycycline dans le milieu de culture avec 10nM de DHT ou de l'éthanol en contrôle négatif. Les cellules Hek293 ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-glutamine, 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Sigma-Aldrich) à 37°C sous atmosphère enrichie de 5% de CO₂.

3) ChIP-seq

Après 24h d'induction des cellules à 20ng/mL de doxycycline et 6h de traitement à l'aide de 10nM de DHT, la chromatine a été extraite pour réaliser les expériences de ChIP avec le kit ChIP-IT High Sensitivity (Active Motif) selon le protocole du fournisseur. Les cellules ont d'abord été fixées à l'aide de paraformaldéhyde 1,1% et de la solution de fixation durant 15 minutes à température ambiante avant ajout de solution Stop. Une fois les cellules lysées, une étape de sonication a été réalisée durant 2h30 à l'aide du qSONICA Q800R (20sec ON / 40sec OFF). L'intégrité du RA a été vérifiée en réalisant un Western Blot à partir de 35µL de chromatine soniquée grâce à un anticorps primaire anti-eGFP (sc-9996, Santa Cruz Biotechnology) et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology). Ensuite, 30µg de chromatine ont été immunoprécipités avec 5µg d'anticorps anti-eGFP (fourni par le Docteur K. White, Institut de Génomique et de Biologie des Systèmes, Université de Chicago, Etats-Unis) ou d'IgG isotypiques (sc-2028, Santa Cruz Biotechnology). La chromatine immunoprécipitée a été incubée avec des billes d'agarose durant 3h, lavée et éluée. Les protéines ont été dégradées par ajout de protéinase K puis l'ADN a été purifié. L'enrichissement des échantillons a été contrôlé par amplification qPCR d'une séquence correspondant aux ARE localisés dans l'intron 1 du gène *CDH2* (Cottard et al., 2017). Les résultats ont été normalisés à l'aide d'une gamme de dilution et sont représentés sous forme d'un pourcentage d'enrichissement moyen de 3 observations $\pm$ l'erreur standard moyenne.

La préparation de la librairie et le séquençage sur HiSeq 4000 (Illumina) ont été réalisés par la plateforme GenomEast (IGBMC, Illkirch, France). L'analyse des images et la détection des bases ont été effectuées à l'aide des logiciels RTA v2.7.3 et bcl2fastq v2.17.1.14. Les dimères d'adaptateurs ont été soustraits en utilisant DimerRemover. Les séquences ont été alignées sur le génome humain de référence hg38 en utilisant Bowtie v1.0.0 (Langmead et al., 2009). Les régions fortement enrichies, appelées peaks, ont été détectées grâce au logiciel MACS v2 et l'annotation a été réalisée avec les outils Homer et Ensembl 88. L'analyse des motifs a été effectuée grâce au logiciel MEME sur les 1000 sites de liaison possédant le meilleur score MACS au sein des peaks communs ou spécifiques du RA-WT ou du RA-T576A (Bailey and Elkan, 1994; Bailey et al., 2009).

4) Test luciférase

L'ensemencement et la transfection des cellules Hek293 ont été réalisés en même temps dans un milieu DMEM complet contenant 5% de sérum de veau fœtal traité au charbon, en présence de 0,1, 1 ou 10nM de DHT ou d'éthanol en contrôle. Le JetPEI (Polyplus Transfection, Illkirch, France) a été utilisé pour transfecter les cellules selon le protocole Batch du fournisseur avec 150ng de pE-AR-WT ou pE-AR-T576A codant pour le RA-WT ou le variant RA-T576A, 75ng de plasmide rapporteur pGL4-AREa-Luc, pGL4-AREb-Luc ou pGL4-AREc-Luc et enfin 20ng de pGL4-70 codant pour la luciférase Renilla utilisée en contrôle interne (Promega). L'activité luciférase a été mesurée 24h après transfection à l'aide du kit Dual-Glo (Promega) en suivant les recommandations du fournisseur. Les expériences (n=3) ont été réalisées en triplicatas et les moyennes de ratios de luminescence Firefly/Renilla $\pm$ l'erreur standard moyenne sont représentées sous forme de graphique.

5) Transcription inverse et PCR quantitative

Après 48h ou 72h d'induction à la doxycycline en présence de 10nM de DHT ou d'éthanol, les ARN totaux ont été extraits des cellules LNCaP à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) selon le protocole du fournisseur. La transcription inverse a été réalisée à partir de 400ng d'ARN en utilisant le kit iScript (Bio-Rad). L'expression des gènes cibles a été mesurée par qPCR avec le kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega). La liste des primers utilisés est développée dans la table 4. La porphobilinogène déaminase (PBGD) a été choisie en contrôle interne et l'expression relative déterminée par la méthode du $2^{-\Delta Ct}$. Les expériences

(n=3) ont été réalisées en triplicatas et les résultats sont représentés par la moyenne $\pm$ l'erreur standard moyenne.

Primers	Référence
<i>BRCA1</i>	Qiagen, numéro catalogue : QT00039305
<i>IGFBP3</i>	Qiagen, numéro catalogue : QT00072737
<i>PIAS1</i>	Qiagen, numéro catalogue : QT00031248

Table 4 : Liste des primers utilisés en PCR quantitative.

6) RNA-seq

La préparation de la librairie et le séquençage haut-débit sur l'appareil HiSeq 4000 (Illumina) ont été réalisés par la plateforme GenomEast (IGBMC, Illkirch, France). L'analyse des images et la détection des bases ont été effectuées à l'aide des logiciels RTA v2.7.3 and bcl2fastq v2.17.1.14. Les dimères d'adaptateurs ont été soustraits en utilisant DimerRemover. Les séquences ont été alignées sur le génome humain de référence hg38 grâce aux logiciels Tophat v2.0.14 (Kim et al., 2013) et Bowtie v2.1.0 (Langmead et al., 2009). La quantification de l'expression des gènes a été effectuée avec HTSeq v0.6.1 (Anders et al., 2015) et la source Ensembl 84 a été utilisée pour les annotations. Le nombre de reads a d'abord été normalisé sur les librairies avec la méthode proposée par Anders and Huber (Anders and Huber, 2010) puis selon la longueur des gènes. Les comparaisons d'intérêt ont été faites en suivant la méthode proposée par Love et al. (Love et al., 2014) exécutée sur DESeq2 v1.6.3 de manière à obtenir les $\log_2$ (Fold Change) et les p-values correspondantes. Celles-ci ont ensuite été ajustées pour les tests multiples en suivant les recommandations de Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Les gènes différentiellement exprimés ont été sélectionnés selon les critères suivants : p-valeur < 0,05 et $\log_2$ (Fold Change) > 1 ou < -1.

7) Statistiques et analyse des données haut-débit

La significativité des résultats de qPCR et des tests luciférase a été appréhendée en réalisant un test de variance ANOVA. Les différences avec une p-valeur < 0,05 ont été considérées comme significative. *p-valeur < 0,05 ; **p-valeur < 0,01 ; ***p-valeur < 0,001 ; ****p-valeur < 0,0001. L'analyse des données haut-débit et les graphiques ont été réalisés

avec Jupyter Notebook en utilisant le langage Python 2.0 (Oliphant, 2007) et les librairies Panda, Numpy, et Bokeh. La densité des peaks de ChIP-seq a été étudiée en réalisant une heatmap grâce au logiciel seqMINER (Ye et al., 2011). L'analyse d'enrichissement fonctionnel a été effectuée sur le logiciel GSEA (Gene Set Enrichment Analysis; Mootha et al., 2003; Subramanian et al., 2005). Pour chaque condition, les données de RNA-seq ont été organisées en matrice grâce à la valeur du $-\text{Log}_{10}(\text{p-valeur}) \times (\text{signe du } \text{Log}_2(\text{Fold Change}))$. Les résultats présentant une p-valeur nominale $< 0,05$ ont été sélectionnés et représentés en fonction de leur score d'enrichissement normalisé.

III. Résultats

1) Liaison à l'ADN du récepteur sauvage et du variant T576A

Avant de réaliser les expériences de ChIP, un Western Blot a été réalisé à partir des échantillons de chromatine après sonication. Le marquage réalisé à l'aide d'un anticorps anti-eGFP puis d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase a mis en évidence les protéines de fusion eGFP-RA-WT et eGFP-RA-T576A au poids moléculaire attendu de 137 kilodaltons, ce qui témoigne de l'intégrité des protéines d'intérêt (Figure 40 A.). De plus, après la réalisation des expériences de ChIP, l'enrichissement en fragments d'ADN a été vérifié par qPCR pour une région contrôle localisée au niveau des ARE contenus dans le gène *CDH2* (Cottard et al., 2017). De manière cohérente, les résultats ont montré un enrichissement de l'ordre de 0,19% en présence du RA-WT tandis qu'il n'y a pas d'enrichissement observé pour le contrôle isotypique, ce qui valide le protocole expérimental utilisé. De plus, la présence du RA-T576A a également été associée à un enrichissement de l'ordre de 0,13% (Figure 40 B.).

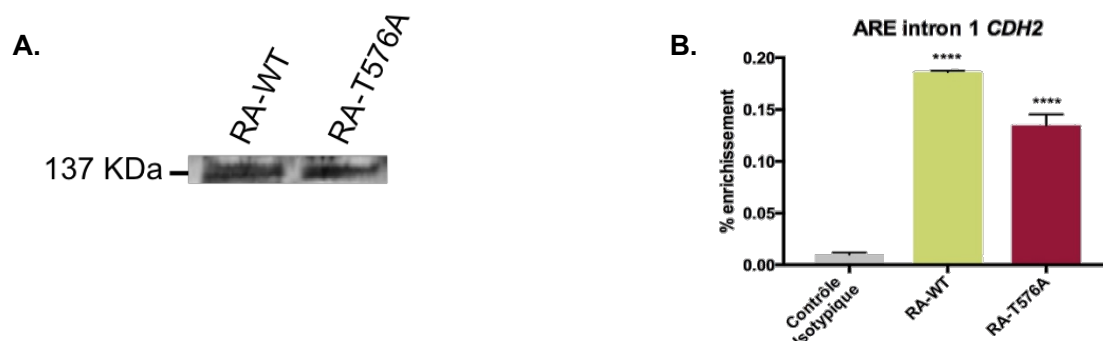
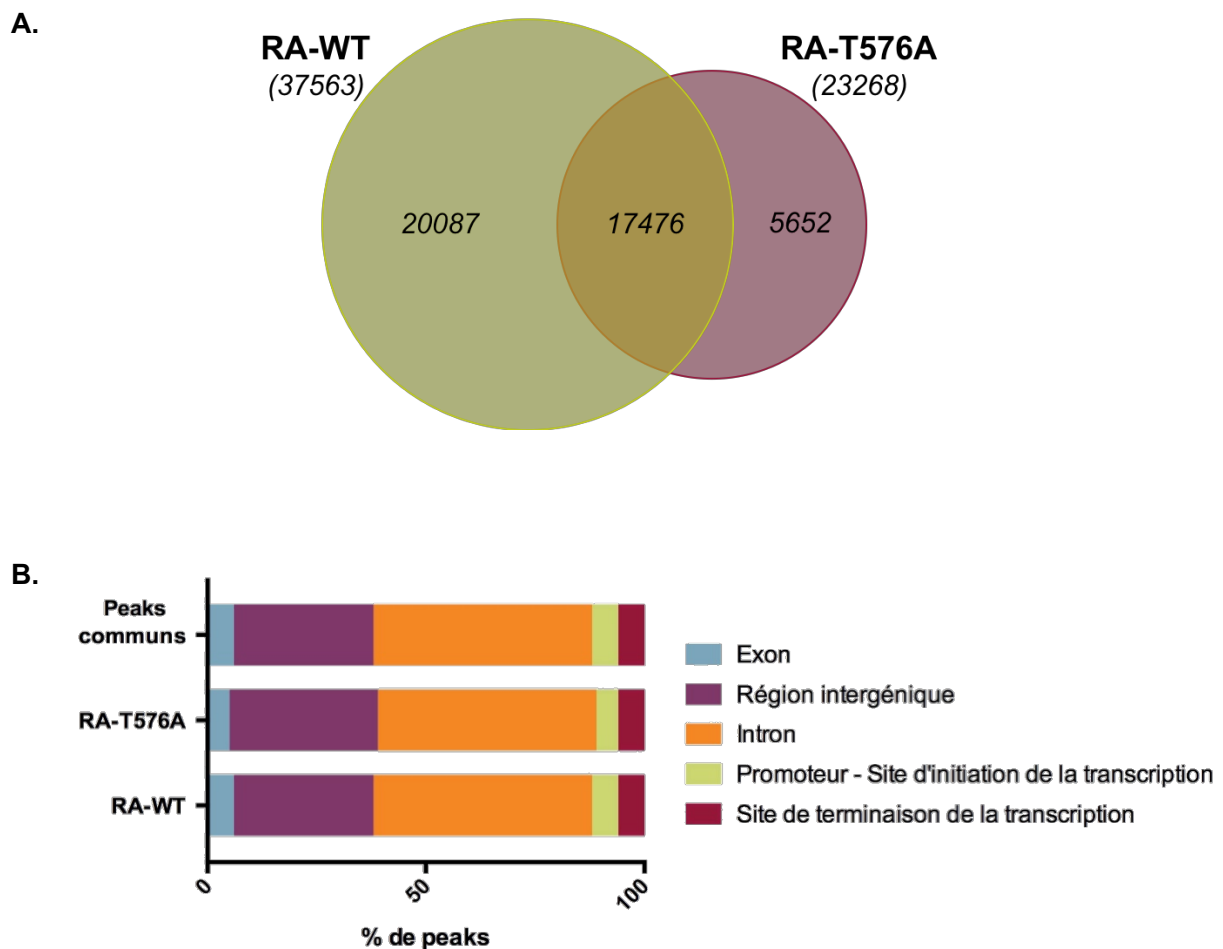


Figure 40 : Vérification de l'immunoprécipitation de la chromatine avant séquençage.

A. Mise en évidence de l'intégrité des protéines de fusion par Western Blot. **B.** qPCR contrôle ciblant les ARE situés dans l'intron 1 du gène *CDH2*.

a. Cistrome commun et sites de liaison spécifiques

Les données de ChIP-seq ont montré de nombreux sites de fixation des 2 formes du RA à l'ADN. En effet, un total de 37563 peaks a été mis en évidence pour le RA-WT et de 23268 peaks pour le RA-T576A dont 17476 sont communs aux 2 récepteurs. Ainsi, 3 à 4 fois plus de peaks spécifiques ont été observés en présence du RA-WT que du RA-T576A (Figure 41 A.). Quelle que soit la catégorie considérée, à savoir les peaks communs, spécifiques du RA-WT ou du RA-T576A, la même répartition a été observée avec 5 à 6% des peaks localisés au niveau d'un exon, 32 à 34% dans une région intergénique, 50% dans un intron, 5 à 6% au niveau d'un promoteur et enfin 7% au niveau d'un site de terminaison de la transcription (Figure 41 B.). Globalement, le recrutement du RA-WT à l'ADN semble deux fois plus important que celui du RA-T576A (Figure 41 C.). Cependant, l'observation détaillée de l'ensemble des données a montré que les peaks considérés comme spécifiques d'une condition se retrouvaient malgré tout dans la deuxième, mais à une intensité trop faible pour être pris en compte lors de l'analyse (Figure 41 C.)



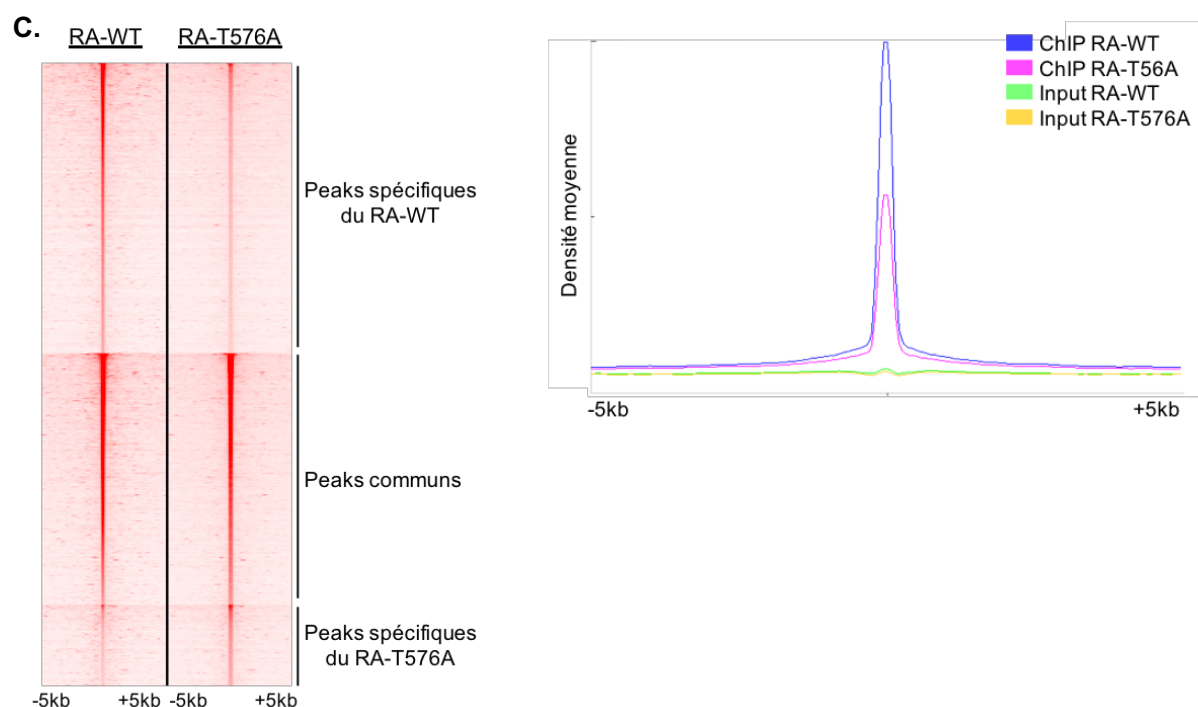


Figure 41 : Impact de la mutation T576A sur le cistrome du récepteur des androgènes.

A. Nombre de peaks communs ou spécifiques du RA-WT ou RA-T576A. **B.** Localisation des peaks spécifiques au RA-WT, spécifiques au RA-T576A ou encore communs aux 2 formes du récepteur. **C.** Densité des reads retrouvés pour l'ensemble des peaks en présence du RA-WT ou du RA-T576A. Les données ont été normalisées à 20 millions de reads et les 43215 peaks totaux ont été pris en compte dans l'analyse.

b. Modification de la séquence d'ADN reconnue par le récepteur

La recherche de motifs *de novo* a été réalisée grâce au logiciel MEME au sein des sites de liaison communs aux 2 formes du RA, spécifiques du RA-WT ou du RA-T576A. Elle a permis la découverte de 3 motifs distincts, tous ressemblant au motif canonique décrit pour le RA sous la forme d'un palindrome inversé 5'-AGAACA_{nnn}TGTTCT-3'. Le motif spécifique du mutant RA-T576A repose sur une conservation importante des 2 demi-sites, ce qui explique aussi le haut degré de conservation observé dans le motif représentant les sites de liaison commun aux 2 formes du récepteur. Le motif spécifique du RA-WT montre quant à lui une conservation du premier demi-site mais un deuxième demi-site plus dégénéré. En observant ces 3 motifs, la guanine (G) occupant la seconde position du deuxième demi-site semble être capital pour la reconnaissance de l'ADN par le RA, qu'il soit sauvage ou muté (Figure 42 A.).

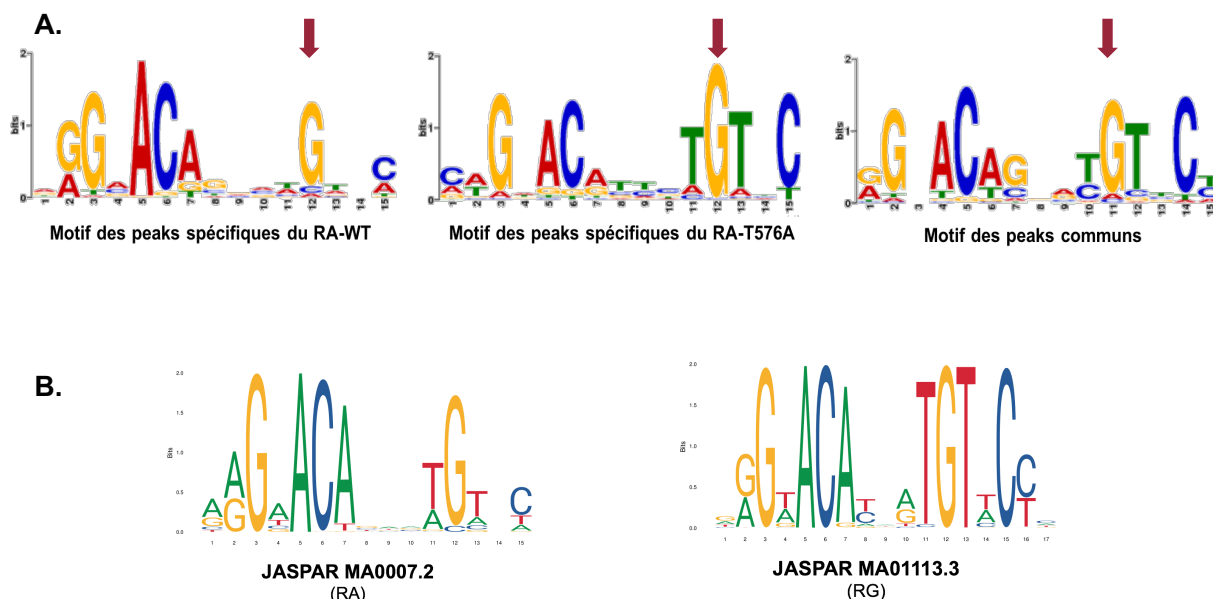


Figure 42 : Découverte de motifs privilégiés différents pour les deux formes du récepteur.

A. Motifs découverts *de novo* pour les sites de liaison spécifiques du RA-WT, du RA-T576A ou communs aux deux formes du récepteur. La guanine (G) occupant la seconde position du deuxième demi-site est indiquée par une flèche rouge. **B.** Motifs décrits dans la banque de données JASPAR pour le RA et le RG.

Les motifs découverts *de novo* ont été vérifiés à l'aide de tests luciférase. Les plasmides qui ont été utilisés contiennent soit la séquence AREa correspondant au motif mis en évidence spécifiquement pour le RA-WT, soit la séquence AREb basée sur la séquence AREa mais avec une substitution de la guanine en 11^{ème} par une adénine, soit la séquence AREc reflétant le motif spécifiquement observé pour le RA-T576A. Quel que soit le plasmide utilisé et la forme du RA, l'activité transcriptionnelle est apparue dépendante de la dose de DHT présente dans le milieu de culture. En présence de l'AREa, une activité transcriptionnelle 3 fois plus élevée a été observée pour le RA-WT par rapport à celle du RA-T576A. De plus, l'activité du RA-T576A a été augmentée d'un facteur 2,5 par l'utilisation de la séquence rapportrice AREc. Ces données appuient la nécessité de la conservation des deux demi-sites pour la liaison du variant à l'ADN. Enfin, avec l'AREb, une diminution importante de l'activité luciférase a été observée à la fois pour le RA-WT et pour le RA-T576A, traduisant l'importance de la conservation de la guanine en 11^{ème} position (Figure 43). Cette observation recoupe les données de la littérature et celles regroupées dans la banque JASPAR. En effet, il apparaît que ce nucléotide est très conservé au sein des éléments de réponse des différents récepteurs nucléaires (Luisi et al., 1991; Schwabe et al., 1993) .

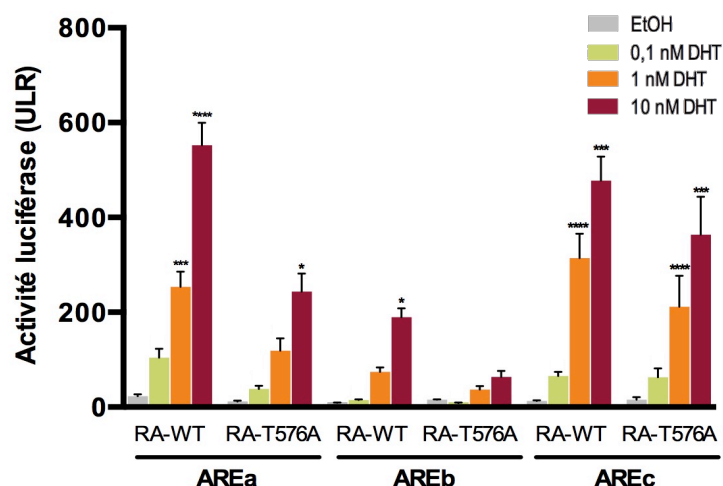


Figure 43 : Profils d'activité transcriptionnelle séquence-dépendants du récepteur sauvage ou porteur de la mutation T576A.

L'activité transcriptionnelle est représentée en unités d'activité luciférase relative (URL). La significativité des résultats est exprimée par rapport au contrôle éthanol (EtOH).

En comparant les motifs établis ci-dessus avec ceux de la base de données JASPAR, une ressemblance importante a été mise en évidence entre les motifs communs, spécifiques du RA-T576A et le motif MA0113.1 qui représente les sites de liaison du récepteur des glucocorticoïdes (RG) tandis que le motif spécifique du RA-WT s'apparente plus au motif MA0007.1 décrit pour le RA (Figure 42 B.).

2) Transcriptomes du récepteur sauvage et du variant T576A

Pour mesurer l'impact de l'activation du RA-WT ou du variant RA-T576A sur le transcriptome des cellules LNCaP, les $\log_2(\text{Fold Change})$ ont été calculés selon les ratios suivants à partir de l'expression moyenne de chaque gène :

$$\frac{\text{RA-WT} + 10\text{nM de DHT 24h}}{\text{RA-WT} + \text{Éthanol 24h}}$$

$$\frac{\text{RA-T576A} + 10\text{nM de DHT 24h}}{\text{RA-T576A} + \text{Éthanol 24h}}$$

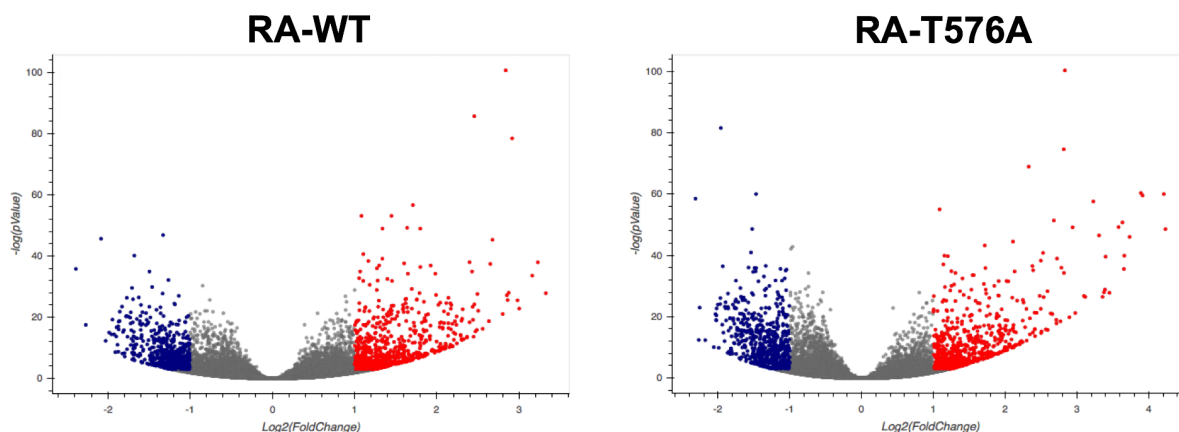
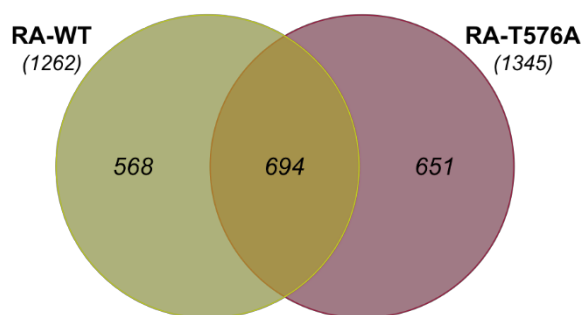
$$\frac{\text{RA-WT} + 10\text{nM de DHT 72h}}{\text{RA-WT} + \text{Éthanol 24h}}$$

$$\frac{\text{RA-T576A} + 10\text{nM de DHT 72h}}{\text{RA-T576A} + \text{Éthanol 24h}}$$

Les résultats ont ensuite été filtrés de manière à conserver les plus significatifs ayant une p-valeur inférieure à 0,05. Les gènes pour lesquels le $\log_2(\text{Fold Change})$ est supérieur à 1 ont été considérés comme surexprimés tandis que les $\log_2(\text{Fold Change})$ inférieurs à -1 ont permis de caractériser les gènes sous-exprimés. Avec ces critères de sélection, 1262 gènes dont l'expression est dérégulée après activation du RA-WT par la DHT à 24h et 1868 à 72h ont été mis en évidence. En ce qui concerne le RA-T576A, son activation aboutit à la modification de l'expression de 1345 gènes après 24h de traitement à la DHT et 1608 gènes après 72h de traitement. La comparaison de ces listes de gènes a révélé 694 gènes régulés de manière commune par les 2 formes du récepteur après 24h d'activation à la DHT et 606 gènes après 72h (Figure 44).

A.

24h



B.

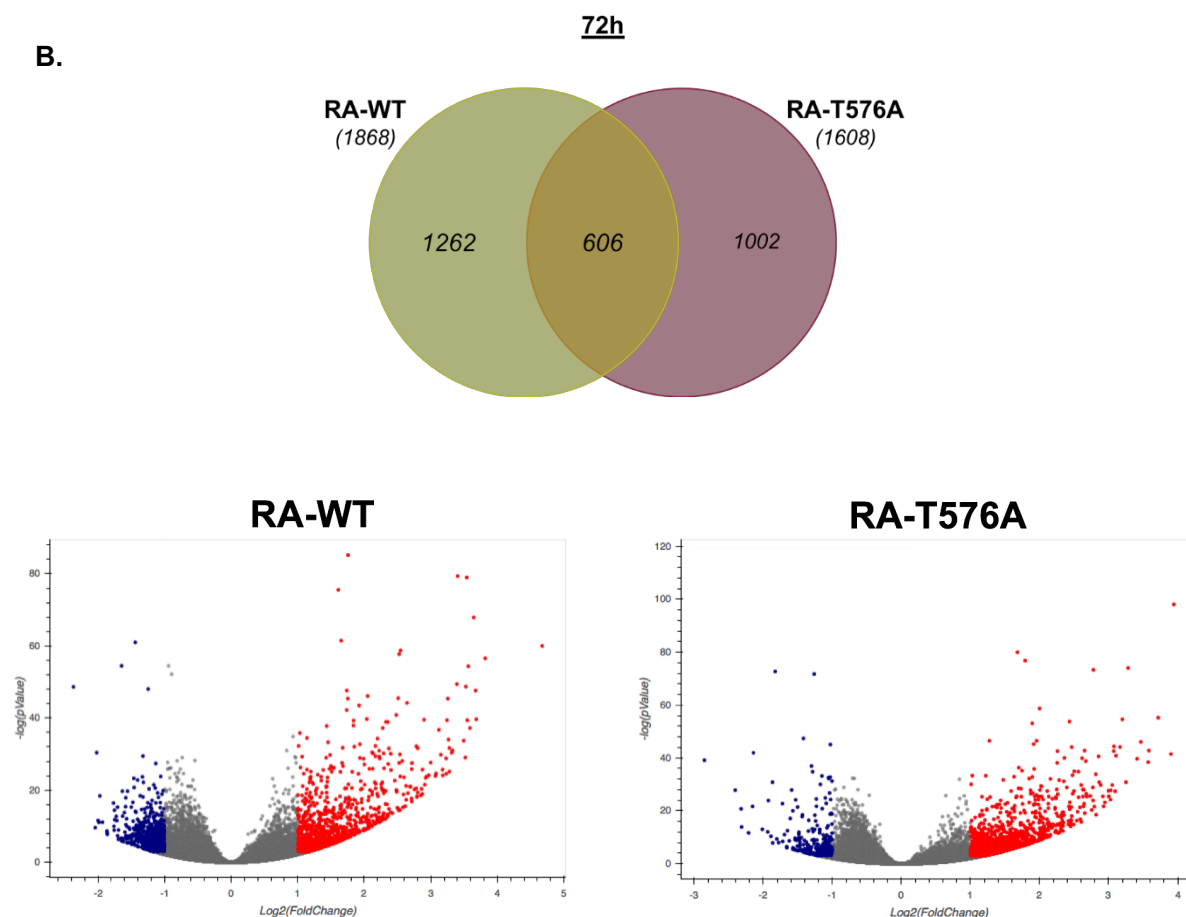


Figure 44 : Transcriptomes du récepteur des androgènes sauvage et du mutant T576A.

A. Après 24h de traitement à 10nM de DHT, 1262 et 1345 gènes sont respectivement régulés par le RA sauvage et le RA-T576A, parmi lesquels 694 sont communs. **B.** Après 72h de traitement à 10nM de DHT, 1868 et 1608 gènes sont respectivement régulés par le RA sauvage et le RA-T576A, parmi lesquels 606 sont communs. Sur les graphiques de type « Volcano Plot », les gènes sous-exprimés sont représentés en bleu et les gènes surexprimés en rouge.

L'analyse réalisée sur GSEA a permis de mettre en évidence un enrichissement important pour la fonction de réponse aux androgènes en présence des formes sauvage et mutée du RA après 24h d'activation à la DHT (Figure 45). Cette observation valide le modèle expérimental utilisé. Cependant, l'enrichissement de cette fonction est apparu diminué après 72h de traitement à la DHT, suggérant ainsi un profil de régulation dynamique de ces gènes.

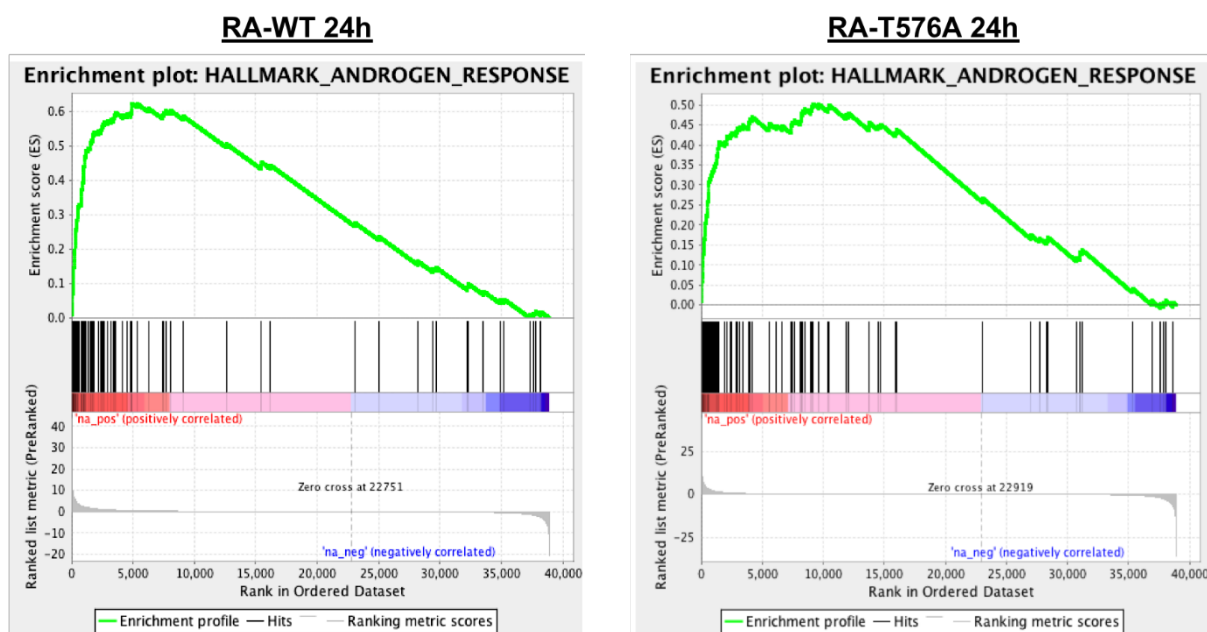


Figure 45 : Régulation de gènes appartenant à la fonction de réponse aux androgènes.

Après 24h de traitement des cellules à la DHT, le transcriptome induit par les deux formes du RA est enrichi en gènes connus pour répondre aux androgènes.

Pour vérifier la cohérence des résultats obtenus en RNA-seq, l'expression de certains gènes aléatoirement choisis a été explorée par qPCR au sein des mêmes échantillons. Les résultats ont mis en évidence un profil d'expression similaire à celui obtenu en RNA-seq au temps 24h. En effet, la diminution de *BRCA1* observée dans les données haut-débit a été retrouvée en qPCR pour le RA sauvage et le RA-T576A, mais aussi dans la condition eGFP + 10nM de DHT qui reflète l'activité du RA endogène des cellules LNCaP (Figure 46 A. et B.). De la même manière, les résultats ont également permis de confirmer la surexpression du gène *PIAS* après activation des différentes formes du récepteur (Figure 46 A. et C.). Enfin, une régulation du gène *IGFBP3* (*Insulin-like growth factor binding protein 3*) a été mise en évidence quelle que soit la méthode utilisée uniquement en présence du RA-T576A activé par son ligand (Figure 46 A. et D.).

A.

Ensembl gene ID	Gène	Log2(Fold Change) RA-WT DHT/EtOH	Log2(Fold Change) RA-T576A DHT/EtOH
ENSG00000012048	<i>BRCA1</i>	-1,33	-1,77
ENSG00000146674	<i>IGFBP3</i>	non significatif	1,26
ENSG00000033800	<i>PIAS1</i>	1,21	0,68

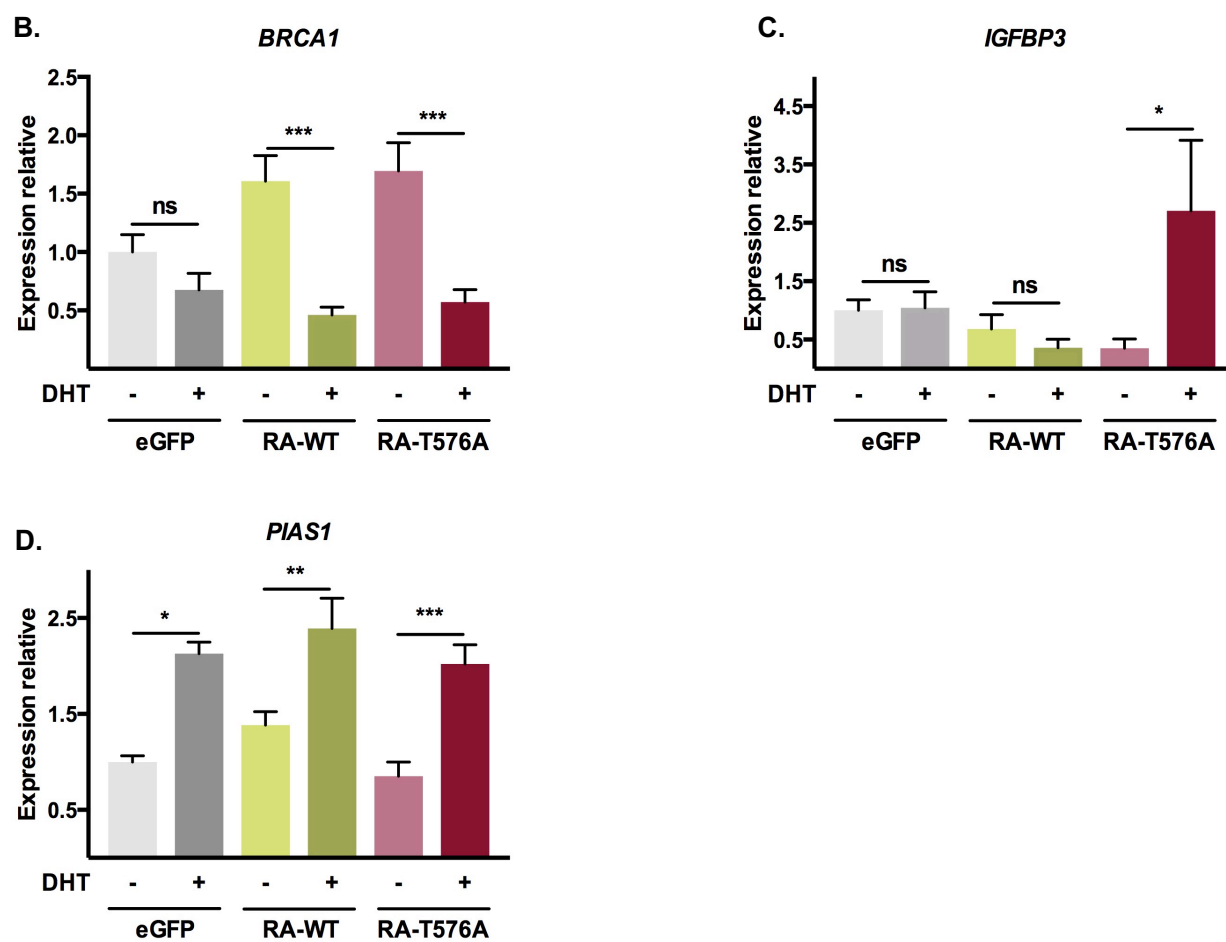


Figure 46 : Vérification des données de RNA-seq.

A. Tableau représentant les $\log_2(\text{Fold Change})$ pour les gènes *BRCA1*, *IGFBP3* et *PIAS1* après 24h de traitement à la DHT. Expression relative exprimée par rapport au PBGD pour les gènes **B.** *BRCA1*, **C.** *IGFBP3* et **D.** *PIAS1*.

a. Transcriptome commun et sets de gènes spécifiques

Après 24h ou 72h de traitement des cellules à la DHT, la comparaison des données de RNA-seq a permis de mettre en évidence un ensemble de gènes régulés de manière commune par le RA sauvage et le variant T576A. L'activation du RA par le DHT a également permis de mettre en évidence la régulation de gènes spécifiques à chaque forme du récepteur. Ainsi, les données de RNA-seq ont montré 568 et 1262 gènes régulés spécifiquement par le RA sauvage et 651 et 1002 gènes régulés spécifiquement par le RA-T576A après 24h et 72h de traitement des cellules à la DHT (Figure 44 et Figure 47).

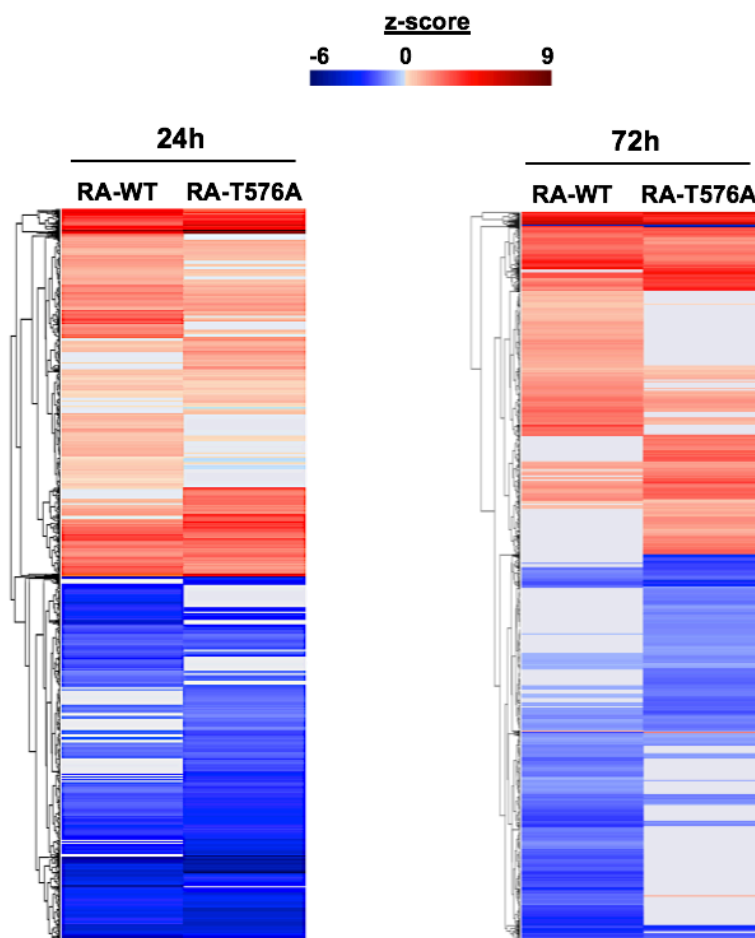


Figure 47 : Comparaison des transcriptomes du récepteur sauvage et du mutant T576A après 24 ou 72h de traitement à la DHT.

Seuls les gènes associés à une p-valeur $< 0,05$ dans au moins l'une des conditions sont représentés en fonction de leur z-score.

b. Impact de la mutation T576A sur les fonctions régulées par le récepteur

L'analyse d'enrichissement fonctionnel réalisée grâce à l'outil GSEA a permis de mettre en évidence la régulation de nombreuses fonctions communes entre les 2 formes du récepteur, quel que soit le temps d'activation considéré. En approfondissant les résultats obtenus, il a été mis en évidence l'enrichissement spécifique des fonctions du métabolisme des xénobiotiques, de la réponse aux UV augmentée, de l'adipogenèse, ou encore des voies de signalisation p53, Notch ou Wnt/ β -caténine en présence du variant RA-T576A après 72h d'activation à la DHT (Figure 48). Cependant, il s'agit d'observations préliminaires et il sera important de confirmer ces résultats et de caractériser leur importance dans le mode d'action de ce variant.

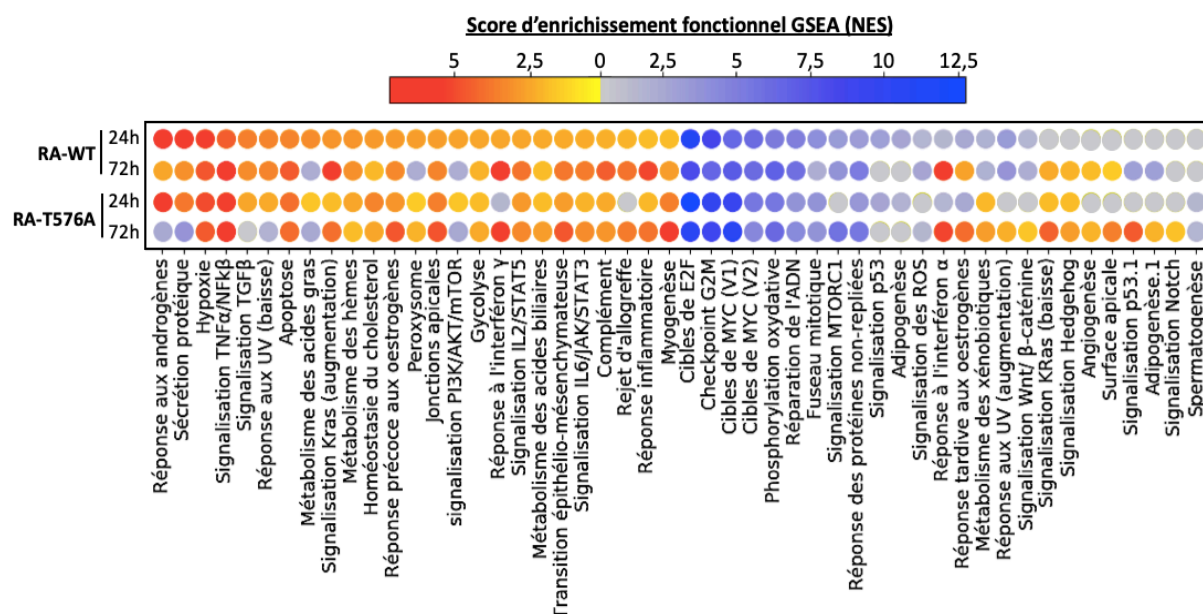


Figure 48 : Enrichissement fonctionnel des transcriptomes du récepteur sauvage ou mutant.

Les données sont représentées de haut en bas pour les conditions RA-WT 24h, RA-WT 72h, RA-T576A 24h et RA-T576A 72h. Seules les fonctions dont la p-valeur est < 0,05 sont représentées sur cette figure en fonction de leur score d'enrichissement GSEA (NES). Les données non-significatives sont affichées en gris.

3) Croisement des données haut-débit

Le croisement des données de ChIP-seq et de RNA-seq a permis de mettre en évidence la présence de site de liaison pour 595 gènes dont l'expression est régulée par le RA-WT et pour 490 gènes régulés par le variant RA-T576A (Figure 49). Cependant, pour de nombreux sites de liaison, malgré le recrutement du RA à l'ADN, aucune modulation de l'expression des gènes associés n'a été observée. Ces données recoupent celles de la littérature qui montrent de nombreux sites de liaison du RA sans pour autant que l'expression des gènes soit induite (Cottard et al., 2017; Wilson et al., 2016).

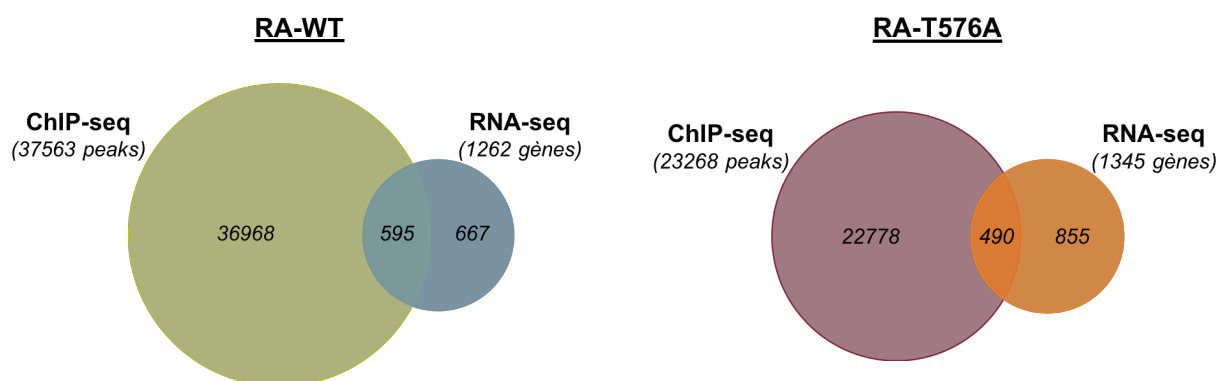


Figure 49 : Croisement des données haut-débit.

De nombreux peaks de ChIP-seq ne sont pas associés à la régulation de l'expression de gènes selon les données de RNA-seq après 24h d'activation à la DHT du RA-WT ou du RA-T576A.

L'analyse des motifs réalisée à partir des données de ChIP-seq a permis de mettre en évidence un motif privilégié pour le RA-T576A qui s'apparente à celui du RG (Figure 42 B.). De ce fait, les données de RNA-seq ont été comparées à celles de la littérature en se basant sur la publication de Sahu et al. (Sahu et al., 2013). Dans cet article, les auteurs ont utilisé les cellules LNCaP-1F5 surexprimant le RG traitées pendant 24h à la DHT de manière à activer le RA ou à la dexaméthasone pour l'activation du RG. De cette manière, ils ont établi une liste de gènes dont l'expression est spécifiquement régulée en présence de chacun des ligands. Cependant, les données de RNA-seq obtenues après 24h d'expression du RA-WT ou du RA-T576A n'ont pas permis de décrire un profil transcriptionnel différent entre les deux formes du récepteur en ce qui concerne ces gènes. En effet, dans notre modèle expérimental, l'activation du RA-WT par la DHT a abouti à la régulation de 60 gènes spécifiquement induits par la DHT et 116 gènes spécifiquement induits par la dexaméthasone dans le modèle proposé par Sahu et al. La présence du RA-T576A a quant à elle entraîné la modulation de l'expression de 62 gènes décrits comme DHT-spécifiques et 122 gènes comme dexaméthasone-spécifiques (Figure 50). Bien que le nombre de ces gènes diminue, des données similaires ont été obtenues après 72h de traitement des cellules à la DHT. Ainsi, l'orientation de la reconnaissance de motifs ressemblant à celui du RG en présence de la mutation T576A ne semble pas pour autant être un facteur entraînant la régulation spécifique de gènes RG-dépendants.

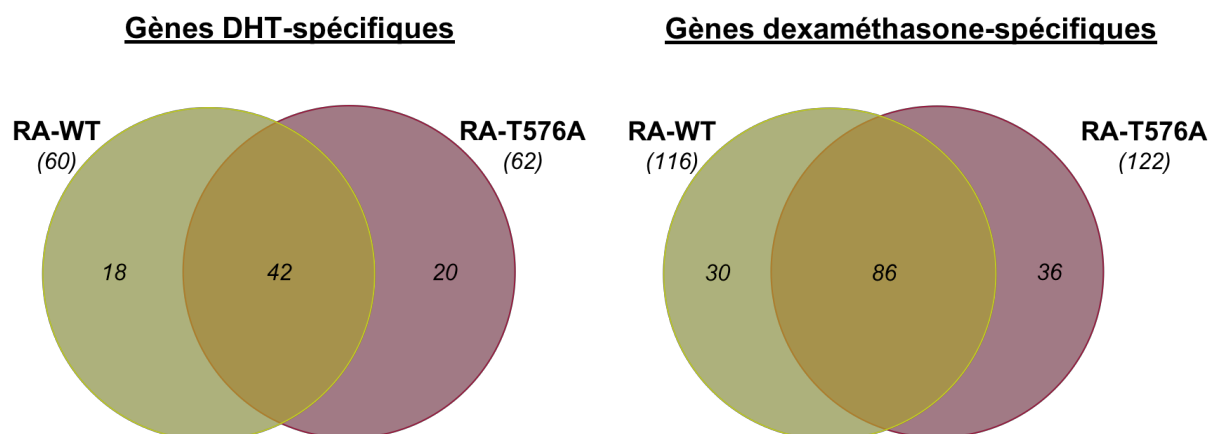


Figure 50 : Régulation de gènes connus pour répondre à la DHT ou à la dexaméthasone.

La plupart des gènes décrits par Sahu et al. (Sahu et al., 2013) comme induits par la DHT ou la dexaméthasone sont régulés communément par le RA-WT et le RA-T576A.

IV. Conclusion

Le RA est un acteur clé du CaP et est la cible de nombreuses mutations génétiques permettant la prolifération, la survie cellulaire, la progression tumorale ou encore la résistance à la castration. La mutation T576A a été identifiée chez des patients atteints d'un CaP métastatique mais n'a été jusqu'alors que peu étudiée (Marcelli et al., 2000; Monge et al., 2006). Ainsi, pour mieux caractériser le mode d'action du variant RA-T576A, l'analyse de ses fonctions génomiques a été réalisée par des techniques de séquençage haut-débit comme le ChiP-seq et le RNA-seq.

Les résultats ont permis de mettre en évidence une modulation de la reconnaissance de l'ADN séquence-dépendante en présence de cette mutation et notamment la nécessité d'une conservation plus importante des deux demi-sites 5'-ACAAGA-3' composant les ARE agencés en palindromes inversés. Cette observation pourrait s'expliquer par l'effet allostérique de la mutation T576A sur l'histidine H571. En effet, la perturbation du comportement dynamique de l'histidine H571 pourrait défavoriser la formation de liaisons hydrogènes entre cet acide aminé et le squelette sucre-phosphate de l'ADN, impliquant dès lors la nécessité d'une séquence nucléotidique plus conservée pour la liaison du dimère de RA à l'ADN.

Les données obtenues par RNA-seq ont montré la régulation d'un set de gènes spécifique par le mutant RA-T576A. Cependant, les investigations menées n'ont pas permis de corrélér cet ensemble de gènes avec le profil transcriptionnel d'un autre récepteur nucléaire tel que le RG. De plus, bien que l'analyse d'enrichissement fonctionnel ait mis en évidence l'implication des gènes spécifiquement régulés par le RA-T576A dans des fonctions comme le métabolisme des xénobiotiques, la réponse aux UV augmentée, l'adipogenèse, ou encore les voies de signalisation p53, Notch ou Wnt/ β -caténine, la plupart des fonctions identifiées sont apparues communes entre les deux formes du récepteur. Ces données, issues uniquement des analyses bio-informatiques des résultats, nécessitent d'être confirmées à l'aide de qPCR ciblant les gènes d'intérêt ou encore de tests fonctionnels.

D'un point de vue méthodologique, les expériences ont été réalisées dans les cellules LNCaP qui expriment un RA endogène. Au sein de la tumeur prostatique, les cellules expriment en même temps différentes formes du RA, qu'elles soient longues, tronquées ou porteuses de mutations ponctuelles. Ainsi, ce modèle cellulaire semble adéquat pour caractériser l'implication du RA dans le comportement des cellules tumorales. Cependant, il reste néanmoins difficile de différencier l'action du RA endogène de celle des récepteurs exprimés de manière inductible. De plus, de façon à mieux appréhender les différences d'expression génique observées entre les temps 24 et 72h en RNA-seq, il serait judicieux d'établir une méthodologie expérimentale incluant une cinétique avec des temps précoces tels que 6 ou 12h, des temps intermédiaires à 24h et 48h et des temps plus tardifs après 72h ou 120h d'expression des différentes formes du récepteur.

Les tumeurs prostatiques sont caractérisées par une hétérogénéité importante (Gundem et al., 2015; Robinson et al., 2015). Ainsi, au fait qu'une cellule de CaP exprime plusieurs formes de RA s'ajoute l'existence de différents clones cellulaires exprimant également un large panel de variants du RA. Au regard de ces informations, il est important de noter qu'au sein de l'échantillon ayant mené à l'identification du variant RA-T576A, deux autres formes du RA porteuses de la mutation T878A ou de la double mutation Q641X/T878A ont été détectées. Ainsi, il est difficile de déterminer l'implication du variant T576A dans le phénotype tumoral de ce patient. Toutefois, cette mutation touche un domaine très conservé des récepteurs nucléaires et constitue dès lors un modèle pertinent pour l'approfondissement des connaissances fondamentales du mode d'action du RA notamment en ce qui concerne la dynamique de reconnaissance des éléments de réponse de l'ADN.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Malgré les avancées scientifiques récentes, la résistance à la castration reste aujourd'hui un problème majeur dans le traitement du CaP. Pour améliorer la prise en charge thérapeutique des CRPC, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ce phénomène. Dans cette optique, les fonctions génomiques des variants constitutivement actifs RA-Q641X et RA-V7 mais aussi du RA-T576A découvert chez des patients atteints d'un CaP métastatique ont été étudiées.

I. Variants constitutifs et transcription

Les variants constitutifs du RA se caractérisent par l'absence du LBD, ce qui leur permet d'exercer leurs fonctions dans un environnement dépourvu d'androgènes. Ils sont associés à la progression tumorale et induisent notamment l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine, SNAIL ou ZEB1 (Cottard et al., 2013, Kong et al., 2015). Ils favorisent également la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques (Cottard et al., 2017; Sun et al., 2014). Ces données témoignent de l'impact crucial de l'expression des variants constitutifs du RA au sein des tumeurs prostatiques.

1) Perspectives de recherche

Les travaux développés dans la première partie de ce manuscrit permettent de mieux caractériser l'activité transcriptionnelle de ces variants constitutifs. Au regard des résultats obtenus, il apparaît qu'ils sont capables de mimer le RA sauvage, notamment grâce à la régulation d'un panel de gènes également régulés par le récepteur sauvage. Cependant, ils sont aussi associés à l'expression de gènes spécifiques. L'analyse de leur transcriptome a permis de mettre en évidence un enrichissement en gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse mais aussi la perte des fonctions associées au cycle cellulaire.

La régulation de ces gènes spécifiques pourrait s'expliquer par une différence de reconnaissance de l'ADN entre le RA sauvage et les variants RA-Q641X et RA-V7 mais aussi par le recrutement de partenaires protéiques différents. Cette dernière hypothèse est renforcée par les résultats obtenus en ce qui concerne la régulation du gène *CDH2*. En effet, les expériences ont montré que les différentes formes du RA étaient capables de se lier au niveau des ARE contenus dans l'intron 1 de ce gène mais que seuls les variants constitutifs étaient associés à l'augmentation de l'acétylation de l'histone H4, témoignant du recrutement

d'un complexe activateur à l'activité histone acétyltransférase. De plus, il existe plus de 300 partenaires décrits pour le RA sauvage dont une quarantaine interagit au niveau du LBD. Ainsi, la perte de ce domaine par les variants constitutivement actifs pourrait altérer le recrutement de ces cofacteurs. Cette situation est notamment décrite pour le co-activateur SRC-2 qui interagit avec le RA sauvage mais pas le RA-Q641X (Lapouge et al., 2008).

Pour mieux appréhender ces 2 possibilités biologiques, il est envisagé d'effectuer des études complémentaires. Dans un premier temps, des expériences de ChIP-seq dans des cellules de CaP exprimant le RA-WT, le variant RA-Q641X ou le RA-V7 permettraient de comparer le cistrome des différents récepteurs et de déterminer la reconnaissance de motifs privilégiés sur l'ADN. Après cela, l'utilisation d'un modèle d'expression du RA et de ses variants fusionnés à une biotine-ligase rendrait possible la purification des partenaires d'interaction protéiques et leur identification par spectrométrie de masse de manière à dresser l'interactome différentiel du RA sauvage et des variants constitutivement actifs.

2) Avancées thérapeutiques

Pour éviter les résistances à la castration dues à l'expression de variants constitutivement actifs du RA, des anti-androgènes ciblant la partie N-terminale du récepteur ont été développés. Le composé le plus prometteur est l'Acétate de Ralanitène qui interagit avec le domaine Tau-5 de la fonction AF-1 (Figure 51). Le potentiel thérapeutique de cette molécule a été démontré dans de nombreux modèles cellulaires et murins, ce qui a permis la mise au point d'un essai clinique de phase I /II actuellement en cours sur des hommes atteints de CRPC métastatiques en progression après traitement à l'Enzalutamide et/ou l'Acétate d'Abiratérone (Antonarakis et al., 2016; Nevedomskaya et al., 2018).

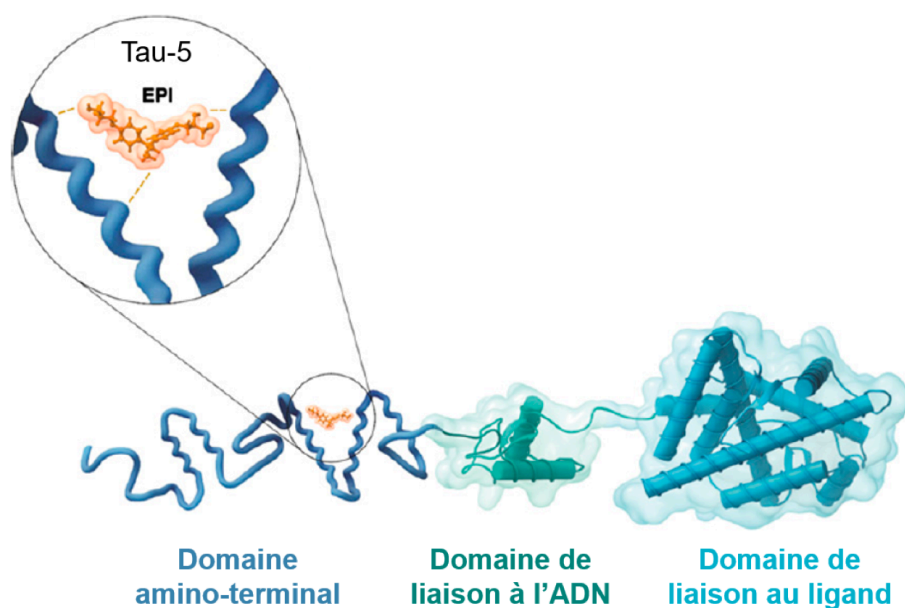


Figure 51 : L'Acétate de Ralatinène cible le domaine amino-terminal du récepteur.

La liaison de l'Acétate de Ralatinène (EPI-506) au niveau du domaine Tau-5 permet son action sur le récepteur sauvage mais aussi sur les variants constitutivement actifs ou ceux présentant une mutation ponctuelle du LBD. (d'après Antonarakis et al., 2016).

L'analyse d'échantillons cliniques a permis de mettre en évidence l'expression de la N-cadhérine dans les tumeurs résistantes à la castration. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'association entre l'expression de cette cadhérine et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion, la formation de métastases et la résistance à la castration. Ainsi, des anticorps monoclonaux ciblant cette protéine ont été développés. Leur utilisation dans un modèle murin a permis d'inhiber la croissance de xénogreffes, qu'elles soient RA positives ou négatives (Tanaka et al., 2010). D'un point de vue plus général, l'efficacité de l'Exherin, un peptide anti-N-cadhérine, a été prouvée au cours d'un essai clinique de phase I sur des patients atteints de tumeurs solides. Cependant, aucun homme atteint de CaP n'a été intégré à cette étude (Blaschuk, 2015; Perotti et al., 2009). Bien que ces données soulignent le potentiel d'une telle approche, peu d'études semblent considérer la N-cadhérine comme une cible thérapeutique. Ainsi, il apparaît aujourd'hui nécessaire de reprendre les investigations de manière à déterminer si cette piste représente une alternative solide aux traitements actuels.

II. Activité transcriptionnelle du variant T576A

Le variant RA-T576A a été découvert dans un échantillon biologique provenant d'une ponction médullaire orientée sur un site métastatique chez un patient atteint d'un CaP en échappement à la privation androgénique. Située dans le premier doigt de zinc du DBD, cette mutation a été associée à la modulation de la reconnaissance de l'ADN par le RA (Monge et al., 2006). Cependant, peu de données sont aujourd'hui disponibles sur les fonctions génomiques de ce variant et sa potentielle implication dans le phénomène de résistance à la castration. Pour approfondir les connaissances relatives à l'activité transcriptionnelle de ce variant, des analyses haut-débit ont été réalisées.

Les données présentées dans la deuxième partie de ce manuscrit ont permis de confirmer la modification séquence-dépendante de la reconnaissance de l'ADN en présence de la mutation T576A. De plus, l'analyse des sites de liaison privilégiés de ce mutant a montré la nécessité d'éléments de réponse plus conservés composés de deux hexamères organisés en palindrome inversé, expliquant ainsi un nombre de sites de liaison moins important pour le RA-T576A que pour le récepteur sauvage. En outre, les analyses transcriptomiques ont mis en évidence la régulation d'un ensemble de gènes spécifiques du RA-T576A. Ainsi, la reconnaissance différentielle de l'ADN en présence de la mutation T576A semble être associée à l'expression d'un transcriptome propre au mutant. Cependant, l'analyse approfondie de ces gènes n'a pas permis de les relier au phénomène de résistance observé chez le patient.

Dans l'objectif de mieux caractériser l'impact de la mutation T576A sur la dynamique de diffusion du RA dans le noyau, des expériences de perte de fluorescence induite par photoblanchiment sont en cours de développement au laboratoire. La reconnaissance privilégiée de séquences plus conservées par le RA-T576A pourrait engendrer un nombre plus important de points de contact avec l'ADN. Dans ce cas, la diffusion du variant T576A au sein du noyau serait moins importante que celle du RA sauvage et cela se traduirait par une moindre perte de la fluorescence après photoblanchiment.

III. Hétérogénéité tumorale

La caractérisation des fonctions du RA dans le CaP est rendue difficile par l'hétérogénéité des tumeurs prostatiques. Cette hétérogénéité repose sur le profil génétique distinct d'un patient par rapport à un autre mais peut aussi s'observer de manière spatiale au sein d'un même individu.

1) Différents niveaux de variabilité génétique

Au niveau cellulaire, différentes formes du RA sont co-exprimées. En effet, l'analyse des cellules circulantes tumorales de patients atteints de CRPC a permis de mettre en évidence la co-expression de différents variants constitutifs au sein d'une même cellule mais aussi de variants constitutifs et de formes longues du RA (Miyamoto et al., 2015). De plus, de nombreuses études ont montré la coopération mise en place entre les formes tronquées et les formes longues du RA qui interagissent entre elles. En effet, les variants RA-V7 et RAv567es sont capables de former des dimères avec les formes longues du RA, entraînant ainsi la localisation nucléaire de ces dernières en absence de ligand (Cao et al., 2014; Xu et al., 2015).

L'hétérogénéité des tumeurs prostatiques repose également sur le caractère multifocal du CaP. En effet, les différentes lésions cancéreuses présentent dès le début de la cancérogenèse des profils génétiques distincts (Shen and Abate-Shen, 2010). De plus, l'accumulation de mutations aboutit à l'émergence de nombreux clones cellulaires exprimant des formes différentes du RA. Les variants RA-V3, RA-V7 et RA-V9 ont par exemple été mis en évidence dans un même échantillon de CaP (Kallio et al., 2018). Les altérations génétiques aboutissent également à la formation de clones cellulaires androgéno-indépendants. Au sein d'une même tumeur, le statut du RA peut ainsi être très variable d'une cellule à l'autre.

La plupart des CaP sont des adénocarcinomes développés au dépend des acini. Ils sont caractérisés par une expansion des cellules luminales et la disparition de la couche basale. Ainsi, les cellules luminales, exprimant fortement le RA, représentent la composante majeure des tumeurs prostatiques et semblent en être l'origine principale (Packer and Maitland, 2016). Cependant, il a été décrit que les cellules basales de l'épithélium prostatique, qui expriment peu le RA, peuvent également être à l'origine des CaP (Goldstein et al., 2011). Des études récentes démontrent néanmoins une transdifférenciation des cellules basales à l'origine des tumeurs prostatiques en cellules luminales dans un modèle de xénogreffe

(Stoyanova et al., 2013; Wang et al., 2014). Bien que leur survenue soit rare, certaines tumeurs de la prostate se caractérisent aussi par la prolifération des cellules neuroendocrines ; on parle alors de carcinomes à petites cellules. De manière plus commune, les carcinomes acineux peuvent adopter un profil de différenciation neuroendocrine (Grignon, 2004; Shen and Abate-Shen, 2010). Les cellules neuroendocrines n'expriment pas le RA. En revanche, elles sécrètent de nombreux facteurs qui peuvent, par action paracrine, activer des cascades de signalisation aboutissant à l'activation du récepteur dans les cellules luminales voisines (Amorino and Parsons, 2004; Hirano et al., 2004; Hobisch et al., 1998; Lee et al., 2001, 2004; Moore et al., 1999; Reubi et al., 2002; Sehgal et al., 1994). Les différents types cellulaires composant la tumeur sont ainsi un facteur de variabilité important.

Le stroma participe aussi à l'hétérogénéité des tumeurs prostatiques. En effet, la mise en place d'un stroma réactif accompagne la cancérogenèse. Elle repose sur le recrutement de cellules immunitaires ou de fibroblastes associés au cancer (Calcinotto et al., 2018; Mehra et al., 2016). Ces cellules sont capables de sécréter bon nombre de facteurs influant la croissance des cellules de CaP ou encore leur potentiel métastatique (Han et al., 2015; Kalluri, 2016; LeBleu and Kalluri, 2018). Les cellules myéloïdes suppressives peuvent notamment favoriser l'expression du RA par les cellules épithéliales grâce à la sécrétion d'interleukine-23 (Calcinotto et al., 2018). Ainsi, le comportement de la tumeur est influencé par la composition variable du stroma.

Enfin, des profils génétiques différents sont observés entre la tumeur primaire et les métastases. Cette différence repose sur l'acquisition de mutations supplémentaires au niveau des sites secondaires (Gundem et al., 2015).

L'hétérogénéité tumorale s'observe donc de manière inter et intra-individuelle et constitue un obstacle important en ce qui concerne la caractérisation des fonctions génomiques des différentes formes du RA mais également, de manière plus clinique, la prise en charge thérapeutique des patients qui peuvent à la fois présenter des foyers tumoraux sensibles au traitement et d'autres qui y sont résistants.

2) Stratégies de recherche actuelles et perspectives

Les techniques de séquençage haut-débit sont devenues ces dernières années un outil majeur pour la caractérisation de l'hétérogénéité tumorale. En effet, le séquençage d'échantillons de patients a permis de mettre en évidence la disparité génétique qui réside de manière spatiale au sein de la tumeur localisée, entre les différents foyers d'initiation ou encore entre la tumeur primaire et les sites de dissémination métastatique mais aussi l'hétérogénéité inter-individuelle. Ces études ont permis de découvrir de nouvelles mutations génétiques répandues de manière représentative dans la population de patients atteints de CRPC mais aussi de dresser l'arbre phylogénétique de l'évolution tumorale d'un patient donné (Figure 52) (Boutros et al., 2015; Gundem et al., 2015; Robinson et al., 2015).

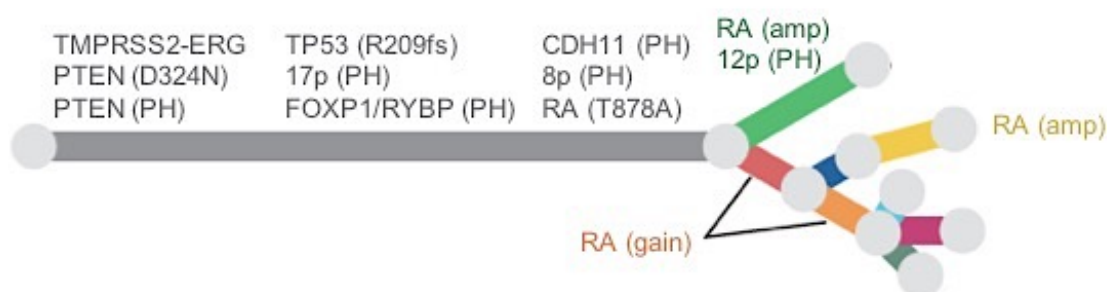


Figure 52 : Arbre phylogénétique établi par séquençage d'échantillons d'un patient atteint d'un cancer de la prostate métastatique.

Le premier segment représente l'accumulation des mutations au niveau de la tumeur primaire. Chaque segment suivant matérialise un événement de dissémination métastatique et les altérations génétiques associées. Abréviations : amp = amplification ; PH = perte d'hétérozygotie (d'après Gundem et al., 2015).

Bien que la caractérisation des tumeurs réalisées à l'aide du séquençage haut-débit témoigne de l'hétérogénéité tumorale globale, elle ne rend pas compte de la variabilité génétique qui résident au niveau intercellulaire (Figure 53). Avec l'essor des technologies appliquées aux cellules uniques, il serait judicieux de mettre en place un plan expérimental reposant sur le séquençage d'un échantillonnage de cellules représentatives des différentes sous-populations de la tumeur après collection d'échantillons auprès d'une cohorte de patients. Cela permettrait de comprendre ce qui se passe au sein de chaque cellule avant d'imbriquer les pièces les unes avec les autres pour reconstituer le puzzle formé par chaque tumeur et mieux comprendre le phénotype des patients.

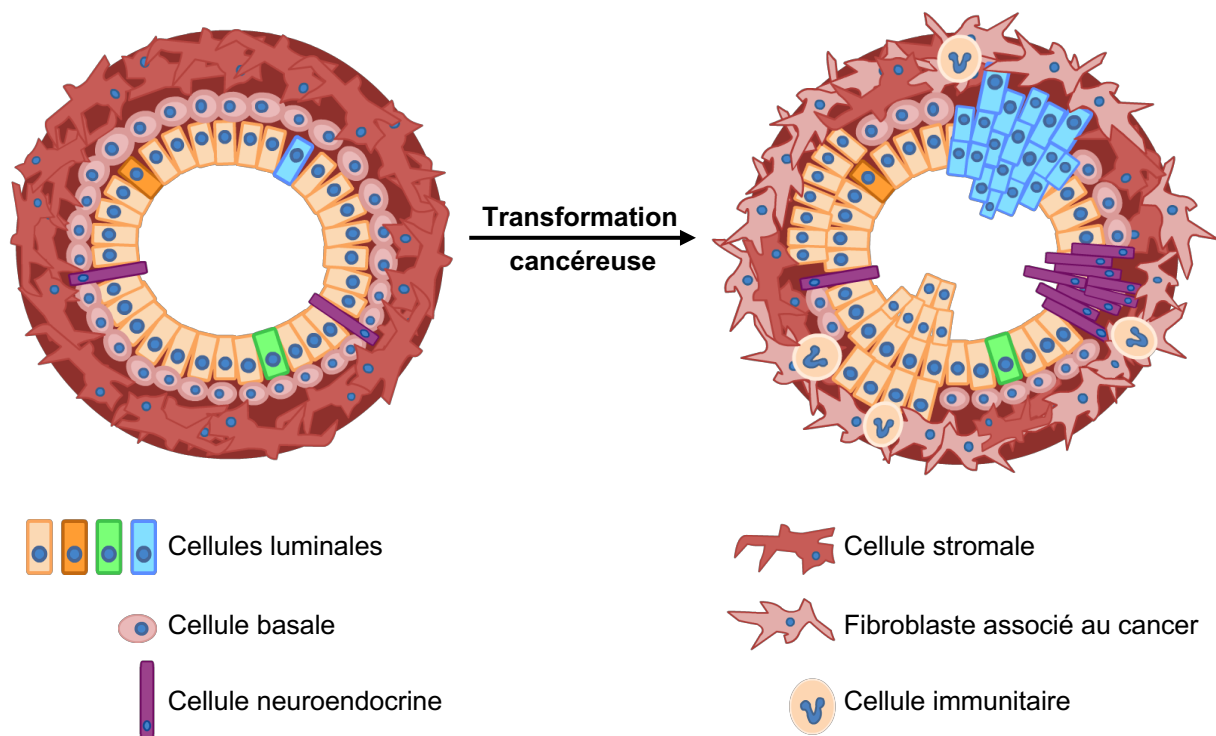


Figure 53 : Hétérogénéité tumorale intercellulaire.

L'adénocarcinome acineux est caractérisé par la prolifération de différents clones de cellules luminales, la disparition des cellules basales, des foyers de différenciation neuroendocrine et la modification du stroma notamment par le recrutement de fibroblastes associés au cancer et de cellules immunitaires.

Globalement, ces travaux de thèse ont permis d'appuyer l'implication des variants constitutifs du RA dans la progression tumorale en caractérisant leurs fonctions génomiques. Le variant RA-T576A s'est révélé être un modèle d'étude important pour mieux comprendre le mode d'action du récepteur sauvage. Cependant, il est bon de garder en mémoire l'hétérogénéité caractéristique du CaP qui peut être vu comme une mosaïque où chaque clone cellulaire est pourvu de son propre profil génétique.

Références bibliographiques

- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 14, 2410–2434.
- Adjakly, M., Ngollo, M., Dagdemir, A., Judes, G., Pajon, A., Karsli-Ceppioglu, S., Penault-Llorca, F., Boiteux, J.P., Bignon, Y.J., Guy, L., et al. (2015). Prostate cancer: The main risk and protective factors-Epigenetic modifications. *Ann. Endocrinol.* 76, 25–41.
- Alex, A.B., Pal, S.K., and Agarwal, N. (2016). CYP17 inhibitors in prostate cancer: Latest evidence and clinical potential. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 8, 267–275.
- Alexander, S.P., Cidlowski, J.A., Kelly, E., Marrion, N., Peters, J.A., Benson, H.E., Faccenda, E., Pawson, A.J., Sharman, J.L., Southan, C., et al. (2015). The Concise Guide to Pharmacology 2015/16: Nuclear hormone receptors. *Br. J. Pharmacol.* 16, 5956–5978.
- Alvarez-Cubero, M.J., Saiz, M., Martinez-Gonzalez, L.J., Alvarez, J.C., Lorente, J.A., and Cozar, J.M. (2013). Genetic analysis of the principal genes related to prostate cancer: A review. *Urol. Oncol.* 31, 1419–1429.
- Amorino G.P., and Parsons S.J. (2004). Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 287–300.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169.
- Antonarakis, E.S., Chandhasin, C., Osbourne, E., Luo, J., Sadar, M.D., and Perabo, F. (2016). Targeting the N-Terminal Domain of the Androgen Receptor: A New Approach for the Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Oncologist* 21, 1427–1435.
- Antonarakis, E.S., Lu, C., Wang, H., Lubner, B., Nakazawa, M., Roeser, J.C., Chen, Y., Mohammad, T.A., Chen, Y., Fedor, H.L., et al. (2014). AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* 371, 1028–1038.
- Arakawa, H., Nakanishi, T., Yanagihara, C., Nishimoto, T., Wakayama, T., Mizokami, A., Namiki, M., Kawai, K., and Tamai, I. (2012). Enhanced expression of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in androgen receptor-positive prostate cancer cells: Possible role of OATP1A2 in adaptive cell growth under androgen-depleted conditions. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1070–1077.
- Armandari, I., Hamid, A.R., Verhaegh, G., and Schalken, J. (2014). Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate Int.* 2, 105–113.
- Arnsrud Godtman, R., Holmberg, E., Lilja, H., Stranne, J., and Hugosson, J. (2015). Opportunistic Testing Versus Organized Prostate-specific Antigen Randomized Screening: Outcome After 18 Years in the Population-based Prostate Cancer Screening Trial. *Eur. Urol.* 68, 354–360.

- Arora, V.K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S.K., Wongvipat, J., Balbas, M.D., Shah, N., Cai, L., Efstathiou, E., Logothetis, C., et al. (2013). Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* 155, 1309–1322.
- Attard, G., Reid, A.H.M., Auchus, R.J., Hughes, B.A., Cassidy, A.M., Thompson, E., Oommen, N.B., Folkard, E., Dowsett, M., Arlt, W., et al. (2012). Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 507–516.
- Bailey, T.L., and Elkan, C. (1994). Fitting a Mixture Model by Expectation Maximization to Discover Motifs in Bipolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2, 28–36.
- Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., and Noble, W.S. (2009). MEME Suite: Tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, 202–208.
- Barbieri, C.E., Baca, S.C., Lawrence, M.S., Demichelis, F., Blattner, M., Theurillat, J.P., White, T.A., Stojanov, P., Van Allen, E., Stransky, N., et al. (2012). Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* 44, 685–689.
- Barron, D.A., and Rowley, D.R. (2012). The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr. Relat. Cancer* 19, 187–204.
- Basu, S., and Tindall, D.J. (2010). Androgen action in prostate cancer. *Horm. Cancer* 1, 223–228.
- Baylot, V., Katsogiannou, M., Andrieu, C., Taieb, D., Acunzo, J., Giusiano, S., Fazli, L., Gleave, M., Garrido, C., and Rocchi, P. (2012). Targeting TCTP as a new therapeutic strategy in castration-resistant prostate cancer. *Mol. Ther.* 20, 2244–2256.
- Beer, T.M., Armstrong, A.J., Rathkopf, D.E., Loriot, Y., Sternberg, C.N., Higano, C.S., Iversen, P., Bhattacharya, S., Carles, J., Chowdhury, S., et al. (2014). Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 371, 424–433.
- Belikov, S., Bott, L.C., Fischbeck, K.H., and Wrangé, Ö. (2015). The polyglutamine-expanded androgen receptor has increased DNA binding and reduced transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Reports* 3, 134–139.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc.* 57, 289–300.
- Bennett, N.C., Gardiner, R.A., Hooper, J.D., Johnson, D.W., and Gobe, G.C. (2010). Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 813–827.
- Bernard, D., and Pourtier-Manzanedo, a (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J. Clin. Invest.* 112, 1724–1731.
- Berry, P.A., Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2008). Androgen receptor signalling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 288, 30–37.
- Beuten, J., Gelfond, J.A.L., Franke, J.L., Shook, S., Johnson-Pais, T.L., Thompson, I.M., and Leach, R.J. (2010). Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 588–599.
- Blaschuk, O.W. (2015). N-cadherin antagonists as oncology therapeutics. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 370, 20140039.

Boissier, R. (2011). L'antigène spécifique de la prostate ou PSA. *Prog. En Urol.* 21, 798–800.

De Bono, J.S., Pezaro, C.J., Gillessen, S., Shore, N.D., Nordquist, L.T., Efsthathiou, E., Araujo, J.C., Berry, W.R., Liu, G., Vogelzang, N.J., et al. (2015). The oral CYP-17-Lyase (L) inhibitor VT-464 in patients with CRPC. *J. Clin. Oncol.* 33, 187.

Boutros, P.C., Fraser, M., Harding, N.J., De Borja, R., Trudel, D., Lalonde, E., Meng, A., Hennings-Yeomans, P.H., Mc Pherson, A., Sabelnykova, V.Y., et al. (2015). Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat. Genet.* 47, 736–745.

Brawer, M.K. (2005). Prostatic intraepithelial neoplasia: an overview. *Rev. Urol.* 7, 11–18.

Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., Schraml, P., Moch, H., Gasser, T.C., Willi, N., Mihatsch, M.J., Sauter, G., and Kallioniemi, O. (1999a). Survey of Gene Amplifications during Prostate Cancer Progression by High-Throughput Fluorescence in Situ Hybridization on Tissue Microarrays. *Cancer Res.* 59, 803–806.

Bubendorf, L., Kolmer, M., Kononen, J., Koivisto, P., Mousses, S., Chen, Y., Mahlamaki, E., Schraml, P., Moch, H., Willi, N., et al. (1999b). Hormone Therapy Failure in Human Prostate Cancer: Analysis by Complementary DNA and Tissue Microarrays. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1758–1764.

Bussemakers, M.J.G., Bokhoven, A. Van, Verhaegh, G.W., Smit, F.P., Karthaus, H.F.M., Schalken, J.A., Debruyne, F.M.J., Ru, N., and Isaacs, W.B. (1999). DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Res.* 59, 5975–5979.

Buzzoni, C., Auvinen, A., Roobol, M.J., Carlsson, S., Moss, S.M., Puliti, D., Koning, H.J. De, Bangma, C.H., Denis, L.J., Kwiatkowski, M., et al. (2015). Metastatic Prostate Cancer Incidence and Prostate-specific Antigen Testing: New Insights from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Eur. Urol.* 68, 885–890.

Calcinotto, A., Spataro, C., Zagato, E., Di Mitri, D., Gil, V., Crespo, M., De Bernardis, G., Losa, M., Mirenda, M., Pasquini, E., et al. (2018). IL-23 secreted by myeloid cells drives castration-resistant prostate cancer. *Nature* 559, 363–369.

Cao, B., Qi, Y., Zhang, G., Xu, D., Zhan, Y., Alvarez, X., Guo, Z., Fu, X., Plymate, S.R., Sartor, O., et al. (2014). Androgen receptor splice variants activating the full-length receptor in mediating resistance to androgen-directed therapy. *Oncotarget* 5, 1646–1656.

Cao, S., Zhan, Y., and Dong, Y. (2016). Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 23, T199–T210.

Carreira, S., Romanel, A., Goodall, J., Grist, E., Ferraldeschi, R., Miranda, S., Prandi, D., Lorente, D., Frenel, J.S., Pezaro, C., et al. (2014). Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci. Transl. Med.* 6, 54ra125.

Carver, B.S., Tran, J., Gopalan, A., Chen, Z., Shaikh, S., Carracedo, A., Alimonti, A., Nardella, C., Varmeh, S., Scardino, P.T., et al. (2009). Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat. Genet.* 41, 619–624.

Castro, E., Goh, C., Olmos, D., Saunders, E., Leongamornlert, D., Tymrakiewicz, M., Mahmud, N., Dadaev, T., Govindasami, K., Guy, M., et al. (2013). Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 31, 1748–1757.

- Céraline, J., Cruchant, M.D., Erdmann, E., Erbs, P., Kurtz, J.E., Duclos, B., Jacqmin, D., Chopin, D., and Bergerat, J.P. (2004). Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: A new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int. J. Cancer* 108, 152–157.
- Chang, B., Zheng, S.L., Hawkins, G. a, Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Turner, A., Carpten, J.D., Bleecker, E.R., Walsh, P.C., Trent, J.M., et al. (2002). Joint Effect of HSD3B1 and HSD3B2 Genes Is Associated with Hereditary and Sporadic Prostate Cancer Susceptibility. *Cancer Res.* 62, 1784–1789.
- Chang, K.-H., Li, R., Papari-Zareei, M., Watumull, L., Zhao, Y.D., Auchus, R.J., and Sharifi, N. (2011). Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 13728–13733.
- Chen, G., Wang, X., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., Zhang, J., Li, Z., and Lu, J. (2005). Androgen receptor mutants detected in recurrent prostate cancer exhibit diverse functional characteristics. *Prostate* 63, 395–406.
- Chen, H., Libertini, S.J., Wang, Y., Kung, H.J., Ghosh, P., and Mudryj, M. (2010). ERK regulates calpain 2-induced androgen receptor proteolysis in CWR22 relapsed prostate tumor cell lines. *J. Biol. Chem.* 285, 2368–2374.
- Chen, Y., Clegg, N.J., and Scher, H.I. (2009). Anti-androgens and androgen-depleting therapies in prostate cancer: new agents for an established target. *Lancet Oncol.* 10, 981–991.
- Chipuk, J.E., Cornelius, S.C., Pultz, N.J., Jorgensen, J.S., Bonham, M.J., Kim, S.J., and Danielpour, D. (2002). The androgen receptor represses transforming growth factor- β signaling through interaction with Smad3. *J. Biol. Chem.* 277, 1240–1248.
- Choong, C.S., Kemppainen, J.A., Zhou, Z.X., and Wilson, E.M. (1996). Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol. Endocrinol.* 10, 1527–1535.
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C., and Haelens, A. (2008). Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl. Recept. Signal.* 6, e008.
- Clinckemalie, L., Vanderschueren, D., Boonen, S., and Claessens, F. (2012). The hinge region in androgen receptor control. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 1–8.
- Coffey, K., and Robson, C.N. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J. Endocrinol.* 215, 221–237.
- Cottard, F., Asmane, I., Erdmann, E., Bergerat, J.P., Kurtz, J.E., and Céraline, J. (2013). Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. *PLoS One* 8, e63466.
- Cottard, F., Ould Madi-Berthélémy, P., Erdmann, E., Schaff-Wendling, F., Keime, C., Ye, T., Kurtz, J.-E., and Céraline, J. (2017). Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer. *Oncotarget* 8, 72008–72020.
- Dai, B., Chen, H., Guo, S., Yang, X., Linn, D.E., Sun, F., Li, W., Guo, Z., Xu, K., Kim, O., et al. (2010). Compensatory upregulation of tyrosine kinase Etk/BMX in response to androgen deprivation promotes castration-resistant growth of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 70, 5587–5596.

- Davies, P., Watt, K., Kelly, S.M., Clark, C., Price, N.C., and McEwan, I.J. (2008). Consequences of poly-glutamine repeat length for the conformation and folding of the androgen receptor amino-terminal domain. *J. Mol. Endocrinol.* *41*, 301–314.
- Dehm, S.M., and Tindall, D.J. (2007). Androgen Receptor Structural and Functional Elements: Role and Regulation in Prostate Cancer. *Mol. Endocrinol.* *21*, 2855–2863.
- Dehm, S.M., Schmidt, L.J., Heemers, H. V., Vessella, R.L., and Tindall, D.J. (2008). Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* *68*, 5469–5477.
- Deramaudt, T.B., Remy, P., and Stiegler, P. (2001). Identification of interaction partners for two closely-related members of the ETS protein family, FLI and ERG. *Gene* *274*, 169–177.
- Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains from structures to functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 659–671.
- Efstathiou, E., Titus, M., Wen, S., Hoang, A., Karlou, M., Ashe, R., Tu, S.M., Aparicio, A., Troncoso, P., Mohler, J., et al. (2015). Molecular characterization of enzalutamide-treated bone metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. Urol.* *67*, 53–60.
- Epstein, J.I., Allsbrook, W.C., Amin, M.B., Egevad, L.L., Bastacky, S., López Beltrán, A., Berner, A., Billis, A., Boccon-Gibod, L., Cheng, L., et al. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* *29*, 1228–1242.
- Epstein, J.I., Egevad, L., Amin, M.B., Dalahunt, B., Srigley, J.R., Humphrey, P.A., and the Grading Committee. (2016a). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma : Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading. *Am. J. Surg. Pathol.* *40*, 244–252.
- Epstein, J.I., Zelefsky, M.J., Sjoberg, D.D., Nelson, J.B., Egevad, L., Magi-galluzzi, C., Vickers, A.J., Parwani, A. V, Reuter, V.E., Fine, S.W., et al. (2016b). A Contemporary Prostate Cancer Grading System : A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur. Urol.* *69*, 428–435.
- Fankhauser, M., Tan, Y., Macintyre, G., Haviv, I., Hong, M.K.H., Nguyen, A., Pedersen, J.S., Costello, A.J., Hovens, C.M., and Corcoran, N.M. (2014). Canonical androstenedione reduction is the predominant source of signaling androgens in hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *20*, 5547–5557.
- Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman D, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359-386.
- Ferraldeschi, R., Welte, J., Powers, M. V., Yuan, W., Smyth, T., Seed, G., Riisnaes, R., Hedayat, S., Wang, H., Crespo, M., et al. (2016). Second-generation HSP90 inhibitor onalespib blocks mRNA splicing of androgen receptor variant 7 in prostate cancer cells. *Cancer Res.* *76*, 2731–2742.
- Fizazi, K., Scher, H.I., Molina, A., Logothetis, C.J., Chi, K.N., Jones, R.J., Staffurth, J.N., North, S., Vogelzang, N.J., Saad, F., et al. (2012). Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: Final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* *13*, 983–992.
- Fu, M., Rao, M., Wang, C., Sakamaki, T., Wang, J., Di Vizio, D., Zhang, X., Albanese, C., Balk, S., Chang, C., et al. (2003). Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8563–8575.

- Ganong, W. (2005). Les gonades : Le développement et la fonction du système reproducteur. in *Physiologie Médicale*, de Boeck, 387-428.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 685–704.
- Gioeli, D., and Paschal, B.M. (2012). Post-translational modification of the androgen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 70–78.
- Gleason, D.F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* 50, 125–128.
- Gnanapragasam, V.J., Leung, H.Y., Pulimood, A.S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2001). Expression of RAC 3, a steroid hormone receptor co-activator in prostate cancer. *Br. J. Cancer* 85, 1928–1936.
- Goldstein, A.S., Huang, J., Guo, C., Garraway, I.P., and Witte, O.N. (2011). Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science* 329, 568–571.
- Gosselaar, C., Roobol, M.J., Roemeling, S., and Schröder, F.H. (2008). The Role of the Digital Rectal Examination in Subsequent Screening Visits in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC). *Eur. Urol.* 54, 581–588.
- Gottlieb, B., Beitel, L.K., Nadarajah, A., Paliouras, M., and Trifiro, M. (2012). The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum. Mutat.* 33, 887–894.
- Grasso, C.S., Wu, Y.M., Robinson, D.R., Cao, X., Dhanasekaran, S.M., Khan, A.P., Quist, M.J., Jing, X., Lonigro, R.J., Brenner, J.C., et al. (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487, 239–243.
- Gregory, C.W., Fei, X., Ponguta, L. a, He, B., Bill, H.M., French, F.S., and Wilson, E.M. (2004). Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 279, 7119–7130.
- Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (2001). Advances in Brief A Mechanism for Androgen Receptor-mediated Prostate Cancer Recurrence after Androgen Deprivation Therapy 1. *Cancer Res.* 61, 4315–4319.
- Gregory, C.W., Whang, Y.E., McCall, W., Fei, X., Liu, Y., Ponguta, L. a, French, F.S., Wilson, E.M., and Iii, H.S.E. (2005). Heregulin-Induced Activation of HER2 and HER3 Increases Androgen Receptor Transactivation and CWR-R1 Human Recurrent Prostate Cancer Cell Growth. *Clin. Cancer Res.* 11, 1704–1712.
- Grignon, D.J. (2004). Unusual subtypes of prostate cancer. *Mod. Pathol.* 17, 316–327.
- Grosse, A., Bartsch, S., and Baniahmad, A. (2012). Androgen receptor-mediated gene repression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 46–56.
- Grossmann, M., Thomas, M.C., Panagiotopoulos, S., Sharpe, K., MacIsaac, R.J., Clarke, S., Zajac, J.D., and Jerums, G. (2008). Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 1834–1840.
- Gundem, G., Van Loo, P., Kremeyer, B., Alexandrov, L.B., Tubio, J.M.C., Papaemmanuil, E., Brewer, D.S., Kallio, H.M.L., Högnäs, G., Annala, M., et al. (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 520, 353–357.

Guo, Z., Dai, B., Jiang, T., Xu, K., Xie, Y., Kim, O., Nesheiwat, I., Kong, X., Melamed, J., Handratta, V.D., et al. (2006). Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 10, 309–319.

Guo, Z., Yang, X., Sun, F., Jiang, R., Linn, D.E., Chen, H., Chen, H., Kong, X., Melamed, J., Tepper, C.G., et al. (2009). A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res.* 69, 2305–2313.

Gupta, S., Iljin, K., Sara, H., Mpindi, J.P., Mirtti, T., Vainio, P., Rantala, J., Alanen, K., Nees, M., and Kallioniemi, O. (2010). FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 70, 6735–6745.

Han, Y., Zhang, Y., Jia, T., and Sun, Y. (2015). Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. *Tumor Biol.* 36, 1385–1394.

Hara, T., Miyazaki, J., and Araki, H. (2003). Novel Mutations of Androgen Receptor : A Possible Mechanism of Bicalutamide Withdrawal Syndrome. *Cancer Res.* 63, 149–153.

Harnden, P., Shelley, M.D., Coles, B., Staffurth, J., and Mason, M.D. (2007). Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 8, 411–419.

Harris, W.P., Mostaghel, E.A., Nelson, P.S., and Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: Progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 6, 76–85.

Hay, C.W., and McEwan, I.J. (2012). The impact of point mutations in the human androgen receptor: Classification of mutations on the basis of transcriptional activity. *PLoS One* 7, e32514.

He, Y., Lu, J., Ye, Z., Hao, S., Wang, L., Kohli, M., Tindall, D.J., Li, B., Zhu, R., Wang, L., et al. (2018). Androgen receptor splice variants bind to constitutively open chromatin and promote abiraterone-resistant growth of prostate cancer. *Nucleic Acids Res.* 46, 1895–1911.

Heemers, H. V., and Tindall, D.J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr. Rev.* 28, 778–808.

Hendriks, I.A., and Vertegaal, A.C.O. (2016). A comprehensive compilation of SUMO proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 581–595.

Hessels, D., Klein, J.M.T., Oort, I. Van, Karthaus, H.F.M., Leenders, G.J.L. Van, Balken, B. Van, and Kiemeny, L.A. (2003). DD3 PCA3 -based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Eur. Urol.* 44, 8–16.

Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y., and Nemoto, N. (2004). Neuroendocrine Differentiation in Hormone Refractory Prostate Cancer Following Androgen Deprivation Therapy. *Eur. Urol.* 45, 586–592.

Hobisch, A., Eder, I.E., Putz, T., Horninger, W., Bartsch, G., Klocker, H., and Culig, Z. (1998). Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 58, 4640–4645.

Hofland, J., Van Weerden, W.M., Dits, N.F.J., Steenberg, J., Van Leenders, G.J.L.H., Jenster, G., Schröder, F.H., and De Jong, F.H. (2010). Evidence of limited contributions for intratumoral steroidogenesis in prostate cancer. *Cancer Res.* 70, 1256–1264.

Hörnberg, E., Ylitalo, E.B., Crnalic, S., Antti, H., Stattin, P., Widmark, A., Bergh, A., and Wikström, P. (2011). Expression of androgen receptor splice variants in prostate cancer bone metastases is associated with castration-resistance and short survival. *PLoS One* 6.

Hu, R., Lu, C., Mostaghel, E.A., Yegnasubramanian, S., Gurel, M., Tannahill, C., Edwards, J., Isaacs, W.B., Nelson, P.S., Bluemn, E., et al. (2012). Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 72, 3457–3462.

Huggins, C., and Hodges, C. V. (1941). Studies of prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.* 1, 293-297.

Humphrey, P.A. (2007). Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J. Clin. Pathol.* 60, 35–42.

Hur, E., Pfaff, S.J., Sturgis Payne, E., Grøn, H., Buehrer, B.M., and Fletterick, R.J. (2004). Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biol.* 2, e274.

Irvine, R.A., Ma, H., Yu, M.C., Ross, R.K., Stallcup, M.R., and Coetzee, G.A. (2000). Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum. Mol. Genet.* 9, 267–274.

Isikbay, M., Otto, K., Kregel, S., Kach, J., Cai, Y., Vander Griend, D.J., Conzen, S.D., and Szmulewitz, R.Z. (2014). Glucocorticoid Receptor Activity Contributes to Resistance to Androgen-Targeted Therapy in Prostate Cancer. *Horm. Cancer* 5, 72–89.

Jagla, M., Fève, M., Kessler, P., Lapouge, G., Erdmann, E., Serra, S., Bergerat, J.P., and Céraline, J. (2007). A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology* 148, 4334–4343.

Jaworska, D., Król, W., and Szliszka, E. (2015). Prostate cancer stem cells: Research advances. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 27433–27449.

Jéhannin-Ligier, K., Dantony, E., Bossard, N., Molinié, F., Defossez, G., Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Remontet, L., and Uhry, Z. (2017). Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2017. *Santé publique France*.

Jeter, C.R., Liu, B., Lu, Y., Chao, H.P., Zhang, D., Liu, X., Chen, X., Li, Q., Rycaj, K., Calhoun-Davis, T., et al. (2016). NANOG reprograms prostate cancer cells to castration resistance via dynamically repressing and engaging the AR/FOXA1 signaling axis. *Cell Discov.* 2, 1–19.

Ji, E., Mb, A., Jr, S., Pa, H., and Committee, G. (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma : Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading. *Am J Surg Pathol* 40, 2013–2014.

Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582–598.

- Kaltz-wittmer, C., Klenk, U., Glaessgen, A., Aust, D.E., Diebold, J., Lo, U., and Baretton, G.B. (2000). FISH Analysis of Gene Aberrations (MYC , CCND1 , Carcinomas Before and After Androgen Deprivation Therapy. *80*, 1455–1464.
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R., et al. (2010). Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 411–422.
- Karantanos, T., Corn, P.G., and Thompson, T.C. (2013). Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: Mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* *32*, 5501–5511.
- Karlsson, R., Aly, M., Clements, M., Zheng, L., Adolfsson, J., Xu, J., Grönberg, H., and Wiklund, F. (2014). A population-based assessment of germline HOXB13 G84E mutation and prostate cancer risk. *Eur. Urol.* *65*, 169–176.
- Kasivisvanathan, V., Rannikko, A.S., Borghi, M., Panebianco, V., Mynderse, L.A., Vaarala, M.H., Briganti, A., Budäus, L., Hellawell, G., Hindley, R.G., et al. (2018). MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1767–1777.
- Katsogiannou, M., Ziouziou, H., Karaki, S., Andrieu, C., Henry de Villeneuve, M., and Rocchi, P. (2015). The hallmarks of castration-resistant prostate cancers. *Cancer Treat. Rev.* *41*, 588–597.
- Kattan, M.W. (2003). Nomograms are superior to staging and risk grouping systems for identifying high-risk patients: Preoperative application in prostate cancer. *Curr. Opin. Urol.* *13*, 111–116.
- Keating, G.M. (2015). Enzalutamide : A Review of Its Use in Chemotherapy-Naï Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Drugs Aging* *32*, 243–249.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions Daehwan. *Genome Biol.* *14*.
- Kim, J., and Coetzee, G.A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J. Cell. Biochem.* *93*, 233–241.
- Mc Kinley, M.P., Dean O'Loughlin, V., and Stouter Bidle, T. (2014). Anatomie et physiologie : une approche intégrée. Maloine.
- Köhler, A., Demir, Ü., Kickstein, E., Krauss, S., Aigner, J., Aranda-Orgillés, B., Karagiannidis, A.I., Achmüller, C., Bu, H., Wunderlich, A., et al. (2014). A hormone-dependent feedback-loop controls androgen receptor levels by limiting MID1, a novel translation enhancer and promoter of oncogenic signaling. *Mol. Cancer* *13*, 1–16.
- De Kok, J.B., Verhaegh, G.W., Roelofs, R.W., Hessels, D., Kiemeney, L.A., Aalders, T.W., Swinkels, D.W., and Schalken, J.A. (2002). DD3 PCA3 , a Very Sensitive and Specific Marker to Detect Prostate Tumors. *Cancer Res.* *62*, 2695–2698.
- Kong, D., Sethi, S., Li, Y., Chen, W., Sakr, W.A., Heath, E., and Sarkar, F.H. (2015). Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes. *Prostate* *75*, 161–174.

- Kote-Jarai, Z., Leongamornlert, D., Saunders, E., Tymrakiewicz, M., Castro, E., Mahmud, N., Guy, M., Edwards, S., O'Brien, L., Sawyer, E., et al. (2011). BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: Implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* 105, 1230–1234.
- Kumar, R., Atamna, H., Zakharov, M.N., Bhasin, S., Khan, S.H., and Jasuja, R. (2011). Role of the androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer, and spinal and bulbar muscular atrophy. *Life Sci.* 88, 565–571.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., and Simard, J. (2001). DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: Intracrinology. *Front. Neuroendocrinol.* 22, 185–212.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10.
- Lapouge, G., Erdmann, E., Marcias, G., Jagla, M., Monge, A., Kessler, P., Serra, S., Lang, H., Jacqmin, D., Bergerat, J.P., et al. (2007). Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation - A new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int. J. Cancer* 121, 1238–1244.
- Lapouge, G., Marcias, G., Erdmann, E., Kessler, P., Cruchant, M., Serra, S., Bergerat, J.P., and Céraline, J. (2008). Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 617, 529–534.
- Larsen, W.J. (2011). Développement du système urogénital. in *Embryologie humaine*, de Boeck, 265–313.
- Latorzeff, I., and Gamé, X. (2011). Le cancer de la prostate. *Bull. Infirm. Du Cancer* 11, 43–53.
- LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2018). A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis. Model. Mech.* 11, dmm029447.
- Lee, L., Guan, J., Qiu, Y., and Kung, H. (2001). Neuropeptide-Induced Androgen Independence in Prostate Cancer Cells: Roles of Nonreceptor Tyrosine Kinases Etk / Bmx, Src, and Focal Adhesion Kinase. *Mol. Cell. Bio.* 21, 8385–8397.
- Lee, L.F., Louie, M.C., Desai, S.J., Yang, J., Chen, H.W., Evans, C.P., and Kung, H.J. (2004). Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: Differential effects of tyrosine kinases Src and FAK. *Oncogene* 23, 2197–2205.
- Leung, J.K., and Sadar, M.D. (2017). Non-genomic actions of the androgen receptor in prostate cancer. *Front. Endocrinol.* 8, 2.
- Li, J., and Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 63, 142–148.
- Li, J., Fu, J., Toumazou, C., Yoon, H.-G., and Wong, J. (2006). A Role of the Amino-Terminal (N) and Carboxyl-Terminal (C) Interaction in Binding of Androgen Receptor to Chromatin. *Mol. Endocrinol.* 20, 776–785.
- Li, X., Huang, Y., Fu, X., Chen, C., Zhang, D., Yan, L., Xie, Y., Mao, Y., and Li, Y. (2011). Meta-analysis of three polymorphisms in the steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 gene (SRD5A2) and risk of prostate cancer. *Mutagenesis* 26, 371–383.

Libertini, S.J., Tepper, C.G., Rodriguez, V., Asmuth, D.M., Kung, H.J., and Mudryj, M. (2007). Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence. *Cancer Res.* 67, 9001–9005.

Linja, M.J., Savinainen, K.J., Saramaki, O.R., Tammela, T.L., Vessella, R.L., and Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 61, 3550–3555.

Liu, L.L., Xie, N., Sun, S., Plymate, S., Mostaghel, E., and Dong, X. (2014). Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene* 33, 3140–3150.

Liu, Y., Majumder, S., McCall, W., Sartor, C.I., Mohler, J.L., Gregory, C.W., Earp, H.S., and Whang, Y.E. (2005). Inhibition of HER-2/neu kinase impairs androgen receptor recruitment to the androgen responsive enhancer. *Cancer Res.* 65, 3404–3409.

Locke, J.A., Guns, E.S., Lubik, A.A., Adomat, H.H., Hendy, S.C., Wood, C.A., Ettinger, S.L., Gleave, M.E., and Nelson, C.C. (2008). Androgen Levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 6407–6415.

Long, J., Robert, G., and Wallerand, H. (2011) Prostate, Margaux Orange.

Long, R., Morrissey, C., Fitzpatrick, J.M., and Watson, R.W.G. (2005). Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin. Sci.* 108, 1–11.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 1–21.

Lowsley O.S. (1915). The prostate gland in old age. *Ann. Surg.* 62, 716-737.

Lu, X., Horner, J.W., Paul, E., Shang, X., Troncoso, P., Deng, P., Jiang, S., Chang, Q., Spring, D.J., Sharma, P., et al. (2017). Effective combinatorial immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *Nature* 543, 728–732.

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

Lupien, M., Eeckhoute, J., Meyer, C.A., Wang, Q., Zhang, Y., Li, W., Carroll, J.S., Liu, X.S., and Brown, M. (2008). FoxA1 Translates Epigenetic Signatures into Enhancer-Driven Lineage-Specific Transcription. *Cell* 132, 958–970.

Mahajan, N.P., Liu, Y., Majumder, S., Warren, M.R., Parker, C.E., Mohler, J.L., Earp, H.S., and Whang, Y.E. (2007). Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8438–8443.

Makridakis, N.M., Ross, R.K., Pike, M.C., Crocitto, L.E., Kolonel, L.N., Pearce, C.L., Henderson, B.E., and Reichardt, J.K.V. (1999). Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 354, 975–978.

Mani, R.S. (2014). The emerging role of speckle-type POZ protein (SPOP) in cancer development. *Drug Discov. Today* 19, 1494–1498.

- Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., et al. (2000). Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* 60, 944–949.
- Marcias, G., Erdmann, E., Lapouge, G., Siebert, C., Lémy, P.B., Duclos, B., Bergerat, J.P., Raline, J.C., and Kurtz, J.E. (2010). Identification of novel truncated Androgen Receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory Prostate Cancer (PCa) cell line. *Hum. Mutat.* 31, 74–80.
- Marieb, E.N. (1999). Le système génital. in *Anatomie et physiologie humaines*, de Boeck, 1038–1116.
- De Marzo, A.M., Meeker, A.K., Zha, S., Luo, J., Nakayama, M., Platz, E.A., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62, 55–62.
- De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 256–269.
- Matei, D.V., Renne, G., Pimentel, M., Sandri, M.T., Zorzino, L., Botteri, E., De Cicco, C., Musi, G., Brescia, A., Mazzoleni, F., et al. (2012). Neuroendocrine differentiation in castration-resistant prostate cancer: A systematic diagnostic attempt. *Clin. Genitourin. Cancer* 10, 164–173.
- Matias, P.M., Donner, P., Coelho, R., Thomaz, M., Peixoto, C., Macedo, S., Otto, N., Joschko, S., Scholz, P., Wegg, A., et al. (2000). Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor: Implications for pathogenic gene mutations. *J. Biol. Chem.* 275, 26164–26171.
- Matsuda, T., Junicho, A., Yamamoto, T., Kishi, H., Korkmaz, K., Saatcioglu, F., Fuse, H., and Muraguchi, A. (2001). Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and androgen receptor signaling in prostate carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 179–187.
- Mc Neal, J.E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am. J. Clin. Pathol.* 49, 347–357.
- Mc Neal, J.E., Redwine, E.A., Freiha, F.S., and Stamey, T.A. (1988). Zonal Distribution of Prostatic Adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 12, 897–906.
- Mc Ewan, 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, 8485–8490.
- Meeker, A.K., Hicks, J.L., Platz, E.A., March, G.E., De Marzo, A.M., and Delannoy, M.J. (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 6405–6409.
- Mehra, N., Seed, G., Lambros, M., Sharp, A., Fontes, M.S., Crespo, M., Sumanasuriya, S., Yuan, W., Boysen, G., Riisnaes, R., et al. (2016). Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients (PTS). *Ann. Oncol.* 27, 2799495.
- Mestayer, C., Blanchère, M., Jaubert, F., Dufour, B., and Mowszowicz, I. (2003). Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines. *Prostate* 56, 192–200.

- Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32, 81–151.
- Di Mitri, D., Toso, A., Chen, J.J., Sarti, M., Pinton, S., Jost, T.R., D'Antuono, R., Montani, E., Garcia-Escudero, R., Guccini, I., et al. (2014). Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature* 515, 134–137.
- Miyamoto, D.T., Zheng, Y., Wittner, B.S., Lee, R.J., Zhu, H., Broderick, K.T., Desai, R., Fox, D.B., Brannigan, B.W., Trautwein, J., et al. (2015). RNA-Seq of single prostate CTCs implicates noncanonical Wnt signaling in antiandrogen resistance. *Science* (80-). 349, 1351–1356.
- Miyoshi, Y., Ishiguro, H., Uemura, H., Fujinami, K., Miyamoto, H., Miyoshi, Y., Kitamura, H., and Kubota, Y. (2003). Expression of AR associated protein 55 (ARA55) and androgen receptor in prostate cancer. *Prostate* 56, 280–286.
- Mohler, J.L., Gregory, C.W., Ford, H., Kim, D., Weaver, C.M., Petrusz, P., Wilson, E.M., and French, F.S. (2004). The Androgen Axis in Recurrent Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 440–448.
- Monge, A., Jagla, M., Lapouge, G., Sasorith, S., Cruchant, M., Wurtz, J.M., Jacqmin, D., Bergerat, J.P., and Céraline, J. (2006). Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 487–497.
- Montgomery, R.B., Mostaghel, E.A., Vessella, R., Hess, D.L., Kalhorn, T.F., Higano, C.S., True, L.D., and Nelson, P.S. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res.* 68, 4447–4454.
- Moore, B.B., Arenberg, D.A., Stoy, K., Morgan, T., Addison, C.L., Morris, S.B., Glass, M., Wilke, C., Xue, Y.Y., Sitterding, S., et al. (1999). Distinct CXC chemokines mediate tumorigenicity of prostate cancer cells. *Am. J. Pathol.* 154, 1503–1512.
- Mootha, V.K., Lindgren, C., Eriksson, K., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., et al. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273.
- Mostaghel, E.A., Marck, B.T., Plymate, S.R., Vessella, R.L., Balk, S., Matsumoto, A.M., Nelson, P.S., and Montgomery, R.B. (2011). Resistance to CYP17A1 inhibition with abiraterone in castration-resistant prostate cancer: Induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin. Cancer Res.* 17, 5913–5925.
- Mundy, G.R. (2002). Metastasis to bone: Causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 2, 584–593.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.
- Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Lou, W., Evans, C.P., and Gao, A.C. (2015). NF- B2/p52:c-Myc:hnRNPA1 Pathway Regulates Expression of Androgen Receptor Splice Variants and Enzalutamide Sensitivity in Prostate Cancer. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1884–1895.
- Nakayama, M., Bennett, C.J., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Platz, E.A., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase- π gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but

not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: A detailed study using laser-capture microdissection. *Am. J. Pathol.* 163, 923–933.

Nalavade, R., Griesche, N., Ryan, D.P., Hildebrand, S., and Krauß, S. (2013). Mechanisms of RNA-induced toxicity in CAG repeat disorders. *Cell Death Dis.* 4, e752-11.

Nelius, T., Filleur, S., Yemelyanov, A., Budunova, I., Shroff, E., Mirochnik, Y., Aurora, A., Veliceasa, D., Xiao, W., Wang, Z., et al. (2007). Androgen receptor targets NFκB and TSP1 to suppress prostate tumor growth in vivo. *Int. J. Cancer* 121, 999–1008.

Nevedomskaya, E., Baumgart, S.J., and Haendler, B. (2018). Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Nouri, M., Ratther, E., Stylianou, N., Nelson, C.C., Hollier, B.G., and Williams, E.D. (2014). Androgen-Targeted Therapy-Induced Epithelial Mesenchymal Plasticity and Neuroendocrine Transdifferentiation in Prostate Cancer: An Opportunity for Intervention. *Front. Oncol.* 4, 1–6.

Novac, N., and Heinzl, T. (2004). Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Curr. Drug Target -Inflammation Allergy* 3, 335–346.

Obinata, D., Takayama, K., Takahashi, S., and Inoue, S. (2017). Crosstalk of the androgen receptor with transcriptional collaborators: Potential therapeutic targets for castration-resistant prostate cancer. *Cancers (Basel)*. 9.

Oliphant, T.E. (2007). Python for scientific computing. *Comput. Sci. Eng.* 9, 10–20.

Packer, J.R., and Maitland, N.J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863, 1238–1260.

Pakkanen, S., Baffoe-Bonnie, A.B., Matikainen, M.P., Koivisto, P.A., Tammela, T.L.J., Deshmukh, S., Ou, L., Bailey-Wilson, J.E., and Schleutker, J. (2007). Segregation analysis of 1,546 prostate cancer families in Finland shows recessive inheritance. *Hum. Genet.* 121, 257–267.

Papadopoulou, N., Charalampopoulos, I., Alevizopoulos, K., Gravanis, A., and Stournaras, C. (2008). Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* 314, 3162–3174.

Papsidero, L.D., Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P., and Chu, T.M. (1980). A Prostate Antigen in Sera of Prostatic-Cancer Patients. *Cancer Res.* 40, 2428–2432.

Parimi, V., Goyal, R., Poropatich, K., and Yang, X.J. (2014). Neuroendocrine differentiation of prostate cancer: a review. *Am. J. Clin. Exp. Urol.* 2, 273–285.

Pereira, R.A., Ravinal, R.C., Costa, R.S., Lima, M.S., Tucci, S., and Muglia, V.F. (2014). Cyclin D1 expression in prostate carcinoma. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47, 515–521.

Perletti, G., Montanari, E., Vral, A., Gazzano, G., Marras, E., Mione, S., and Magri, V. (2010). Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: 'Fertile ground' for prostate cancer development? *Mol. Med. Rep.* 3, 3–12.

Perotti, A., Sessa, C., Mancuso, A., Noberasco, C., Cresta, S., Locatelli, A., Carcangiu, M.L., Passera, K., Braghetti, A., Scaramuzza, D., et al. (2009). Clinical and pharmacological phase I evaluation of Exherin™ (ADH-1), a selective anti-N-cadherin peptide in patients with N-cadherin-expressing solid tumours. *Ann. Oncol.* 20, 741–745.

- Powell, I.J., Vigneau, F.D., Bock, C.H., Ruterbusch, J., and Heilbrun, L.K. (2014). Reducing prostate cancer racial disparity: Evidence for aggressive early prostate cancer PSA testing of African American men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 1505–1511.
- Puhr, M., Hoefer, J., Eigentler, A., Ploner, C., Handle, F., Schaefer, G., Kroon, J., Leo, A., Heidegger, I., Eder, I., et al. (2018). The glucocorticoid receptor is a key player for prostate cancer cell survival and a target for improved antiandrogen therapy. *Clin. Cancer Res.* 24, 927–938.
- Qu, Y., Dai, B., Ye, D., Kong, Y., Chang, K., Jia, Z., Yang, X., Zhang, H., Zhu, Y., and Shi, G. (2015). Constitutively Active AR-V7 Plays an Essential Role in the Development and Progression of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Sci. Rep.* 5, 1–6.
- Ramsay, C.R., Adewuyi, T.E., Gray, J., Hislop, J., Shirley, M.D., Jayakody, S., MacLennan, G., Fraser, C., MacLennan, S., Brazzelli, M., et al. (2015). Ablative therapy for people with localised prostate cancer: A systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 19.
- Del Re, M., Biasco, E., Crucitta, S., Derosa, L., Rofi, E., Orlandini, C., Miccoli, M., Galli, L., Falcone, A., Jenster, G.W., et al. (2017). The Detection of Androgen Receptor Splice Variant 7 in Plasma-derived Exosomal RNA Strongly Predicts Resistance to Hormonal Therapy in Metastatic Prostate Cancer Patients. *Eur. Urol.* 71, 680–687.
- Rebillard, X., and Ruffion, A. (2005). Castration chirurgicale et cancer de la prostate. *Prog. Urol.* 15, 1147–1148.
- Renard-Penna, R., Rouvière, O., Puech, P., Borgogno, C., Abbas, L., Roy, C., Claudon, M., Correas, J.M., Cormier, L., Ploussard, G., et al. (2016). Current practice and access to prostate MR imaging in France. *Diagn. Interv. Imaging* 97, 1125–1129.
- Reubi, J.C., Wenger, S., Schmuckli-Maurer, J., Schaer, J.-C., and Gugger, M. (2002). Bombesin Receptor Subtypes in Human Cancers: Detection with the Universal Radioligand ^{125}I -[D-Tyr⁶,β-ALA¹¹,PHE¹³,NLE¹⁴]Bombesin(6-14). *Clin. Cancer Res.* 8, 1139–1146.
- Rios-Doria, J., Day, K.C., Kuefer, R., Rashid, M.G., Chinnaiyan, A.M., Rubin, M.A., and Day, M.L. (2003). The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 1372–1379.
- Robinson, D., Van Allen, E.M., Wu, Y.M., Schultz, N., Lonigro, R.J., Mosquera, J.M., Montgomery, B., Taplin, M.E., Pritchard, C.C., Attard, G., et al. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215–1228.
- Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-coll, A., Yamanaka, K., and Gleave, M. (2004). Heat Shock Protein 27 Increases after Androgen Ablation and Plays a Cytoprotective Role in Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* 64, 6595–6602.
- Rothbart, S.B., and Strahl, B.D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1839, 627–643.
- Rouprêt, M., and Beley, S. (2008). *Urologie*. Vernazobres-Grego.
- Roviello, G., Pacifico, C., Chiriaco, G., and Generali, D. (2017). Is still there a place for orteronel in management of prostate cancer? Data from a literature based meta-analysis of randomized trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 113, 18–21.

van Royen, M.E., Cunha, S.M., Brink, M.C., Mattern, K.A., Nigg, A.L., Dubbink, H.J., Verschure, P.J., Trapman, J., and Houtsmuller, A.B. (2007). Compartmentalization of androgen receptor protein–protein interactions in living cells. *J. Cell Biol.* 177, 63–72.

Rozet, F., Hennequin, C., Beauval, J.B., Beuzeboc, P., Cormier, L., Fromont, G., Mongiat-Artus, P., Ouzzane, A., Ploussard, G., Azria, D., et al. (2016). Recommandations en oncurologie 2016-2018 du CCAFU : Cancer de la prostate. *Prog. Urol.* 27, 95–144.

Ruska, K.M., Sauvageot, J., and Epstein J.I. (1998). Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am. J. Surg. Pathol.* 22, 1073–1077.

Ryan, C.J., and Cheng, M.L. (2013). Abiraterone acetate for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 14, 91–96.

Ryan, C.J., Smith, M.R., Fizazi, K., Saad, F., Mulders, P.F.A., Sternberg, C.N., Miller, K., Logothetis, C.J., Shore, N.D., Small, E.J., et al. (2015). Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naïve men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): Final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 16, 152–160.

Sadler, T.W. (2010). Urogenital system. in Langman's medical embryology, Lippincott Williams and Wilkins, 321–362.

Sahu, B., Laakso, M., Pihlajamaa, P., Ovaska, K., Sinielnikov, I., Hautaniemi, S., and Jänne, O.A. (2013). FoxA1 specifies unique androgen and glucocorticoid receptor binding events in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 73, 1570–1580.

Sakai, M., Martinez-Arguelles, D.B., Aprikian, A.G., Magliocco, A.M., and Papadopoulos, V. (2016). De novo steroid biosynthesis in human prostate cell lines and biopsies. *Prostate* 76, 575–587.

Salomon, L., Azria, D., Bastide, C., Beuzeboc, P., Cormier, L., Cornud, F., Eiss, D., Eschwège, P., Gaschignard, N., Hennequin, C., et al. (2010). Recommandations en Onco-Urologie 2010 : Cancer de la prostate. *Prog. Urol.* 20, 217–251.

Saporita, A.J., Zhang, Q., Navai, N., Dincer, Z., Hahn, J., Cai, X., and Wang, Z. (2003). Identification and Characterization of a Ligand-regulated Nuclear Export Signal in Androgen Receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 41998–42005.

Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W., Debeljuk, L., and White, W.F. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 393–399.

Scher, H.I., Fizazi, K., Saad, F., Taplin, M.-E., Sternberg, C.N., Miller, K., de Wit, R., Mulders, P., Chi, K.N., Shore, N.D., et al. (2012). Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 367, 1187–1197.

Scher, H.I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J., and Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin. Cancer Res.* 1, 545–550.

Schlomm, T., Kirstein, P., Iwers, L., Daniel, B., Steuber, T., Walz, J., Chun, F.H.K., Haese, A., Kollermann, J., Graefen, M., et al. (2007). Clinical Significance of Epidermal Growth Factor Receptor Protein Overexpression and Gene Copy Number Gains in Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 6579–6584.

Schreyer, E., Barthélémy, P., Cottard, F., Ould Madi-Berthélémy, P., Schaff-wendling, F., Kurtz, J., and Céraline, J. (2017). Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *Med. Sci.* 33, 758-764.

Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L.J., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Määttänen, L., Lilja, H., et al. (2014). Screening and prostate cancer mortality : results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet Oncol.* 384, 2027–2035.

Schwabe, J.W.R., Chapman, L., Finch, J.T. and Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567-578.

Sehgal, I., Powers, S., Huntley, B., Powis, G., Pittelkow, M., and Maihle, N.J. (1994). Neurotensin is an autocrine trophic factor stimulated by androgen withdrawal in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4673–4677.

Seisen, T., Rouprêt, M., Faix, A., and Droupy, S. (2012). La prostate : Une glande au carrefour uro-génital. *Prog. Urol.* 22, S2–S6.

Shaffer, P.L., Jivan, A., Dollins, D.E., Claessens, F., and Gewirth, D.T. (2004). Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4758–4763.

Shafi, A.A., Putluri, V., Arnold, J.M., Tsouko, E., Maity, S., Roberts, J.M., Coarfa, C., Frigo, D.E., Putluri, N., Sreekumar, A., et al. (2015). Differential regulation of metabolic pathways by androgen receptor (AR) and its constitutively active splice variant, AR-V7, in prostate cancer cells. *Oncotarget* 6, 31997–32012.

Shaikhibrahim, Z., Lindstrot, A., Ellinger, J., Rogenhofer, S., Buettner, R., Perner, S., and Wernert, N. (2012). The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: Is the ETS family the key? *Mol. Med. Rep.* 5, 313–316.

Shang, Y., Myers, M., and Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell* 9, 601–610.

Shen, M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 1967–2000.

Sheppard, R.L., Spangenburg, E.E., Chin, E.R., and Roth, S.M. (2011). Androgen receptor polyglutamine repeat length affects receptor activity and C2C12 cell development. *Physiol. Genomics* 43, 1135–1143.

Signoretti, S., Manola, J., Altimari, A., Tam, C., Bublely, G., Balk, S., Thomas, G., Kaplan, I., Hlatky, L., Hahnfeldt, P., et al. (2000). Her-2-neu Expression and Progression Toward Androgen Independence in Human Prostate Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1918–1925.

Smith, J.R., Freije, D., Carpten, J.D., Gronberg, H., Xu, J., Isaacs, S.D., Brownstein, M.J., Bova, G.S., Guo, H., Bujnovszky, P., et al. (1996). Major Susceptibility Locus for Prostate Cancer on Chromosome 1 Suggested by a Genome-Wide Search. *Science* 274, 1371–1374.

Smith, M.R. (2007). Androgen deprivation therapy for prostate cancer: new concepts and concerns. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 14, 247–254.

Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S., and Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N. Engl. J. Med.* 317, 909–916.

Stanbrough, M., Bubley, G.J., Ross, K., Golub, T.R., Rubin, M.A., Penning, T.M., Febbo, P.G., and Balk, S.P. (2006). Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 66, 2815–2825.

van der Steen, T., Tindall, D.J., and Huang, H. (2013). Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14833–14859.

Steinkamp, M.P., O'Mahony, O.A., Brogley, M., Rehman, H., LaPensee, E.W., Dhanasekaran, S., Hofer, M.D., Kuefer, R., Chinnaiyan, A., Rubin, M.A., et al. (2009). Treatment-dependent androgen receptor mutations in prostate cancer exploit multiple mechanisms to evade therapy. *Cancer Res.* 69, 4434–4442.

Stoyanova, T., Cooper, A.R., Drake, J.M., Liu, X., Armstrong, A.J., Pienta, K.J., Zhang, H., Kohn, D.B., Huang, J., Witte, O.N., et al. (2013). Prostate cancer originating in basal cells progresses to adenocarcinoma propagated by luminal-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20111–20116.

Stuchbery, R., McCoy, P.J., Hovens, C.M., and Corcoran, N.M. (2017). Androgen synthesis in prostate cancer: Do all roads lead to Rome? *Nat. Rev. Urol.* 14, 49–58.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550.

Sun, F., Chen, H.G., Li, W., Yang, X., Wang, X., Jiang, R., Guo, Z., Chen, H., Huang, J., Borowsky, A.D., et al. (2014). Androgen receptor splice variant AR3 promotes prostate cancer via modulating expression of autocrine/paracrine factors. *J. Biol. Chem.* 289, 1529–1539.

Taieb, J., and Lachgar, M. (2012). Exploration biologique de la fonction androgénique chez la femme: problèmes liés aux immunodosages des androgènes. *mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 14, 196–203.

Takayama, K., Kaneshiro, K., Tsutsumi, S., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Urano, T., Ijichi, N., Ouchi, Y., Shirahige, K., Aburatani, H., et al. (2007). Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 26, 4453–4463.

Talih, F., Fattal, O., and Malone, D. (2007). Anabolic steroid abuse: Psychiatric and physical costs. *Cleve. Clin. J. Med.* 74, 341–346.

Tamae, D., Mostaghel, E., Montgomery, B., Nelson, P.S., Balk, S.P., Kantoff, P.W., Taplin, M.E., and Penning, T.M. (2015). The DHEA-sulfate depot following P450c17 inhibition supports the case for AKR1C3 inhibition in high risk localized and advanced castration resistant prostate cancer. *Chem. Biol. Interact.* 234, 332–338.

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., et al. (1997). Dehydroepiandrosterone Activates Mutant Androgen Receptors Expressed in the Androgen-Dependent Human Prostate Cancer Xenograft CWR22 and LNCaP Cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 450–459.

Tan, M.E., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., and Yong, E.L. (2015). Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 3–23.

Tanaka, H., Kono, E., Tran, C.P., Miyazaki, H., Yamashiro, J., Shimomura, T., Fazli, L., Wada, R., Huang, J., Vessella, R.L., et al. (2010). Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat. Med.* 16, 1414–1421.

Tangen, C.M., Faulkner, J.R., Crawford, E.D., Thompson, I.M., Hirano, D., Eisenberger, M., and Hussain, M. (2003). Ten-year survival in patients with metastatic prostate cancer. *Clin. Prostate Cancer* 2, 41–45.

Tannock, I., de Wit, R., and Berry, W. (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 1502–1512.

Terry, S., and Beltran, H. (2014). The Many Faces of Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer Progression. *Front. Oncol.* 4, 60.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2015). The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell* 163, 1011–1025.

Tostain, J., Rossi, D., and Martin, P.M. (2004). Physiologie des androgènes chez l'homme adulte. *Prog. Urol.* 14, 639–660.

Traish, A.M., and Morgentaler, A. (2009). Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: A potential molecular switch for tumour growth. *Br. J. Cancer* 101, 1949–1956.

Turcu, A., Smith, J.M., Auchus, R., and Rainey, W.E. (2014). Adrenal androgens and androgen precursors-Definition, synthesis, regulation and physiologic actions. *Compr. Physiol.* 4, 1369–1381.

Valkenburg, K.C., and Pienta, K.J. (2015). Drug discovery in prostate cancer mouse models. *Expert Opin. Drug Discov.* 10, 1011–1024.

Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G.G.J.M., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H.C.J., Trapman, J., Brinkmann, A.O., and Mulder, E. (1990). 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, 534–540.

Verras, M., Lee, J., Xue, H., Li, T.-H., Wang, Y., and Sun, Z. (2007). The Androgen Receptor Negatively Regulates the Expression of c-Met: Implications for a Novel Mechanism of Prostate Cancer Progression. *Cancer Res.* 67, 967–975.

Vlaeminck-Guillem, V., Devonec, M., Champetier, D., Decaussi-Petrucci, M., Paparel, P., Perrin, P., and Ruffion, A. (2015). Test urinaire PCA3 et diagnostic du cancer prostatique : étude à partir de 1015 patients. *Prog. En Urol.* 25, 1160–1168.

Wadosky, K.M., and Koochekpour, S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget* 7.

Wang, Q., Carroll, J.S., and Brown, M. (2005). Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol. Cell* 19, 631–642.

Wang, Z., Wang, Y., Zhang, J., Hu, Q., Zhi, F., Zhang, S., Mao, D., Zhang, Y., and Liang, H. (2017). Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Mol. Med. Rep.* 16, 5450–5458.

Wang, Z.A., Toivanen, R., Bergren, S.K., Chambon, P., and Shen, M.M. (2014). Luminal Cells Are Favored as the Cell of Origin for Prostate Cancer. *Cell Rep.* 8, 1339–1346.

Watson, P.A., Arora, V.K., and Sawyers, C.L. (2015). Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 701–711.

- Welch, H.G., Gorski, D.H., and Albertsen, P.C. (2015). Trends in Metastatic Breast and Prostate Cancer — Lessons in Cancer Dynamics. *N. Engl. J. Med.* 373, 1685–1687.
- Weng, H., Li, S., Huang, J.-Y., He, Z.-Q., Meng, X.-Y., Cao, Y., Fang, C., and Zeng, X.-T. (2017). Androgen receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci. Rep.* 7, 40554.
- Werner, R., Holterhus, P.M., Binder, G., Schwarz, H.P., Morlot, M., Struve, D., Marschke, C., and Hiort, O. (2006). The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 3515–3520.
- Wilson, E.M. (2011). Androgen Action. *Methods Mol. Biol.* 776, 113–129.
- Woenckhaus, J., and Fenic, I. (2008). Proliferative inflammatory atrophy: A background lesion of prostate cancer? *Andrologia* 40, 134–137.
- Wong, Y.C., Wang, X.H., and Ling, M.T. (2003). Prostate development and carcinogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 227, 65–130.
- Wong, Y.N.S., Ferraldeschi, R., Attard, G., and De Bono, J. (2014). Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 365–376.
- Xu, D., Zhan, Y., Qi, Y., Cao, B., Bai, S., Xu, W., Gambhir, S.S., Lee, P., Sartor, O., Flemington, E.K., et al. (2015). Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes. *Cancer Res.* 75, 3663–3671.
- Yamamoto, Y., Lorient, Y., Beraldi, E., Zhang, F., Wyatt, A.W., Nakouzi, N. Al, Mo, F., Zhou, T., Kim, Y., Monia, B.P., et al. (2015). Generation 2.5 antisense oligonucleotides targeting the androgen receptor and its splice variants suppress enzalutamide-resistant prostate cancer cell growth. *Clin. Cancer Res.* 21, 1675–1687.
- Yarbro, J.W., Page, D.L., Fielding, L.P., Partridge, E.E., and P, M.G. (1999). American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference. *Cancer* 86, 2436–2446.
- Ye, T., Krebs, A.R., Choukrallah, M.A., Keime, C., Plewniak, F., Davidson, I., and Tora, L. (2011). seqMINER: An integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res.* 39, 1–10.
- Yemelyanov, A., Bhalla, P., Yang, X., Ugolkov, A., Iwadate, K., Karseladze, A., and Budunova, I. (2012). Differential targeting of androgen and glucocorticoid receptors induces ER stress and apoptosis in prostate cancer cells: A novel therapeutic modality. *Cell Cycle* 11, 395–406.
- Zarif, J.C., and Miranti, C.K. (2016). The importance of non-nuclear AR signaling in prostate cancer progression and therapeutic resistance. *Cell. Signal.* 28, 348–356.
- Zeegers, M.P.A., Jellema, A., and Ostrer, H. (2003). Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma. *Cancer* 97, 1894–1903.
- Zhang, T., Cooper, S., and Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO Rep.* 16, 1467–1481.
- Zhang, Z., Zhou, N., Huang, J., Ho, T.-T., Zhu, Z., Qiu, Z., Zhou, X., Bai, C., Wu, F., Xu, M., et al. (2016). Regulation of androgen receptor splice variant AR3 by PCGEM1. *Oncotarget* 7, 15481–15491.

Zhao, X.Y., Malloy, P.J., Krishnan, A. V., Swami, S., Navone, N.M., Peehl, D.M., and Feldman, D. (2000). Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat. Med.* 6, 703–706.

Zhou, H.-J., Yan, J., Luo, W., Ayala, G., Lin, S.-H., Erdem, H., Ittmann, M., Tsai, S.Y., and Tsai, M.-J. (2005). SRC-3 Is Required for Prostate Cancer Cell Proliferation and Survival. *Cancer Res.* 65, 7976–7983.

Ziouziou, I., Karmouni, T., Khader, K. El, and Koutani, A. (2014). Complications de l'hormonothérapie anti-androgénique du cancer de la prostate. *Can. Urol. Assoc. J.* 8, 159–162.

Zong, Y., and Goldstein, A.S. (2013). Adaptation or selection - Mechanisms of castration-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 10, 90–98.

Communications scientifiques

Publications écrites

Cottard, F., **Ould Madi-Berthélémy, P.**, Erdmann, E., Schaff-Wendling, F., Keime, C., Ye, T., Kurtz, J.-E., and Céraline, J. (2017). Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer. *Oncotarget* 8, 72008–72020.

Schreyer, E., Barthélémy, P., Cottard, F., **Ould Madi-Berthélémy, P.**, Schaff-wendling, F., Kurtz, J., and Céraline, J. (2017). Variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. *Med. Sci.* 33, 758-764.

Ould Madi-Berthélémy, P., Erdmann, E., Schreyer, E., Jung, M., Angel, Z., Kieffer, B. and Céraline, J. (2018). Transcriptional landscapes of constitutively active androgen receptor variants in prostate cancer. *Sci. Rep.* (En cours de soumission)

Schreyer, E., Erdmann, E., Maglott-Roth, A., **Ould Madi-Berthélémy, P.** and Céraline J. (2018). Stroma corruption by androgen receptor variant. *Plos One* (En cours de soumission)

Présentations orales

25^{ème} journée scientifique de l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP), Paris (France), 16 novembre 2016.

Constitutively active androgen receptor variant pathways & involvement in prostate cancer progression. **Pauline Ould Madi-Berthélémy**, Félicie Cottard, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz and Jocelyn Céraline.

25th Annual meeting of the European Cancer Center (EuCC), Fribourg (Allemagne), 18 mai 2018.

Androgen receptor variants and their transcriptional effects. **Pauline Ould Madi-Berthélémy**, Félicie Cottard, Eva Erdmann, Edwige Schreyer, Bruno Kieffer and Jocelyn Céraline.

Androgens 2018 - A society for endocrinology themed scientific meeting, Edimbourg (Royaume-Uni), 3 - 5 septembre 2018.

Transcriptional activities of androgen receptor variants in prostate cancer. **Pauline Ould Madi-Berthélémy**, Félicie Cottard, Mélody Madadi, Zoe Angel, Eva Erdmann, Bruno Kieffer and Jocelyn Céraline.

Caractérisation des fonctions génomiques de variants du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate

Résumé

Le récepteur des androgènes (RA) est la principale cible thérapeutique du cancer de la prostate (CaP) métastatique. Bien que cette thérapie soit initialement efficace, les effets sont transitoires. De nombreux mécanismes peuvent expliquer la progression du CaP vers un stade de résistance à la castration, telles les modifications du RA.

Des données récentes ont montré que les variants constitutifs RA-Q641X et RA-V7, caractérisés par la perte du domaine de liaison au ligand, étaient associés à l'expression de marqueurs mésenchymateux. L'étude de la régulation de la N-cadhérine a mis en évidence que si le RA sauvage et les variants constitutifs se liaient tous deux aux éléments de réponse du gène codant, seuls les derniers étaient associés à une augmentation de l'acétylation de l'histone H4, marque positive de la transcription. Le RNA-seq a révélé que leur expression était aussi corrélée à la régulation de sets de gènes spécifiques incluant des facteurs de transcription dont certains ont déjà été caractérisés en cancérologie.

En ce qui concerne le RA-T576A, porteur d'une mutation faux-sens, les données ont révélé une séquence consensus de liaison à l'ADN moins conservée pour le RA sauvage que pour ce mutant et l'importance du 11^{ème} nucléotide des éléments de réponse. De plus, cette mutation a semblé impacter le transcriptome du RA.

Ce travail met en évidence le comportement distinct des variants du RA et aide à mieux comprendre leurs modes d'action en décrivant leurs activités transcriptionnelles.

Mots clés : Cancer de la prostate, variants du récepteur des androgènes, N-cadhérine, activité transcriptionnelle, liaison à l'ADN

Summary

The androgen receptor (AR) is the main therapeutic target in metastatic prostate cancer (PCa). Although this therapy is initially effective, the effects are transient. Many mechanisms can explain PCa progression toward castration resistance including abnormalities in the AR.

Recent data have shown that constitutive AR (e.g AR-Q641X and AR-V7), which have lost the ligand binding domain, were associated with the induction of mesenchymal marker expression. The study of N-cadherin regulation highlighted that while both constitutive AR and wild type AR bound to response elements located in the encoding gene, only the AR variants were associated with an increase of H4 acetylation, a positive transcription mark. RNA-seq revealed that their expression was also correlated to specific sets of genes regulation, including transcription factors and genes involved in migration, AR regulation, and therapeutic resistance.

Concerning AR-T576A, which hold a missense mutation, data revealed a less conserved consensus sequence for the wild type AR than for this mutant and highlighted the importance of the 11th nucleotide of the response element for AR recruitment to DNA. Plus, this mutation seemed to impair AR transcriptome.

This work highlights the distinct AR variants' behavior and helps to understand their mode of action by depicting their transcriptional landscapes.

Key words : Prostate cancer, androgen receptor variants, N-cadherin, transcriptional landscape, DNA binding