

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

**INSERM U1113 : « Voies du développement et du stress cellulaire dans les cancers digestifs et urologiques »**

**Equipe 3 « Signalisation et Communication dans le Cancer du Rein et de la Prostate »**

**THÈSE** présentée par :

**Félicie COTTARD**

soutenue le : **22 septembre 2015**

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

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Impact des altérations du récepteur des androgènes sur les voies de signalisation liées à la différenciation cellulaire et à la progression du cancer de la prostate**

**THÈSE dirigée par :**

**Mr. Jocelyn CERALINE**

MCU-PH, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme Palma ROCCHI**

**Mr. Laurent MOREL**

CR, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

PR, Laboratoire Génétique, Reproduction et Développement, Clermont Ferrand

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mr. Irwin DAVIDSON**

**Mme Natacha ROCHEL-GUIBERTEAU**

**Mr. Pierre FUMOLEAU**

DR, IGBMC, Strasbourg

DR, IGBMC, Strasbourg

PU-PH, Centre Georges François Leclerc, Dijon

# Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Pr. Laurent Morel, le Dr. Palma Rocchi, le Dr. Irwin Davidson, le Dr. Natacha Rochel-Guiberteau et le Pr. Pierre Fumoleau d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Mes plus grands remerciements se tournent vers le labo, ma deuxième famille. D'abord, un grand merci à Jocelyn et Jean Emmanuel de m'avoir accueillie au laboratoire pour mon Master 2 où j'ai pu découvrir ce monde de la recherche qui me plaît vraiment. Merci de m'avoir préparée au concours de l'école doctorale, de m'avoir soutenue tout le long de ma thèse. Merci de m'avoir permis d'en arriver là.

Jocelyn, un simple merci ne serait pas suffisant tellement nous avons passé du temps ensemble que cela soit dans le bureau à discuter ou à la paillasse à manipuler. Je me souviens de ces longues séries de colorations qu'on a pu faire en master 2 (des timers sonnaient de partout) ou des moments passés dans la salle virus, c'était très agréable de bosser ensemble! Merci de m'avoir permis de participer à tous ces congrès. J'en aurai visité des villes! Un de mes meilleurs souvenirs restera l'après congrès à Londres, mes jambes n'arrivaient plus à suivre, mais c'était tellement bien! Merci de toujours avoir été à l'écoute quand j'avais une idée en tête, quand je voulais débiter un nouveau projet, et surtout merci de m'en avoir donné les moyens. Merci d'avoir toujours été là, à n'importe quel moment, aussi bien au niveau professionnel que personnel. Merci de m'avoir fait découvrir tous ces jolis coins dans les Vosges Alsaciennes ou en Allemagne, c'était vraiment chouette de partager ces moments en dehors du labo. En 5 ans, il s'est passé tellement de choses, si bien que cette relation à la fois professionnel et amical me manquera forcément! J'ai vraiment eu la chance d'avoir un responsable en "or"!

Eva, pour toi, ni le labo, ni les manip n'ont de secrets. Merci de m'avoir formée sur de nombreuses expériences, merci de m'avoir donné tes astuces quand plus "rien" ne fonctionne. Je me souviens encore de la toute première fois où j'ai voulu faire un clonage. Plusieurs semaines sans résultat, tu as pris les choses en main, et comme par magie le plasmide était là.

Edwige, ahh sacré Edwige !! Je ne peux oublier ce jour où tu m'as appelée en catastrophe un matin... Ouf plus de peur que de mal ;-). Je me souviens des bons moments passés au labo, ces fous rires

quand on chantait du Claude François en salle de culture, ou encore la fois tu m'as appris à danser du Michael Jackson pour déstresser.

Ma petite Pauline, ma copine de zumba, j'aurais tellement de choses à dire !! Tout d'abord, je tiens vraiment à te remercier de m'avoir soutenue et supportée dans les moments difficiles. Ta joie, ta bonne humeur au laboratoire vont tellement me manquer! Qui me fera un grand sourire ou un coucou d'un bout à l'autre de la salle de manip ? Merci pour les nombreuses qPCR et Western blots que tu m'as fait pendant que je rédigeais, les résultats sont supers ! Tu es une vraie copine ! Ne t'inquiètes pas, c'est vrai je vais partir en post-doc mais j'aurai bien l'occasion de venir te voir pour une petite soirée mojito !! Et je n'oublie pas que je dois revenir en Alsace pour qu'on puisse être voisine et se partager le terrain, la balançoire et le barbecue ;-)

Marine, tu es mon petit bob le bricoleur! Je casse la planche de porte (comme on dit chez nous), te voilà avec le tournevis pour la réparer. Pendant toutes ces années, tu m'as bluffée par ton organisation, ton calme et ta rapidité en manipant! Et puis, il y a ce côté un peu maniaque où tu prends les pointes de cônes de façon à faire des dessins histoire de te passer le temps pendant les ELISA. Une artiste et une bricoleuse comme toi, c'est sur y'en a pas deux !!!

Un grand merci aux médecins du labo, Philippe, Irène et Fred. Merci Irène pour ta joie de vivre, ton enthousiasme et surtout pour ton sens de l'écoute. C'est avec toi que le projet a commencé et c'est avec toi que j'ai observé mes premières lames d'immunofluorescence sur la N-cadhérine. Bon c'est vrai...cette fois là ça n'avait pas marché... mais c'était le début de ce projet qui me tient vraiment à coeur. Fred, tu es la petite dernière du labo, on s'est tout de suite très bien entendue... en même temps on est un peu pareil on aime bien papoter. N'oublies pas que dans la recherche, il ne faut jamais désespérer et je suis sûr qu'un jour les CTC n'auront plus de secret pour toi. Un grand merci, d'avoir eu le courage de relire toute mon intro pour détecter les petites fautes restantes.

A vous tous, vous êtes bien plus que des simples collègues, vous êtes de véritables amis.

Je n'aurais jamais pu avoir de tels résultats s'il n'y avait pas eu toutes ces personnes de l'IGBMC. Un énorme merci à Igor Martianov pour ses nombreuses astuces pour réussir un ChiP. Je tiens aussi à remercier Frédéric Coin et Nicolas Le May, qui m'ont permis d'utiliser leur sonicateur. Après un an de mise au point, je suis enfin revenue au labo avec de la chromatine fragmentée, c'était un grand

soulagement! Merci à toutes les personnes de la plateforme de séquençage qui me faisaient une petite place sur une paillasse pour que je puisse travailler en attendant que mes échantillons soniquent. Je remercie aussi Céline Keime et Tao Ye pour l'analyse de mes données de RNA-seq et miRNA-seq. Et puis, l'IGBMC c'était aussi la salle lentivirus, j'y aurai passé beaucoup de temps et j'aurai rencontré de nombreuses personnes. Je tiens particulièrement à remercier Pascale Koebel pour toutes ses astuces mais aussi pour ces longues discussions qu'on a pu avoir. Un grand merci à vous tous de m'avoir apporté un peu de votre savoir faire!

Un énorme merci à tous mes amis qu'ils soient Francs' Comtois, Lorrains ou Alsaciens... Toutes ces années d'étude m'ont permis de rencontrer des gens formidables, et c'est grâce à ce genre d'amitié qu'on arrive à se surpasser.

Mention spéciale pour mes amis Francs-Comtois, j'ai vraiment de la chance de vous avoir!! Le Nouvel An, les soirées crêpes, les barbecues, paëllas... Des supers moments avec vous, qui m'ont souvent reboostée !

Alexia, la rando est terminée, j'ai rejoint la voiture!! Pas mal de passages difficiles, mais comme d'habitude, quand on arrive à la fin, c'est un réel plaisir! Et toutes ces marmottes qui m'ont encouragées, ça fait chaud au coeur ! A quand le Mont Blanc maintenant ?

Julie, ma meilleure amie, ma soeur de coeur, comment ne pas te remercier! Tous ces moments qu'on a partagés depuis 24 ans, je pourrais en faire un roman! On est peut être séparée de plus de 200km mais j'ai toujours pu compter sur toi! Je ne peux oublier tout ce que tu as fait pour moi pour que je reste motivée même dans les moments les plus compliqués. Merci pour tout ton soutien pendant la période de rédaction, où pratiquement tous les jours tu me demandais si ça allait comme je voulais. Tu m'as fait beaucoup rire le jour où tu m'as dit «j'y connais rien mais j'ai l'impression que tu avances vraiment bien! ». Pendant 5 ans, "Johannic" m'a surveillée, il te confirmera que j'ai vraiment pas chaumé !

Il n'y a de mots assez forts pour remercier mes parents qui m'ont permis d'en arriver là et qui m'ont toujours soutenue dans mes projets. Toutes ces années à me soutenir financièrement... mais pour vous le plus important, comme vous me le disiez, c'est que je fasse un métier qui me plaît! Alors merci Maman, merci Papa d'avoir fait tout ça pour moi. Maman, tu t'es beaucoup inquiétée pour moi pendant

la rédaction quand je te disais ce qu'il me restait à faire, tu m'as même parfois stressée... mais tu vois ma rédaction de thèse est terminée et je suis en pleine forme! Prête à gravir les plus hauts sommets des Alpes!!!

Mon frère, qu'est ce que ça m'a manqué de te voir si peu pendant cette période de rédaction. Toujours à faire le clown pour me redonner le sourire.

Un grand merci à toute ma famille, mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines, ma petite Kélya. Grâce à vous tous, mes retours en Haute Saône me permettaient de faire le plein de motivation pour débiter une nouvelle semaine. Je suis fière d'avoir une famille comme vous!

Je ne pourrais pas finir mes remerciements sans avoir une pensée pour Mamie Da et Pépère, vous étiez ma force, je me suis battue pour vous et je suis certaine que vous auriez été fiers de moi...

## Table des matières

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Table des illustrations.....</b>                                                   | <b>3</b>  |
| <b>Liste des abréviations.....</b>                                                    | <b>4</b>  |
| <b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>                                              | <b>9</b>  |
| <b>I. Le récepteur des androgènes (RA).....</b>                                       | <b>10</b> |
| 1. Les androgènes.....                                                                | 10        |
| 1.1. La voie de biosynthèse des androgènes.....                                       | 10        |
| 1.2. Transport des androgènes.....                                                    | 11        |
| 1.3. Régulation de la synthèse des androgènes.....                                    | 11        |
| 2. Structure du récepteur des androgènes.....                                         | 12        |
| 2.1. Le domaine N-terminal (NTD).....                                                 | 13        |
| 2.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD).....                                         | 14        |
| 2.3. La région charnière.....                                                         | 15        |
| 2.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD).....                                       | 16        |
| 3. Mode d'action du récepteur des androgènes.....                                     | 18        |
| 3.1. La voie génomique.....                                                           | 18        |
| 3.2. La voie non génomique.....                                                       | 24        |
| 4. Les modifications post-traductionnelles du RA.....                                 | 25        |
| 4.1. La phosphorylation.....                                                          | 25        |
| 4.2. L'acétylation.....                                                               | 26        |
| 4.3. La méthylation.....                                                              | 27        |
| 4.4. L'ubiquitinylation.....                                                          | 27        |
| 4.5. La sumoylation.....                                                              | 27        |
| <b>II. La prostate et le cancer de la prostate.....</b>                               | <b>28</b> |
| 1. La glande prostatique.....                                                         | 28        |
| 1.1. Anatomie et fonction de la prostate.....                                         | 28        |
| 1.2. Histologie de la prostate.....                                                   | 30        |
| 2. Le cancer de la prostate.....                                                      | 37        |
| 2.1. Épidémiologie.....                                                               | 37        |
| 2.2. Les facteurs de risque du cancer de la prostate.....                             | 38        |
| 2.3. Étiologie du cancer de la prostate et base de la cancérogénèse.....              | 44        |
| 2.4. Diagnostic et dépistage du cancer de la prostate.....                            | 47        |
| 2.5. Classification TMN du cancer de la prostate.....                                 | 49        |
| 2.6. Le score de Gleason.....                                                         | 51        |
| 2.7. La classification d'Amico.....                                                   | 52        |
| 2.8. Les traitements du cancer de la prostate.....                                    | 53        |
| <b>III. Les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie.....</b>                     | <b>60</b> |
| 1. Les mécanismes de résistance liés au RA.....                                       | 60        |
| 2. Intercommunication du RA avec d'autres voies de signalisation.....                 | 68        |
| 3. Autres mécanismes de résistance à l'hormonothérapie.....                           | 69        |
| <b>IV. La progression tumorale et transition épithélio-Mésenchymateuse (EMT).....</b> | <b>72</b> |
| 1. Les différents sous-types d'EMT.....                                               | 74        |
| 1.1. L'EMT de type 1.....                                                             | 74        |
| 1.2. L'EMT de type 2.....                                                             | 76        |
| 1.3. L'EMT de type 3.....                                                             | 77        |
| 2. Les voies de signalisation de l'EMT.....                                           | 77        |
| 2.1. La voie de signalisation du TGF- $\beta$ .....                                   | 78        |
| 2.2. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine.....                             | 80        |
| 2.3. Autres voies de signalisation impliquées dans l'EMT.....                         | 80        |
| 3. Profil d'expression associé à l'EMT.....                                           | 81        |
| 3.1. Modifications des protéines de surface lors de l'EMT.....                        | 81        |
| 3.2. Réorganisation du cytosquelette lors de l'EMT.....                               | 85        |
| 3.3. Marqueurs de la matrice extracellulaire induits lors de l'EMT.....               | 86        |

|                                                                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4. Mécanismes de régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux lors de l'EMT.....                                  | 86         |
| 4. EMT et propriétés de cellules souches.....                                                                                 | 90         |
| <b>OBJECTIFS ET PROJET DE THESE .....</b>                                                                                     | <b>92</b>  |
| <b>RESULTATS .....</b>                                                                                                        | <b>94</b>  |
| Article 1.....                                                                                                                | 95         |
| Article 2.....                                                                                                                | 101        |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>                                                                                        | <b>104</b> |
| I. Les variants constitutifs du RA et progression tumorale.....                                                               | 105        |
| II. Mécanismes de régulation des marqueurs de la progression tumorale par les<br>variants constitutivement actifs du RA ..... | 108        |
| III. Différence de mode d'action entre l'AR-FL et les variants constitutivement actifs du<br>RA.....                          | 110        |
| IV. Conclusion générale et retombées cliniques .....                                                                          | 113        |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                                                                                      | <b>115</b> |
| <b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES .....</b>                                                                      | <b>137</b> |
| LISTE DES PUBLICATIONS .....                                                                                                  | 138        |
| LISTE DES COMMUNICATIONS .....                                                                                                | 139        |

## Table des illustrations

|                                                                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes. _____                                                                           | 10  |
| Figure 2: Régulation hormonale de la prostate. _____                                                                                        | 12  |
| Figure 3 : Structure moléculaire du gène codant pour la protéine du récepteur des androgènes. _____                                         | 13  |
| Figure 4: Représentation du DBD du RA _____                                                                                                 | 14  |
| Figure 5: Structure cristallographique du LBD du RA sauvage lié à la DHT. _____                                                             | 17  |
| Figure 6: Modèle représentant les interactions protéine-protéine du RA. _____                                                               | 18  |
| Figure 7 : Voie de signalisation génomique du récepteur des androgènes. _____                                                               | 19  |
| Figure 8 : Régulation de la transcription par le recrutement de coactivateurs et de corépresseurs. _____                                    | 21  |
| Figure 9 : Schéma représentant la structure du RA avec les résidus pouvant être phosphorylés. _____                                         | 25  |
| Figure 10 : Représentation schématique des résidus affectés par les modifications post-traductionnelles du RA. _____                        | 26  |
| Figure 11 : Anatomie de la prostate. _____                                                                                                  | 29  |
| Figure 12: Anatomie zonale de la prostate. _____                                                                                            | 30  |
| Figure 13: Histologie de la prostate. _____                                                                                                 | 31  |
| Figure 14 : Représentation schématique des différents types cellulaires composant l'épithélium et le stroma de la glande prostatique. _____ | 34  |
| Figure 15 : Modèle inductible de traçage du devenir des cellules prostatiques lors du développement post-natal chez la souris. _____        | 35  |
| Figure 16 : Communication entre le compartiment stromal et le compartiment épithélial. _____                                                | 37  |
| Figure 17 : Incidence et mortalité dans le monde du cancer de la prostate en 2012. _____                                                    | 38  |
| Figure 18 : Incidence et mortalité du cancer de la prostate en fonction de l'âge en France en 2005. _____                                   | 39  |
| Figure 19 : Incidence du cancer de la prostate en fonction de l'origine ethnique. _____                                                     | 40  |
| Figure 20 : Localisation chromosomique des principaux gènes de prédisposition au cancer de la prostate. _____                               | 42  |
| Figure 21 : Modèle de cancérogénèse prostatique. _____                                                                                      | 45  |
| Figure 22 : Représentation schématique des différents stades « T » de la classification TMN du cancer de la prostate _____                  | 50  |
| Figure 23: Représentation schématique du grade de Gleason _____                                                                             | 52  |
| Figure 24 : Principes de l'hormonothérapie dans le cancer de la prostate _____                                                              | 56  |
| Figure 25 : Voies de biosynthèse des stéroïdes et cibles thérapeutiques. _____                                                              | 58  |
| Figure 26: Mécanismes de résistance à la castration liés au RA _____                                                                        | 61  |
| Figure 27 : Ensemble des mutations décrites au sein du gène codant pour le RA. _____                                                        | 63  |
| Figure 28: Représentation schématique de l'ARNm et de la protéine du récepteur AR23 _____                                                   | 65  |
| Figure 29 : Exemple de variants constitutivement actifs du RA. _____                                                                        | 66  |
| Figure 30 : La transition Epithélio-Mésenchymateuse _____                                                                                   | 73  |
| Figure 31 : Représentation des 3 sous-types d'EMT _____                                                                                     | 74  |
| Figure 32 : Mise en place des 3 feuilletts embryonnaires lors de la gastrulation. _____                                                     | 75  |
| Figure 33: Ensemble des voies de signalisation activées lors de la gastrulation. _____                                                      | 75  |
| Figure 34: Diversité des voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes de l'EMT. _____                                     | 78  |
| Figure 35: Voies de signalisation du TGF- $\beta$ SMAD-dépendante ou non dépendante. _____                                                  | 79  |
| Figure 36: Représentation des membres de la famille des cadhérines ayant une implication dans le cancer. _____                              | 81  |
| Figure 37: Structure générale des cadhérines classiques _____                                                                               | 82  |
| Figure 38: Principaux régulateurs de l'EMT _____                                                                                            | 87  |
| Figure 39: Principaux miRNA impliqués dans la régulation des facteurs de transcription clés de l'EMT. _____                                 | 89  |
| Figure 40: Boucle d'autorégulation entre les membres de la famille miRNA-200 et les facteurs de transcription ZEB. _____                    | 89  |
| Figure 41 : Expression protéique de la E-cadhérine en présence des variants constitutifs du RA. _____                                       | 97  |
| Figure 42 : Co-localisation de la E-cadhérine et N-cadhérine au niveau membranaire. _____                                                   | 98  |
| Figure 43 : Augmentation de la migration en présence des variants constitutifs du RA. _____                                                 | 99  |
| Figure 44 : Hypothèses de travail concernant la régulation de la N-cadhérine par les variants constitutifs du RA _____                      | 101 |

## Liste des abréviations

**3 $\beta$ -HSD**: 3 $\beta$ -hydroxy steroid deshydrogenase  
**5 $\alpha$ -DHT**: 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone  
**17 $\beta$ -HSD**: 17 $\beta$ -hydroxy steroid deshydrogenase  
 **$\alpha$ -SMA**:  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin  
 **$\alpha$ SGT**: Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein  $\alpha$   
**ABCA1**: ATP-Binding Cassette Transporter A1  
**ACTH**: Adrenocorticotrophique Hormone  
**ADAM10**: A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10  
**ADAM15**: A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 15  
**ADN**: Acide désoxyribonucléique  
**ADRA1B**: Adrenoceptor Alpha 1B  
**AF-1**: Activation function 1  
**AF-2**: Activation function 2  
**AKR1C3**: Aldo-keto reductase family 1, member C3  
**AMACR**:  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase  
**AMP cyclique** : Adénosine Monophosphate cyclique  
**AP-1**: Activator protein 1  
**AR**: Androgen receptor  
**ARA54**: Androgen Receptor-Associated Protein 54  
**ARE**: Androgen Responsive Element  
**AR-FL**: Androgen Receptor Full-Length  
**ARN**: Acide ribonucléique  
**ARR19**: Androgen receptor copressor-19Kda  
**ASF/SF2**: Splicing factor 2 / alternative splicing factor  
**ATP**: Adenosine triphosphate  
**BAD**: BCL2-associated agonist of cell death  
**Bcl2**: B-cell lymphoma 2  
**Bmi1**: B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog  
**BTG1**: B Cell Translocation Gene 1  
**BRCA1**: Breast cancer 1  
**BRCA2**: Breast cancer 2  
**CCR5**: C-C chemokine receptor type five  
**CD24**: Cluster of differentiation 24  
**CD44**: Cluster of differentiation 44  
**CD57**: Cluster of differentiation 57  
**CD117**: Cluster of differentiation 117  
**CD133**: Cluster of differentiation 133  
**cdc42**: Cell Division Cycle 42  
**CDH1**: E-cadhérine  
**CDH2** : N-cadhérine  
**CDH13**: T-cadhérine  
**CDK**: Cycline dependent kinase  
**CDK1**: Cyclin dependent kinase 1  
**CDK6**: Cyclin dependente kinase 6  
**CLDN8**: Claudine 8  
**COX-2**: Cyclooxygenase-2

**CRPC:** Castration Resistant Prostate Cancer  
**CTGF:** Connective Tissue growth factor  
**CXCL13:** C-X-C motif chemokine 13  
**CYP3A4:** Cytochrome P450 3A4  
**CYP11:** 11- hydroxylase  
**CYP17:** 17 $\alpha$ -hydroxylase  
**CYP21:** 21- hydroxylase  
**DAX-1:** Dosage-Sensitive Sex Reversal Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome Gene 1  
**DBD:** DNA binding domain  
**DES:** Diethylstilbestrol  
**DHEA:** Déhydroépiandrosterone  
**DHT:** Dihydrotestostérone  
**E-cadhérine:** Epithelial Cadherin  
**EC domain:** Extracellular cadherin domain  
**EGF:** Epidermal Growth Factor  
**eIF4E:** Eukaryotic translational initiation factor  
**EMT:** Epithelial mesenchymal transition  
**Eomes:** Eomesodermin  
**ERK:** Extracellular signal regulated kinase  
**ETS:** E26 transformation-specific ou E-twenty-six  
**EZH2:** Enhancer of zeste homologue 2  
**FBLN5:** Fibiline 5  
**FGF:** Fibroblast Growth Factor  
**FGFR:** Fibroblast Growth Factor Receptor  
**FKBP5:** FK506-binding protein 5  
**FKHD:** Forkhead domain  
**FOX:** Forkhead box  
**FOXA1:** Forkhead box A1  
**FOXC2:** Forkhead box C2  
**FOXO1:** Forkhead Box O1  
**FSH :** Follicule-stimulating Hormone  
**FSP-1:** Fibroblast-specific protein 1  
**GEF:** Guanine Nucleotide Exchange Factor  
**GR:** Glucocorticoid receptor / récepteur aux glucocorticoids  
**GRIP-1 :** Glucocorticoid receptor-interacting protein 1  
**GSK3 $\beta$ :** Glycogen synthase kinase 3 beta  
**GSTA1:** Glutathione S-transferase A1  
**GSTP1:** Glutathione S-Transferase Pi 1  
**GSTpi:** Glutathione S-transferase-pi  
**HAT:** Histone acétyltransférase  
**HDAC:** Histone désacétylase  
**HER2:** Human Epidermal Growth Factor Receptor 2  
**HER3:** Human Epidermal Growth Factor Receptor 3  
**HGF:** Hepatocyte Growth Factor  
**HIFU:** High intensity frequency ultrasound  
**HOXB13:** Homeobox B13  
**HPC1:** Hereditary Prostate Cancer 1  
**HPC2:** Hereditary Prostate Cancer 2  
**HPC20:** Hereditary Prostate Cancer 20

**HPCX:** Hereditary Prostate Cancer X  
**hRNPA1:** Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1  
**HSD3B1:** 3-bêta-hydroxystéroïde-déshydrogénase type 1  
**HSD3B2:** 3-bêta-hydroxystéroïde-déshydrogénase type 2  
**Hsp27:** Heat shock protein 27  
**Hsp70:** Heat shock protein 70  
**Hsp90:** Heat shock protein 90  
**IGF:** Insulin-like growth factor  
**IGFBP3:** Insulin like-growth factor binding protein 3  
**IL-6:** Interleukine 6  
**IL-6R:** Interleukin 6 Receptor  
**IPA:** Ingenuity pathway analysis  
**JNK:** c-Jun N-terminal kinase  
**KDM4:** Lysine (K)-specific demethylase 4A  
**KLF8:** Kruppel-like factor 8  
**KLK6:** Kallikrein-Related Peptidase 6  
**KLK7:** Kallikrein-Related Peptidase 7  
**LBD:** Ligand binding domain  
**LH:** Luteinizing hormone  
**LH-RH:** Luteinizing hormone-releasing hormone  
**LH-R:** LH receptor  
**LHRH-R:** LH-RH receptor  
**Lin28B:** Lin-28 homolog B  
**LSD1:** Lys-specific demethylase 1  
**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase  
**Mb:** Mégabase  
**MCP-1:** Monocyte chemoattractant protein-1  
**MDM2:** Mouse double minute 2 homolog  
**MDV3100:** Enzalutamide  
**MED1:** Mediator Complex Subunit 1  
**Mesp1:** Mesoderm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1  
**Mesp2:** Mesoderm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 2  
**MET:** Mesenchymal Epithelial transition  
**MMP:** Metalloprotéase  
**MSR1:** Macrophage Scavenger Receptor 1  
**MSX2:** Msh Homeobox 2  
**MUC1:** Mucin 1  
**N-cadhérine:** Neural Cadherin  
**NCoR:** Nuclear Receptor Corepressor  
**NEDD4:** Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4, E3 Ubiquitin Protein Ligase  
**NES:** Nuclear export sequence  
**Net1:** Neuroepithelial Cell Transforming 1  
**NFAT:** Nuclear factor of activated T-cells  
**NF-κB:** Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells  
**NKX3.1:** NK3 homeobox 1  
**NLS:** Nuclear localization sequence  
**NTD:** N-terminal domain  
**p300/CBP:** p300/CREB Binding Protein  
**p/CAF:** p300/CBP associated factor

**PAP:** Phosphatase acid prostatic  
**PcaP:** Predisposing for prostate cancer  
**PDGF:** Platelet-derived growth factor  
**PG1:** Prostate Cancer Suceptibility Gene 1  
**PI3K:** Phosphoinositide 3-kinase  
**PIA:** Proliferative Inflammatory Atrophy  
**PIN:** Prostatic Intraepithelial Neoplasia  
**PKA:** Protein kinase A  
**PKC:** Protein kinase C  
**PMEPA1:** Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1  
**POD-1:** Podocyte-Expressed 1  
**PRC2:** Polycomb 2  
**PSA:** Prostate Specific Antigen  
**PTEN:** Phosphatase and tensin homolog  
**RA:** Récepteur des androgènes  
**Rac1:** Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1  
**RASSF3:** Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 3  
**RB1:** Retinoblastoma 1  
**RB1CC1:** RB1-inducible coiled-coil 1  
**RGD:** Arginine-Glycine-Acide Aspartique  
**RhoA:** Ras Homolog Family Member A  
**RHOB:** Ras Homolog Family Member B  
**Rhox5:** Reproductive homeobox X-linked gene 5  
**RNF6:** Ring finger protein (C3H2C3 type) 6  
**ROCK1:** Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1  
**ROCK2:** Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2  
**RTK:** Récepteur tyrosine kinase  
**SBMA:** Spinal and bulbar muscular atrophy  
**Sca-1:** Stem cell antigen-1  
**SEM:** Standard error of the mean  
**SFRP1:** Secreted frizzled-related protein 1  
**SH3:** src Homology-3  
**SHBG:** Sex hormone-binding globulin  
**SIP1:** Survival of motor neuron protein interacting protein 1  
**SIRT1:** Sirtuin 1  
**SMAD1:** Sma/Mother against decapentaplegic homolog 1  
**SMAD3:** Sma/Mother against decapentaplegic homolog 3  
**SMRT:** Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors  
**Smurf1:** SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1  
**Sox2:** SRY (sex determining region Y)-box 2  
**SOX9:** SRY (sex determining region Y)-box 9  
**SPARKI:** SPecificity-affecting AR KnockIn  
**SRD5A:** Steroid 5 alpha reductase  
**SRDA1:** Steroid 5 $\alpha$ -reductase type I  
**SRC-1:** Steroid receptor co-activator 1  
**SRC-2:** Steroid receptor co-activator 2  
**SRC-3:** Steroid receptor co-activator 3  
**STAT3:** Signal Transducer And Activator Of Transcription 3  
**SUMO:** Small-ubiquitin-like modifier  
**SUV39H1:** Suppressor of variegation 3–9 homologue 1

**SVF:** Sérum de veau foetal  
**SWI/SNF:** SWItch/Sucrose Non-Fermentable  
**TAU-1:** Transcription activation unit 1  
**TAU-5:** Transcription activation unit 5  
**TBP:** TATA-binding protein  
**TCTP:** Translationally controlled tumor protein  
**TFIIB:** Transcription factor II B  
**TFIID:** Transcription factor II D  
**TFIIE:** Transcription factor II E  
**TFIIF:** Transcription factor II F  
**TFIIH:** Transcription factor II H  
**TGF- $\beta$ :** Transforming growth factor beta  
**TGF- $\beta$ R:** Transforming growth factor beta receptor  
**TGM2:** Transglutaminase 2  
**Tip60:** HIV-1 Tat Interactive Protein, 60kDa  
**TMN:** Tumor, Metastasis, Node  
**TMPRSS2:** Transmembrane protease, serine 2  
**TSH:** Thyroid-Stimulating Hormone  
**U2AF65:** U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 2  
**UBE2C:** Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2C  
**UGE:** Urogenital epithelium  
**UGM:** Urogenital mesenchyme  
**WNT:** Wingless-Type MMTV Integration Site Family  
**Wnt11:** Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 11  
**ZEB:** Zinc Finger E-Box Binding Homeobox  
**ZO-1:** Zonula Occludens

# **INTRODUCTION**

## **BIBLIOGRAPHIQUE**

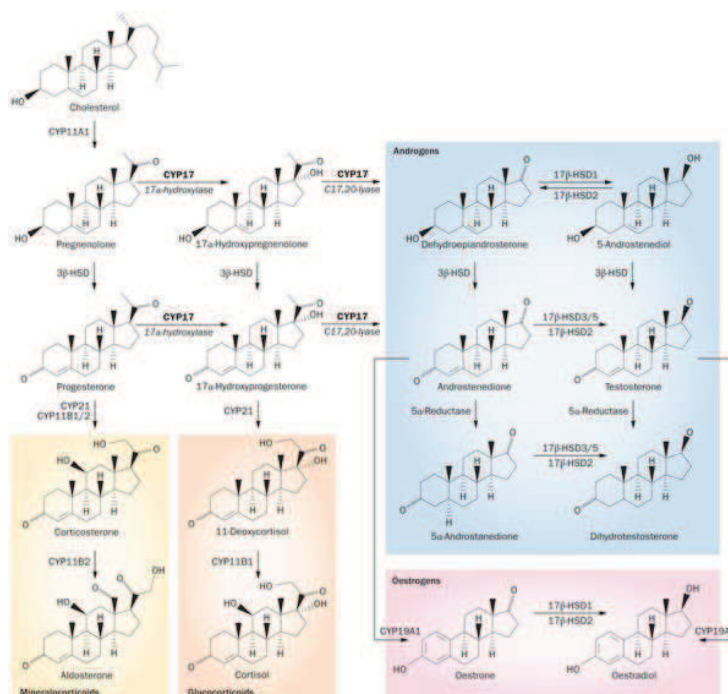
## I. Le récepteur des androgènes (RA)

### 1. Les androgènes

Les androgènes sont des hormones sexuelles mâles qui appartiennent à la famille des hormones stéroïdiennes. Ils sont importants dans le développement et le maintien des caractéristiques masculines des tissus reproducteurs (maintien des caractères sexuels secondaires et maintien de la fertilité) (Handelsman, 2011).

#### 1.1. La voie de biosynthèse des androgènes

Le principal androgène circulant chez les mammifères est la testostérone. La grande majorité de la testostérone est synthétisée dans les testicules par les cellules de Leydig à partir du cholestérol. Elle est également formée en plus faible proportion à partir de l'androstènedione et la déhydroépiandrosterone (DHEA) sécrétées par les glandes surrénales. La biosynthèse de la testostérone fait intervenir une succession de réactions enzymatiques (Figure 1).



**Figure 1 :** Voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes.

Les voies de biosynthèse des stéroïdes sont semblables mais quelques spécificités enzymatiques sont observées en fonction des organes. Par exemple, contrairement aux glandes surrénales, les cellules de Leydig n'expriment pas la 11- et 21- hydroxylase (CYP11 et CYP21) mais expriment la 17α-hydroxylase (CYP17). (Yi and Hu, 2014).

Une grande majorité du cholestérol est produit de *novo* à partir de l'acétyl-CoA mais peut toutefois provenir des stocks intracellulaires ou du cholestérol circulant. La prégnénolone, obtenue par coupure de la chaîne latérale du cholestérol, est d'abord hydroxylée en position 17 par la 17 $\alpha$ -hydroxylase ce qui conduit à la 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone. Cette dernière subit un clivage de sa chaîne latérale aboutissant à la DHEA. Finalement, l'action successive de la 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase) et de la 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase) conduit à la testostérone. Une certaine quantité d'androstènedione peut être formée à partir de la progestérone mais cette voie est cependant plus rare chez l'homme (Ganong, 2005; Handelsman, 2011). La biosynthèse des androgènes surrénaliens conduit à la production de DHEA et d'androstènedione qui seront ensuite converties en testostérone dans les tissus périphériques.

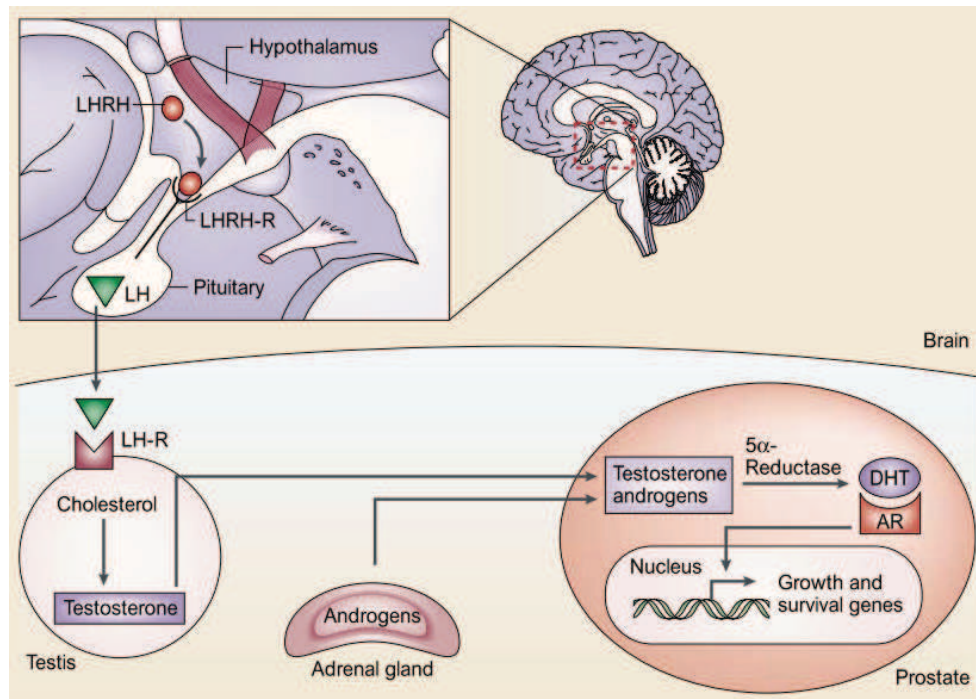
### *1.2. Transport des androgènes*

La testostérone produite par les testicules diffuse librement à travers la membrane plasmique des cellules de Leydig. Une fois dans le plasma, 2% de la testostérone circulent sous forme libre, 65% circulent sous forme liée à une  $\beta$ -globuline appelée globuline liant les stéroïdes gonadiques ou SHBG (sex hormone-binding globulin) et 33% de la testostérone est liée à l'albumine (Ganong, 2005). Les complexes testostérone-SHBG peuvent se lier au niveau de récepteurs cellulaires de surface et activer la protéine kinase A dépendante de l'AMP cyclique. Au contraire, la testostérone libre pénètre dans les cellules cibles par un mécanisme de diffusion passive. Celle-ci est ensuite convertie en un androgène plus puissant, la dihydrotestostérone (DHT) par la 5 $\alpha$ -réductase et active la voie de signalisation du récepteur des androgènes (Brown, 2003).

### *1.3. Régulation de la synthèse des androgènes*

Les androgènes sont les acteurs principaux dans l'homéostasie tissulaire de la prostate. La synthèse des androgènes est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. Sous l'effet des androgènes, l'hypothalamus produit de la LH-RH (Luteinizing hormone-releasing hormone) qui, en interagissant avec ses récepteurs situés au sein de l'hypophyse conduit à la production de la LH (Luteinizing hormone) et de l'ACTH (Adrenocorticotrophique Hormone). La LH stimule, en retour, la production de testostérone à partir du cholestérol par les cellules de Leydig situées dans les testicules. Les testicules produisent 90 % des androgènes, les 10%

restants étant produits par les glandes surrénales sous l'action de l'ACTH (Denmeade and Isaacs, 2002; Wong et al., 2014). Une fois synthétisés, les androgènes quittent les testicules et les glandes surrénales pour rejoindre la glande prostatique par voie sanguine (Figure 2).

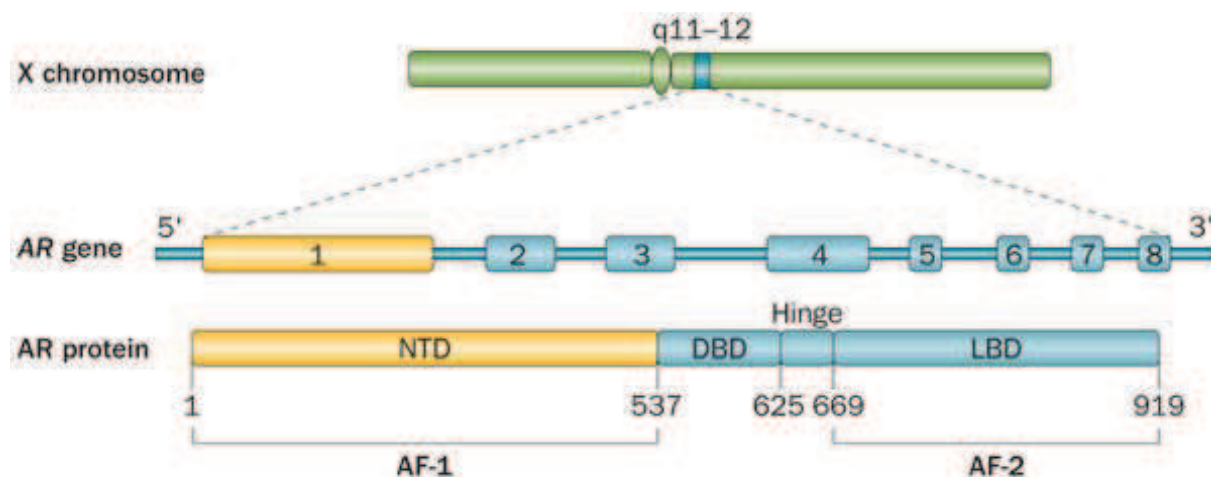


***Figure 2: Régulation hormonale de la prostate.***

Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-testicules et de la régulation hormonale de la prostate par les androgènes testiculaires et surrénaliens. LHRH-R : récepteur de la LH-RH ; LH-R : récepteur de la LH ; AR : récepteur des androgènes (Denmeade and Isaacs, 2002).

## **2. Structure du récepteur des androgènes**

Le récepteur des androgènes est un facteur de transcription dépendant des androgènes qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le gène du récepteur des androgènes est localisé sur le chromosome X en position Xq11-12 et contient 8 exons qui s'étendent sur environ 90kb. Ce gène code pour une protéine de 919 acides aminés constituée de 4 domaines fonctionnels : un domaine N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD), une région charnière et un domaine C-terminal contenant le domaine de liaison du ligand (LBD) (Figure 3) (Koochekpour, 2010).



**Figure 3 : Structure moléculaire du gène codant pour la protéine du récepteur des androgènes.**

NTD: N-terminal domain ; DBD : DNA binding domain ; LBD : Ligand binding domain ; AF-1 : Activation function 1 ; AF-2 : Activation function 2. (Lorente et al., 2015)

### 2.1. Le domaine N-terminal (NTD)

Le domaine N-terminal est codé par l'exon 1 du gène du RA et représente plus de la moitié de la protéine puisqu'il est constitué de 555 acides aminés. Cette région est très importante à la conformation et à l'activité du récepteur (Bennett et al., 2010). Contrairement aux autres domaines du RA qui sont structurés, ce domaine est désordonné. Ainsi, l'absence de structure confère à cette région une certaine flexibilité lui permettant une interaction avec de multiples partenaires (Li and Al-Azzawi, 2009).

La partie N-terminale comporte la première fonction de transactivation (AF-1 : activation function 1) qui englobe deux unités d'activation transcriptionnelle : TAU-1 (acide aminé 100 à 370) et TAU-5 (acide aminé 360 à 528). Ces deux unités sont impliquées dans le recrutement de cofacteurs via leurs motifs LxxLL (où x est un acide aminé quelconque). Par exemple, TAU-1 est le site d'interaction du facteur général de transcription TFIIIF (Transcription factor II F) et TAU-5 lie préférentiellement SRC-1 (Steroid receptor co-activator 1) (Reid et al., 2003). Aussi, ces deux unités peuvent interagir indirectement l'une avec l'autre. En effet, TAU-5 favorise le recrutement du co-activateur SRC-1 alors que TAU-1 atténue cet événement (Callewaert et al., 2006; Claessens et al., 2008).

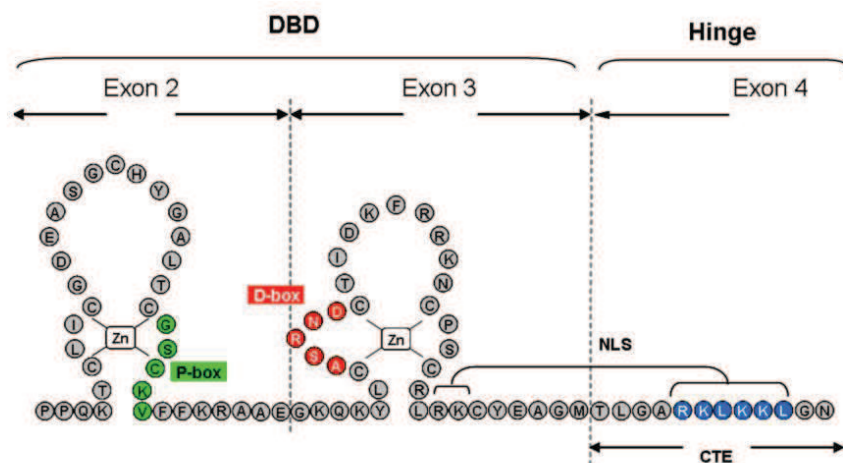
De plus, au niveau du NTD, se trouvent deux motifs amphipatiques  $^{23}\text{FQNLF}^{27}$  et  $^{433}\text{WHTLF}^{437}$  importants pour l'interaction avec les cofacteurs mais également pour l'interaction du NTD avec la partie C-terminale du RA après liaison du ligand (Bennett et al., 2010).

Finalement, des répétitions poly-glutamine (poly-Q ; codon CAG) et poly-glycine (poly-G ; codon GGC) sont présentes au sein du NTD. Des variations du nombre de répétitions CAG affectent l'activité du récepteur avec une corrélation inverse. En effet, de courtes répétitions (< 18-23 CAG) sont associées à un risque élevé de cancer de la prostate. Au contraire, un nombre élevé de répétitions poly-Q (codon CAG > 35) est responsable du syndrome de Kennedy (ou SBMA : Atrophie musculaire spinale et bulbaire), une maladie neuro-dégénérative caractérisée par la formation de filaments amyloïdes. (Bennett et al., 2010; Li and Al-Azzawi, 2009).

## 2.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le DBD est impliqué dans la reconnaissance et la liaison du récepteur à des motifs, appelés élément de réponse aux androgènes (ARE : Androgen Responsive Element), présents dans les promoteurs et régions enhancers des gènes cibles.

Il est organisé en deux doigts de zinc et est constitué de 3 hélices  $\alpha$  et d'une extension carboxy terminale. Chaque doigt de zinc est stabilisé par des liaisons de coordination entre un ion  $Zn^{2+}$  et 4 cystéines. Dans le premier doigt de zinc, se trouve une séquence conservée, la P-Box, qui est impliquée dans la reconnaissance de l'ADN et qui interagit directement avec les nucléotides spécifiques dans le grand sillon de l'ADN. Au niveau du deuxième doigt de zinc, une seconde séquence conservée, la D-box, est importante pour l'homodimérisation du RA (Figure 4) (Bennett et al., 2010; Claessens et al., 2008).



**Figure 4: Représentation du DBD du RA**

Les résidus de la P-Box sont colorés en vert et ceux de la D-Box sont en rouge. Les résidus impliqués dans la séquence de localisation nucléaire (NLS) sont en bleu. L'extension carboxy-terminale est impliquée dans la liaison à l'ADN, le trafic intracellulaire et la transactivation (Claessens et al., 2008).

Le RA se lie en homodimère au niveau de l'ADN à une séquence palindromique arrangée en répétitions inversées et séparée par trois nucléotides dont la séquence consensus est 5'AGAACA<sub>nnn</sub>TGTTCT 3' (Bennett et al., 2010). Cependant, cette séquence consensus qui correspond aux AREs classiques peut être reconnue par d'autres récepteurs nucléaires de la même classe tels que le récepteur aux glucocorticoïdes, à la progestérone ou aux minéralocorticoïdes. Il existe cependant des gènes qui sont régulés sélectivement par le RA. Ainsi, il a été montré que le RA peut également se lier au niveau d'AREs sélectifs organisés en répétitions directes dont la séquence consensus des demi-sites est 5'-TGTTCT-3'. Dans ce cas, les RA sont positionnés en homodimère au niveau de l'ADN en « tête à queue » alors qu'ils sont en « tête à tête » lorsqu'ils lient des répétitions inversées (Claessens et al., 2001; Verrijdt et al., 2003). A l'aide d'un modèle de souris transgéniques appelé SPARKI (SPecificity-affecting AR KnockIn) dont le RA a été modifié de façon à ne plus pouvoir se lier aux AREs sélectifs, il a été possible de définir quels étaient les gènes régulés par les AREs classiques et sélectifs. Ainsi, les AREs classiques contrôlèrent essentiellement l'expression de gènes impliqués dans la masse musculaire et osseuse. Au contraire, les AREs sélectifs interviendront dans la régulation de gènes impliqués dans le développement des organes reproducteurs comme *Rhox5* (Reproductive homeobox X-linked gene 5) (Schauwaers et al., 2007). De plus, l'extension carboxy terminale contribue aussi à la liaison du récepteur aux AREs sélectifs (Verrijdt et al., 2003).

### *2.3. La région charnière*

Cette région est localisée à la jonction entre le DBD et le LBD et s'étend sur approximativement 50 acides aminés. Elle contient une séquence de localisation nucléaire (NLS) bipartite qui se compose de deux clusters d'acides aminés basiques s'étendant de l'extrémité C-terminale du DBD à la partie N-terminale de la région charnière (Figure 4) (Bennett et al., 2010). Le motif <sup>629</sup>RKLKKL<sup>634</sup>, constituant la deuxième partie de la NLS, interagit avec l'importine  $\alpha$  et favorise donc l'import nucléaire du RA. De plus, ce motif, qui fait partie de l'extension carboxy-terminale du DBD, joue un rôle important dans la reconnaissance des AREs sélectifs (Clinckemalie et al., 2012).

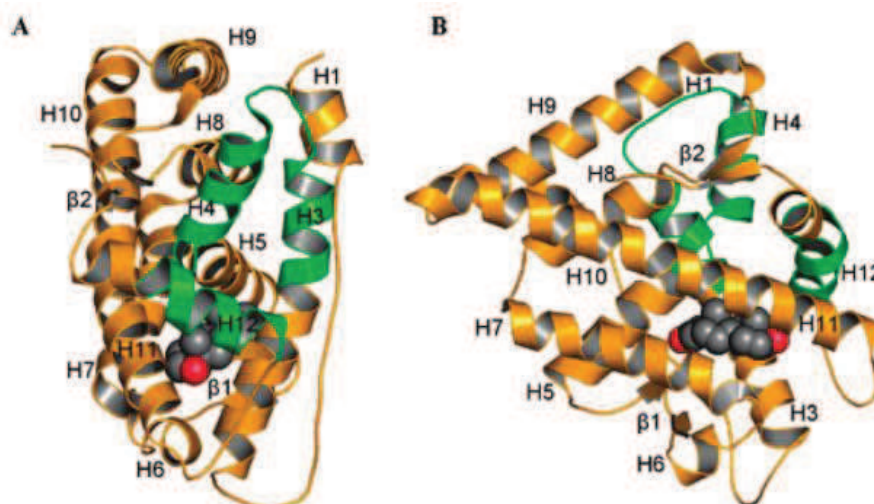
Une séquence PEST putative se trouve au niveau de la zone charnière. Cette séquence généralement enrichie en proline, glutamate, sérine et thréonine fonctionne comme un signal de dégradation lorsqu'elle est démasquée (Claessens et al., 2008; Rechsteiner and Rogers,

1996). Cependant, il a été montré que la délétion de cette région n'affecte ni l'activité, ni l'expression du RA (Haelens et al., 2007).

Pour finir, cette région est le lieu d'interaction avec de nombreuses protéines. Par exemple, en interagissant avec la région charnière, la protéine  $\alpha$ SGT (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat containing protein  $\alpha$ ), forme un complexe avec les protéines Hsp70 et Hsp90 (Heat shock protein 70 ou 90) permettant de maintenir le RA dans le cytoplasme en absence de ligand (Clinckemalie et al., 2012).

#### *2.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD)*

Le LBD est la partie du RA impliquée dans la liaison du ligand tels que la testostérone ou la DHT. Il est organisé en une structure constituée de 11 hélices  $\alpha$  et de 2 feuillet  $\beta$  arrangés en 3 couches pour former un sandwich  $\alpha$ -hélicoïdal antiparallèle. Contrairement aux autres récepteurs nucléaires qui ont 12 hélices  $\alpha$ , l'hélice 2 est absente dans le RA. Les hélices H1 et H3 forment une première face du LBD, les hélices H4 et H5 et le premier feuillet  $\beta$  correspondent à la couche centrale de la structure et les hélices H6, H7, H10 et H11 constituent la seconde face du LBD. La poche de liaison hydrophobe est formée de l'hélice 5, la partie N-terminale de l'hélice 3, la partie C-terminale de l'hélice 10 et l'hélice 11. La liaison du ligand induit un changement de conformation du LBD et un repliement de l'hélice 12 servant de « couvercle ». Ce positionnement permet de stabiliser le ligand dans la poche de liaison. Le second feuillet  $\beta$ , quant à lui, fonctionne comme un « verrou » et stabilise la position de l'hélice 12 (Figure 5) (Gao et al., 2005).



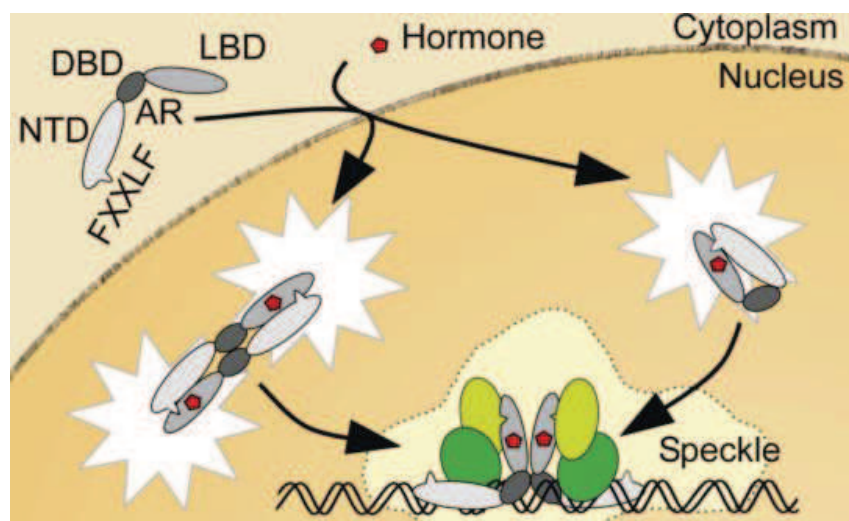
**Figure 5: Structure cristallographique du LBD du RA sauvage lié à la DHT.**

(A) Vue de face. (B). Vue permettant de voir le positionnement du ligand. Représentation des atomes constituant le ligand: en noir, atomes de carbone, et en rouge, atomes d'oxygène. La deuxième fonction de transactivation est formée par les hélices H3, H4 et H12 (en vert) (Gao et al., 2005).

Le ligand est stabilisé dans la poche de liaison par des liaisons hydrophobes et quelques liaisons hydrogènes. Au total, 18 acides aminés sont impliqués dans des interactions directes avec le ligand comme les acides aminés L701, N705, W741 ou T877 (Dehm and Tindall, 2007; Sack et al., 2001). Ainsi, des mutations touchant l'un de ces acides aminés entraînent des modifications de la spécificité de reconnaissance du ligand. Par exemple, la mutation W741L est responsable d'une activation aberrante en réponse au bicalutamide, un anti-androgène. Aussi, la mutation T877A est associée à une activation du RA chez les patients traités au flutamide, un autre anti-androgène (Dehm and Tindall, 2007).

Le changement de conformation du LBD induit par la liaison du ligand permet la formation de la deuxième fonction de transactivation (AF-2), qui sert de plateforme pour le recrutement de cofacteurs. Cependant, contrairement aux autres récepteurs nucléaires, le LBD du RA lie préférentiellement les cofacteurs contenant des motifs FxxFL plutôt que LxxLL. Ainsi, il a été montré qu'après liaison du ligand, AF-2 interagit préférentiellement avec le motif <sup>23</sup>FQNLF<sup>27</sup> présent dans le NTD (interaction N/C). Cette interaction empêche donc la fixation des cofacteurs contenant des motifs FxxLF au niveau de AF-2 (van Royen et al., 2007). L'interaction N/C permet cependant le recrutement du complexe SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), qui en retour entraîne un remodelage de la chromatine, favorisant ainsi la liaison du récepteur au niveau de ses éléments de réponse (Li et al., 2006).

Une fois le RA lié à l'ADN, cette interaction N/C est perdue, permettant alors l'accès aux cofacteurs (Figure 6) (van Royen et al., 2007).



**Figure 6: Modèle représentant les interactions protéine-protéine du RA.**

Après liaison du ligand, la partie C-terminale du RA interagit avec le NTD, puis le RA est transporté dans le noyau. Ces interactions peuvent être inter- ou intramoléculaires. Lorsque le RA lie l'ADN, cette interaction est perturbée rendant cette région accessible aux cofacteurs (colorés en vert) (van Royen et al., 2007).

Toutefois, un second modèle suggère que les interactions N/C seraient indirectes et facilitées par certains cofacteurs. Par exemple, SRC-2 (aussi appelé GRIP-1 (Glucocorticoid receptor-interacting protein 1)) est capable de restaurer l'interaction N/C même lorsque le motif FxxLF du NTD est muté (Centenera et al., 2008).

Le LBD contient également une séquence d'export nucléaire (NES) entre les acides aminés 742 et 817, laquelle est dominante sur la NLS en absence de ligand (Saporita et al., 2003).

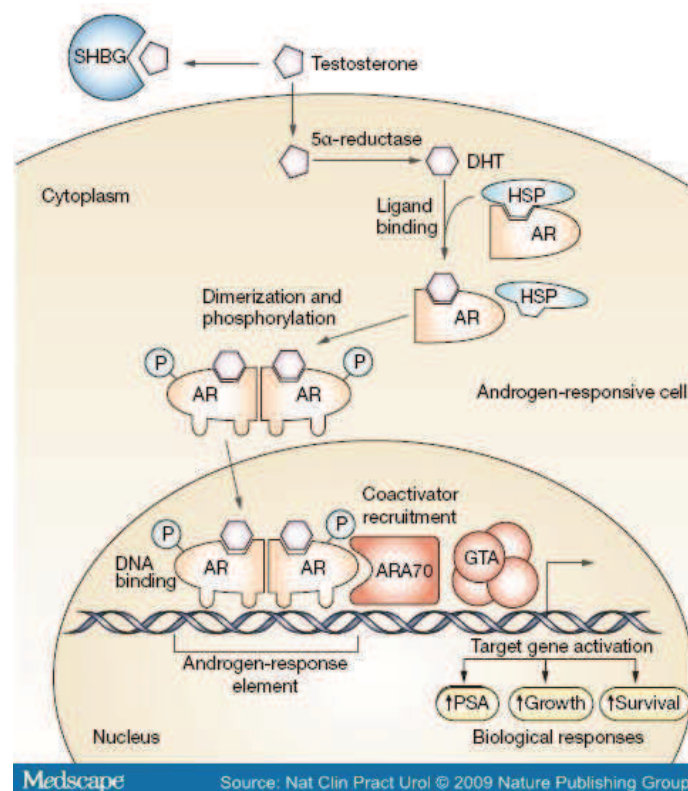
### 3. Mode d'action du récepteur des androgènes

#### 3.1. La voie génomique

##### ➤ Liaison du ligand et reconnaissance de l'ADN

En absence de ligand, le RA est localisé dans le cytoplasme complexé à des protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique HSP70 et HSP90 et à des protéines du cytosquelette. L'ensemble de ces protéines maintient le récepteur dans un état conformationnel favorable à la liaison du ligand. La liaison de la DHT induit un changement

de conformation du LBD, favorisant la dissociation du récepteur de ses protéines chaperonnes et induisant une interaction du LBD avec le NTD. Ensuite, le récepteur s'homodimérise sans doute via le LBD et est phosphorylé au niveau de résidus sérine dont la sérine S81 (Koryakina et al., 2014). De plus, suite à la liaison du ligand, il s'ensuit un démasquage de la NLS, et donc une translocation du récepteur dans le noyau (Bennett et al., 2010; Li and Al-Azzawi, 2009). Une fois dans le noyau, chaque RA se lie à un demi site des AREs présents dans l'ADN et il en découle ensuite, une dimérisation via les D-box présentes dans le 2<sup>ème</sup> de zinc du DBD (Figure 7) (Centenera et al., 2008).



**Figure 7 :** Voie de signalisation génomique du récepteur des androgènes.

Il a été décrit que la fixation aux AREs est facilitée par le facteur de transcription FOXA1 (Forkhead box A1). En effet, FOXA1 est capable d'induire l'ouverture de la chromatine après liaison à une séquence d'ADN consensus, appelée motif FKHD (Forkhead domain) (Bernardo and Keri, 2012; Yang and Yu, 2015; Zhao et al., 2014). La fixation de FOXA1 au niveau de ce motif conduit à un switch épigénétique favorisant le recrutement du RA (Sérandour et al., 2011). Approximativement 71% des motifs de liaison du RA chevauchent des sites de liaison de FOXA1 dans un modèle de cellules cancéreuses prostatiques. De manière intéressante, des expériences de délétion de FOXA1 ont montré une redistribution du RA au niveau de l'ADN et ont permis de définir 3 classes d'AREs. La première classe d'AREs comprend des motifs

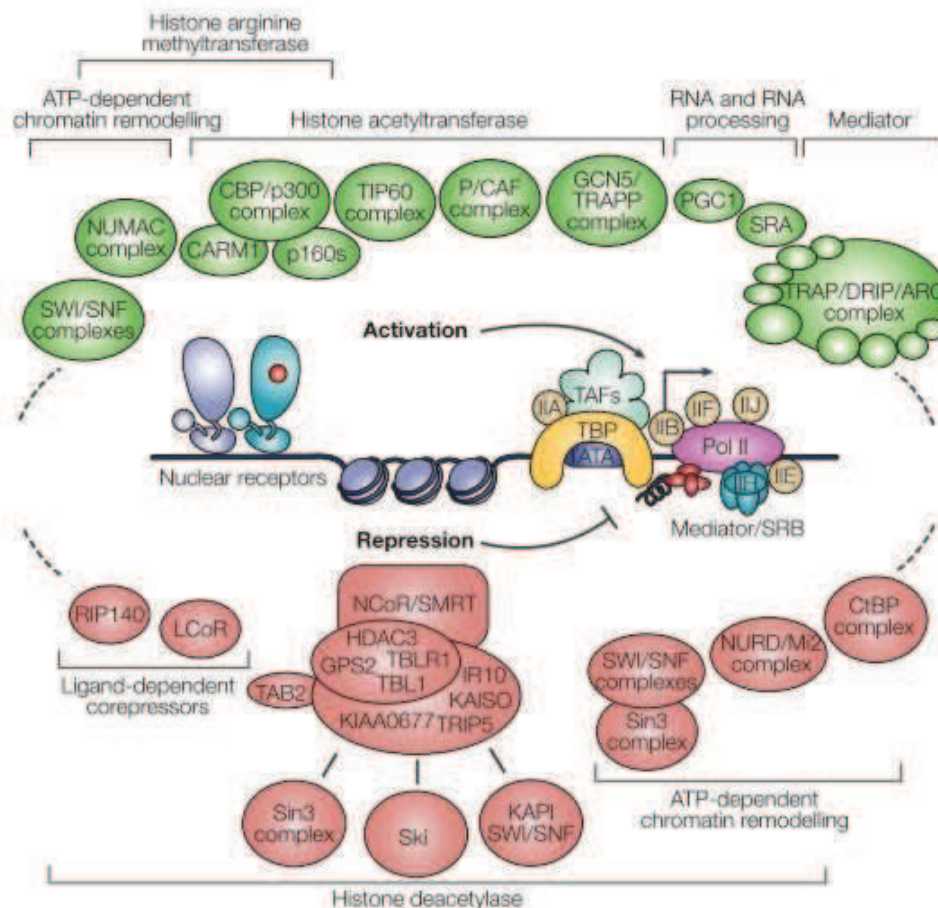
où la fixation du RA ne nécessite pas la présence de FOXA1. En liant ces AREs, le RA régule des gènes impliqués principalement dans la réplication de l'ADN et le métabolisme lipidique. Le PSA est un exemple de gènes régulés par cette classe d'AREs. La deuxième classe correspond aux AREs qui nécessite la présence de FOXA1 pour le recrutement du RA. Dans cette classe, se trouvent des gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN comme RASSF3 (Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 3). Enfin, certains sites sont masqués par FOXA1 et deviennent accessibles pour le RA après la déplétion de FOXA1 ; ces sites constituent une troisième classe d'AREs. Des gènes impliqués dans la croissance cellulaire comme SOX9 (SRX (Sex Determining Region Y)-Box 9) ou IL-6R (Interleukin 6 Receptor) sont regroupés dans cette 3<sup>ème</sup> classe (Jin et al., 2014; Sahu et al., 2011; Wang et al., 2011).

La fixation du RA à ses éléments de réponse conduit soit à une activation de la transcription via le recrutement de coactivateurs ou à une répression de la transcription après recrutement de corépresseurs.

#### ➤ Activation de la transcription et recrutement de coactivateurs

L'activation de la transcription par le RA nécessite le recrutement de coactivateurs et de la machinerie transcriptionnelle. Les coactivateurs du RA sont impliqués dans de nombreux processus dont les principaux interviennent dans le remodelage de la chromatine et dans les modifications du niveau d'acétylation ou de méthylation des histones (Figure 8) (Heemers and Tindall, 2007; Perissi and Rosenfeld, 2005). La liaison du RA au niveau de ses éléments de réponse conduit au recrutement des coactivateurs de la famille p160 comprenant SRC-1, SRC-2 et SRC-3 (Shang et al., 2002; Walsh et al., 2012). Ces coactivateurs interagissent avec le RA au niveau de la partie AF-1 et au niveau de la partie AF-2 (Bevan et al., 1999; Heemers and Tindall, 2007). Ils jouent un rôle important puisqu'ils permettent le recrutement d'autres coactivateurs tels que p300, p300/CBP (CREB Binding Protein) ou encore p/CAF (p300/CBP associated factor), tous possédant une forte activité histone acétyltransférase (HAT) (Heemers and Tindall, 2007; Shang et al., 2002). De plus, SRC-1 interagit directement avec le complexe SWI/SNF, qui intervient dans le remodelage de la chromatine de manière ATP dépendante (Walsh et al., 2012). La formation d'un tel complexe coactivateur conduit au recrutement de la machinerie transcriptionnelle, dont la première

étape consiste à la liaison de la sous-unité TBP (TATA-binding protein) du facteur général de la transcription TFIID au niveau de la boîte TATA. Il s'ensuit le recrutement de TFIIB, de l'ARN polymérase II et de TFIIF. Ce dernier permet l'interaction spécifique de l'ARN polymérase II avec le promoteur. Pour finir, TFIIE et TFIIH sont recrutés au niveau de l'ARN polymérase et favorisent l'initiation de la transcription en séparant les brins d'ADN (Heemers and Tindall, 2007).



**Figure 8 : Régulation de la transcription par le recrutement de coactivateurs et de corépresseurs.**

La régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires, comme le RA, fait intervenir un grand nombre de cofacteurs. Les coactivateurs (en vert) et corépresseurs (en rouge) sont impliqués dans diverses fonctions et associés à des activités enzymatiques. Les complexes médiateurs permettent l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle (Perissi and Rosenfeld, 2005).

#### ➤ Répression de la transcription et recrutement de corépresseurs

Le recrutement de corépresseurs peut au contraire diminuer l'activité transcriptionnelle du RA. Ces corépresseurs peuvent inhiber la translocation nucléaire du RA, affecter l'interaction N/C, entrer en compétition avec certains coactivateurs empêchant ainsi

leur interaction avec le RA ou encore rendre la chromatine inaccessible en recrutant des histones désacétylases (HDAC) (Figure 8) (Wang et al., 2005).

DAX-1 (Dosage-Sensitive Sex Reversal Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome Gene 1), un membre atypique de la famille des récepteurs nucléaires, est un corépresseur qui inhibe la transactivation du RA notamment en séquestrant le RA dans le cytoplasme (Holter et al., 2002).

Il a été montré que HDAC1 lie le RA et inhibe sa transactivation (Gaughan et al., 2002). Aussi, d'autres corépresseurs tels que ARR19 (androgen receptor copressor-19Kda) ou POD-1 (Podocyte-Expressed 1) peuvent inhiber l'activité du RA en recrutant respectivement HDAC4 et HDAC1 (Hong et al., 2005; Jeong et al., 2004).

Par ailleurs, l'interaction du RA avec SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), conduit à une répression de la transcription en recrutant des HDAC, en inhibant l'interaction N/C et en entrant en compétition avec le coactivateur SRC-2 (Liao et al., 2003). De la même manière, NCoR (Nuclear Receptor Corepressor) exerce sa fonction répressive en prévenant l'interaction N/C et la liaison avec des coactivateurs (Wang et al., 2005).

De nombreux cofacteurs interagissent avec le LBD du RA. Ainsi, une perte de cette partie pourrait altérer la régulation transcriptionnelle de certains gènes cibles du RA. En effet, la perte de la partie C-terminale du récepteur des androgènes Q640X (remplacement de la glutamine en position 640 par un codon STOP) est associée à une perte de la capacité du recrutement du coactivateur SRC-2 (Lapouge et al., 2008).

#### ➤ Exemple de gènes régulés par le RA

Le RA induit la transcription de nombreux gènes comme le PSA (Prostate Specific Antigen), NKX3.1 (NK3 homeobox 1) ou TMPRSS2 (transmembrane protease, serine 2).

Le PSA fait partie de la famille des sérines protéases "kallikrein like". Il s'agit d'une glycoprotéine de 33KDa impliquée dans la fluidification du sperme de part sa capacité à dégrader les protéines de hauts poids moléculaires sécrétées par les vésicules séminales. Un mécanisme de régulation de la transcription du gène du PSA a été proposé par Shang et ses collaborateurs en 2002. Ce gène comporte 2 motifs de liaison pour le RA au niveau du promoteur (ARE I et ARE II) et un motif au niveau de la région "enhancer" (ARE III). En réponse à la DHT, le RA lie ces trois motifs et recrute un complexe de transcription unique

composé des coactivateurs p160, CBP et p300 et de l'ARN polymérase II (Shang et al., 2002). Le gène NKX3.1, un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales prostatiques, est induit en réponse aux androgènes et contient deux AREs fonctionnels au niveau de la partie 3'UTR du gène (Jin et al., 2013a; Prescott et al., 1998; Thomas et al., 2010). Aussi, le gène TMPRSS2 est positivement régulé par les androgènes. Ce gène est notamment impliqué dans des fusions avec des gènes de la famille ETS (E26 transformation-specific ou E-twenty-six) souvent retrouvées dans les cancers de la prostate (Tandefelt et al., 2014).

Les gènes réprimés par les androgènes sont à l'heure actuelle beaucoup moins étudiés. Des expériences de castration et de ré-administration d'androgènes chez la souris mâle ont cependant permis de mettre en évidence 65 gènes négativement régulés par les androgènes. Parmi ceux-ci, certains sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération comme la T-cadhérine (CDH13), une cadhérine atypique impliquée dans l'adhésion cellulaire, et IGFBP3 (insulin like-growth factor binding protein 3), lequel séquestre l'IGF (insulin like-growth factor) et inhibe la voie de signalisation associée. Le promoteur des gènes IGFBP3 et CDH13 est hyperméthylé dans des lignées et des échantillons tumoraux de cancers de la prostate respectivement (Wang et al., 2007). Aussi, la stimulation des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP avec l'androgène synthétique R1881 pendant 24h induit l'expression de 319 gènes et inhibe celle de 300 gènes. Une étude d'enrichissement a montré que les gènes induits et inhibés sont quasiment impliqués dans les mêmes fonctions biologiques. Une seconde analyse a identifié la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) comme étant la plus affectée par les androgènes. Cette voie de signalisation agit comme un suppresseur de tumeur dans la prostate saine, alors qu'elle est promotrice de tumeur dans les cancers de la prostate avancés. En particulier, les androgènes sont associés à une inhibition de la voie du TGF- $\beta$  à travers la répression des effecteurs clés en aval comme SMAD1 et SMAD3 (Sma/Mother against decapentaplegic homolog) (Ngan et al., 2009).

Par ailleurs, le RA peut également réguler l'expression de nombreux micro-RNA (Jin et al., 2013a). Les micro-RNA sont des petits ARNs non codants capables de contrôler l'expression de nombreux gènes en s'appariant à la partie 3'UTR des ARNs messagers. Cet appariement conduit alors à la dégradation de l'ARN cible (Wang et al., 2015). Par exemple, miR-19a, miR-27a et miR-133b sont induits après stimulation des cellules LNCaP par les

androgènes et sont directement régulés par le RA. Ces micro-RNA ont pour cibles des ARNs codant pour des protéines impliquées dans l'inhibition de la prolifération tels que ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1), une pompe à efflux du cholestérol, ou RB1CC1 (RB1-inducible coiled-coil 1) qui code pour un facteur de transcription capable d'induire l'expression de RB1 (Retinoblastoma 1), un régulateur négatif du cycle cellulaire. Ainsi, en induisant l'expression de micro-RNA ciblant de tels gènes, le RA favorise la prolifération des cellules LNCaP (Mo et al., 2013). Aussi, le RA active directement la transcription de miR-135a en liant les AREs présents au niveau de la région promotrice. miR-135a conduit à une diminution de l'invasion tumorale en ciblant les ARNs codant pour ROCK1 et ROCK2 (Rho-Associated, Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1 ou 2), deux protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Kroiss et al., 2014).

➤ Interaction du RA avec d'autres facteurs de transcription et modulation de leur activité transcriptionnelle

Le RA peut également moduler l'expression des gènes cibles de certains facteurs de transcription. Par exemple, le RA activé par la DHT est capable d'inhiber la voie de signalisation du TGF- $\beta$  en interagissant avec l'effecteur SMAD3. Cette interaction entre le RA et SMAD3 empêche ce dernier de se lier à ses éléments de réponse et en conséquence, d'induire la transcription de ses gènes cibles. De manière intéressante, le domaine de liaison à l'ADN du RA n'est pas nécessaire pour conduire à cet effet inhibiteur (Chipuk et al., 2002). Le RA peut également interagir avec le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3) via le domaine N-terminal et augmenter son activité transcriptionnelle. De la même manière, STAT3 activé par l'interleukine-6 potentialise l'activité transcriptionnelle du RA, témoignant d'une interconnexion entre ces deux voies de signalisation (Matsuda et al., 2001).

### *3.2. La voie non génomique*

En plus de la voie classique génomique, il semblerait qu'il existe un second mode d'action des androgènes appelé non génomique aboutissant à l'induction rapide de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, il a été décrit que les androgènes sont capables d'induire rapidement une augmentation du taux de calcium intracellulaire conduisant à l'activation de voies de signalisation dépendantes du calcium tels que ERK (extracellular signal regulated kinase), c-Src, PKC (protein kinase C) ou PKA (protein kinase A).

Cependant, le mécanisme par lequel les androgènes conduisent à cette augmentation de calcium n'est pas clairement élucidé. Ces effets non génomiques pourraient être expliqués par la présence d'un RA membranaire ou d'un autre récepteur comme par exemple le récepteur de SHBG liant directement SHBG complexé à la testostérone.

De plus, le RA activé peut être recruté au niveau de la membrane plasmique et interagir avec le domaine SH3 (src Homology-3) de c-Src conduisant en retour à l'activation de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) (Foradori et al., 2008).

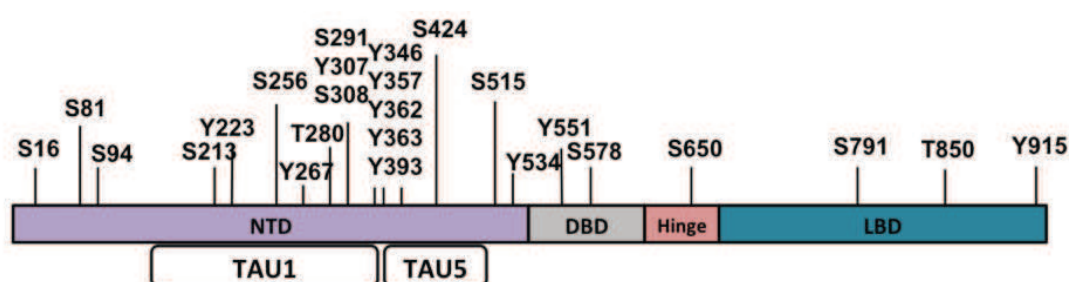
Par ailleurs, toutes ces voies de signalisation peuvent affecter la stabilité et l'activité transcriptionnelle du récepteur (Kaarbø et al., 2007). Il est donc possible que la voie non génomique influence l'activité génomique du RA.

#### 4. Les modifications post-traductionnelles du RA

Le RA est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles capables d'affecter sa stabilité, sa localisation subcellulaire, son interaction avec d'autres protéines ou encore son activité.

##### 4.1. La phosphorylation

Le RA est une phosphoprotéine pouvant être phosphorylée au niveau de résidus sérine, thréonine et tyrosine. La majeure partie de ces résidus sont localisés au niveau de la partie AF-1 (Figure 9) (van der Steen et al., 2013).



**Figure 9 :** Schéma représentant la structure du RA avec les résidus pouvant être phosphorylés.

Y : Tyrosine ; S : Sérine ; T : Thréonine (van der Steen et al., 2013)

De nombreuses protéines ont été décrites à ce jour pour phosphoryler le RA telles que AKT, PKA, PKC, les cyclines dépendantes des kinases (CDK), Src et bien d'autres encore (Koryakina et al., 2014). Certaines phosphorylations sont constitutives telles que la

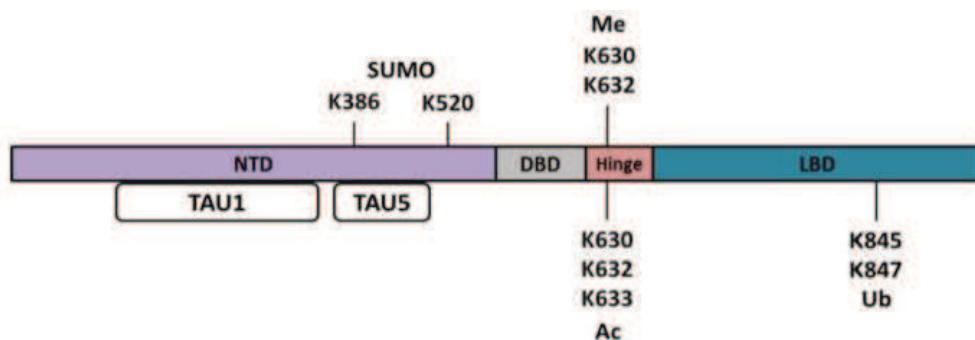
phosphorylation de la sérine 94 alors que d'autres sont induites après liaison du ligand (sérine 16). Dans le cancer de la prostate, il a été observé une surexpression des effecteurs de la phosphorylation, ce qui tend à augmenter l'activité ou la stabilité du RA (Coffey and Robson, 2012; Koryakina et al., 2014; van der Steen et al., 2013).

#### 4.2. L'acétylation

Le RA est acétylé au niveau de 3 résidus lysine K630, K632 et K633 présents au sein du motif KLKK localisé dans la zone charnière (Figure 10). Ces modifications sont effectuées par l'activité acétyltransférase de p300, p/CAF, Tip60 (HIV-1 Tat Interactive Protein, 60kDa) et de la protéine N-acetyltransferase arrest-defect 1. L'acétylation du RA peut être stimulée par les androgènes mais aussi par des neuropeptides comme la bombésine; ces derniers ayant une importance lors de la progression tumorale. L'acétylation du RA est importante à son activité en favorisant le recrutement de coactivateurs et en régulant la liaison aux AREs.

L'acétylation du RA étant un processus dynamique, il a été décrit qu'elle pouvait être éliminée par HDAC1 ou SIRT1 (sirtuin 1). Cette modulation du niveau d'acétylation est très importante pour contrôler l'activité du RA au cours du cycle cellulaire (Coffey and Robson, 2012; van der Steen et al., 2013).

Enfin, comme l'inhibition de l'acétylation du RA est associée à une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, cela pourrait être une bonne cible thérapeutique (Coffey and Robson, 2012).



**Figure 10 :** Représentation schématique des résidus affectés par les modifications post-traductionnelles du RA.

La sumoylation (SUMO) affecte des résidus dans le NTD ; la méthylation (Me) et l'acétylation (Ac) touchent des résidus dans la région charnière ; les sites d'ubiquitinylation (Ub) se trouve dans le LBD (van der Steen et al., 2013).

#### *4.3. La méthylation*

Seuls deux résidus lysine (K630 et K632) sont affectés par la méthylation dans le RA (Figure 10). De plus, à ce jour, la lysine méthyltransférase Set9 est la seule qui ait été décrites comme effectrice de cette modification. L'inhibition de Set9 dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP entraîne une diminution de la liaison du RA au niveau du promoteur du PSA. Par ailleurs, la lysine déméthylase KDM4 (lysine (K)-specific demethylase 4A) pourrait déméthyliser ces deux résidus permettant alors leur acétylation (van der Steen et al., 2013).

#### *4.4. L'ubiquitinylation*

L'ubiquitinylation est un processus enzymatique par lequel une ou plusieurs protéines d'ubiquitine sont attachées sur une lysine. L'ubiquitinylation se décline en 3 étapes : l'activation de l'ubiquitine par l'enzyme E1, la conjugaison de l'ubiquitine sur un résidu cystéine actif de l'enzyme E2 et la ligation de l'ubiquitine sur le résidu lysine de la protéine cible par l'enzyme E3. Il a été décrit que l'ubiquitine ligase E3 Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog) conduit à la poly-ubiquitinylation du RA favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome (Lin et al., 2002). Au contraire, RNF6 (ring finger protein (C3H2C3 type) 6) conduit à la poly-ubiquitinylation du RA au niveau de la lysine K845 notamment, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle du RA par la modulation du recrutement de cofacteurs comme ARA54 (Androgen Receptor-Associated Protein 54) (Xu et al., 2009).

#### *4.5. La sumoylation*

Le RA peut aussi être affecté par la sumoylation, laquelle consiste à l'attachement de protéines SUMO (small-ubiquitin-like modifier) au niveau des résidus lysine K386 et K520 (Poukka et al., 2000). Une récente étude a décrit que la sumoylation affecte l'activité du RA différemment en fonction des gènes (Rytinki et al., 2012; Sutinen et al., 2014). En effet, une sumoylation du RA est nécessaire à l'induction d'un certain nombre de gènes tels que CLDN8 codant pour la claudine 8. Au contraire, la sumoylation du RA peut aussi avoir un effet répresseur sur d'autres gènes comme ADRA1B (adrenoceptor Alpha 1B). Enfin, un troisième panel de gènes contenant FKBP5 (FK506-binding protein 5) n'est pas affecté par le niveau de sumoylation du RA (Sutinen et al., 2014). La sumoylation du RA influence aussi sa stabilité et sa mobilité intra-nucléaire (Rytinki et al., 2012).

En conclusion, l'activation de la voie de signalisation du RA est étroitement régulée par la liaison avec les cofacteurs, les modifications post-traductionnelles ou les interconnexions avec d'autres voies de signalisation. Cette fine régulation nous permet de comprendre comment le RA serait capable d'induire des programmes transcriptionnels distincts en fonction des tissus mais aussi au sein de différentes cellules d'un même organe. Par exemple, comme nous le verrons par la suite, les cellules stromales et épithéliales de la prostate activent un profil transcriptionnel différent en réponse aux androgènes. Cette régulation de l'activité transcriptionnelle est d'autant plus importante que les ARE classiques peuvent être reconnus par d'autres récepteurs nucléaires.

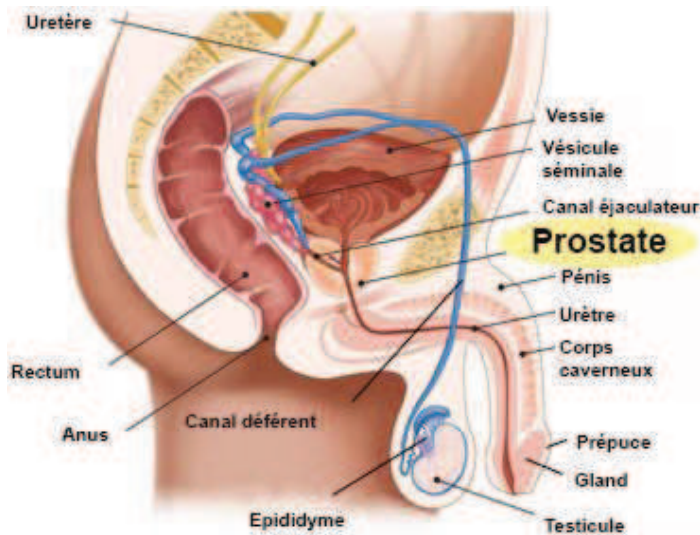
## **II. La prostate et le cancer de la prostate**

### **1. La glande prostatique**

#### *1.1. Anatomie et fonction de la prostate*

La prostate est une glande accessoire associée à l'appareil génital masculin. De consistance ferme et élastique, la prostate saine est approximativement de la taille d'un marron et pèse environ 20g à l'âge adulte. Cependant, sa taille et son poids varient en fonction de l'âge du sujet ; en effet, à la naissance, la prostate ne pèse que quelques grammes et n'est pas plus grosse qu'un pois. Ce n'est qu'à la puberté qu'elle subit une première phase de croissance où elle atteint sa taille « adulte ». A partir de 50 ans, la prostate peut subir une seconde phase de croissance, pouvant entraîner des hyperplasies bénignes de la prostate.

Il s'agit d'une glande fibro-musculaire en forme de pyramide inversée située sous la vessie et en avant du rectum. Elle est traversée par l'urètre prostatique qui s'étend de la base à son apex, pour se transformer dans le diaphragme pelvien en urètre membraneux. Dans la partie postérieure de l'urètre se trouve une excroissance appelée le «*veru montanum*», dans laquelle débouchent les canaux éjaculateurs qui traversent obliquement la prostate. Ces canaux éjaculateurs naissent de l'union entre la vésicule séminale et le canal déférent d'où proviennent les spermatozoïdes (Figure 11) (Delmas et al., 2008; Fourcade, 1997).

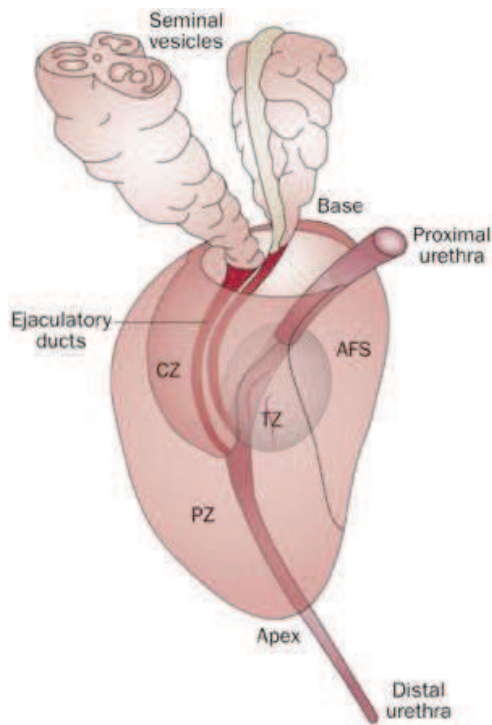


**Figure 11 : Anatomie de la prostate.**  
Localisation de la prostate au sein de l'appareil génital masculin.

Les travaux de John E. Mc Neal dans les années 1980 ont permis de séparer la prostate en 3 zones distinctes (Figure 12):

- La **zone périphérique** représente 70% de la glande prostatique. Cette zone recouvre la partie distale de l'urètre et se prolonge en entonnoir sur la majeure partie des faces latérales et postérieures de la glande. Il s'agit du site privilégié du développement des cancers prostatiques.
- La **zone centrale**, entourant la partie proximale de l'urètre, s'insère dans l'entonnoir de la zone périphérique. Cette zone est traversée par les canaux éjaculateurs et représente 25% de la glande prostatique. Bien que quelques cancers se développent dans cette zone, elle représente le siège privilégié pour les infections prostatiques.
- La **zone de transition** ou **zone transitionnelle** représente 5% du tissu glandulaire et est constituée de 2 petits lobes autour de l'urètre. Dans cette zone, se développent notamment les hyperplasies bénignes de la prostate.

L'ensemble des zones décrites ci-dessus constitue le tissu glandulaire qui représente les deux tiers de la prostate. Le tiers restant est constitué d'un tissu fibro-musculaire dépourvu de glandes qui tapisse la face antérieure de la prostate (Fourcade, 1997; Hammerich et al., 2009; Wheeler et al., 2001).



**Figure 12: Anatomie zonale de la prostate.**

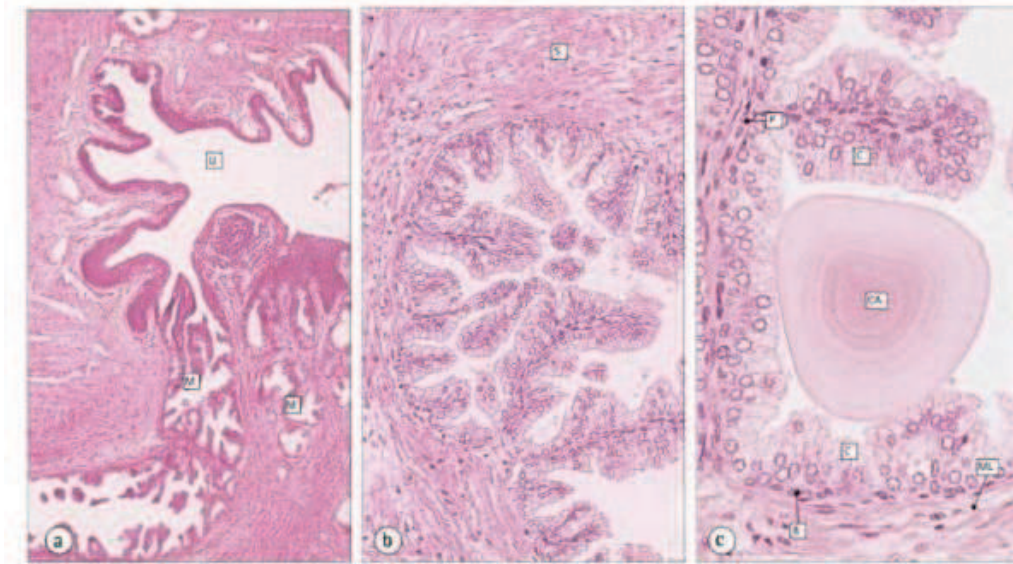
La prostate humaine est séparée en trois zones distinctes : la **zone périphérique (PZ)**, la **zone centrale (CZ)** et la **zone de transition (TZ)**. La face antérieure de la prostate est recouverte par un tissu fibro-musculaire (AFS) (Wadhera, 2013).

La prostate est une glande exocrine qui participe à l'élaboration du sperme, dont la composition est un mélange de spermatozoïdes et de liquide séminale constitué des sécrétions des vésicules séminales et de sécrétions prostatiques. Les cellules prostatiques produisent une sécrétion légèrement acide et un peu laiteuse constituée d'acide citrique, de plasmine séminale, d'enzymes protéolytiques telles que l'antigène spécifique prostatique (PSA), de phosphatase acide prostatique (PAP) et d'ions. Chacun de ces constituants a une fonction bien précise dans la composition du sperme. Par exemple, l'acide citrique assure la survie des spermatozoïdes en permettant la production d'adénosine triphosphate (ATP). Le PSA a pour rôle de fluidifier le sperme avant l'éjaculation et la plasmine séminale agit comme antibiotique afin d'éviter toute infection du tractus urinaire mâle. A ce jour, le rôle de la phosphatase acide reste à déterminer. Ce liquide prostatique ne constitue que 20% du liquide séminal, le reste étant produit par les vésicules séminales. Ces dernières produisent un liquide alcalin riche en fructose et vitamine C, permettant de nourrir les spermatozoïdes (Dadoune et al., 2000; McKinley, 2014; Stevens and Lowe, 1997).

### *1.2. Histologie de la prostate*

La partie glandulaire de la prostate est constituée d'une cinquantaine de glandes tubulo-alvéolaires ramifiées dont les canaux s'ouvrent dans l'urètre prostatique (Ulfig and

Karmann, 2006). Ces glandes sont formées d'un épithélium pseudostratifié reposant sur un tissu de soutien riche en fibrocytes, fibres de collagène et cellules musculaires lisses. Dans la lumière de ces glandes, peuvent se retrouver des petites formations lamellaires de nature glycoprotéique et souvent calcifiées, à l'origine de calculs prostatiques (Figure 13) (Dadoune et al., 2000; Stevens and Lowe, 1997; Wheater et al., 2001).



***Figure 13: Histologie de la prostate.***

a. Glande prostatique muqueuse (M) s'ouvrant directement dans l'urètre prostatique (U). b. Architecture générale d'une glande prostatique reposant sur un tissu de soutien fibro-musculaire (S). c. Détails cytologiques de l'épithélium prostatique composé en partie de cellules cylindriques hautes claires (C) et de quelques cellules basales (B) à noyaux plus sombres. Sur cette photographie est représenté un corps amyloïde (CA) non calcifié formé de lamelles concentriques. (P) projection papillaire ; (ML) cellules musculaires lisses (Stevens and Lowe, 1997) .

#### ➤ L'épithélium prostatique

L'épithélium prostatique de type pseudostratifié est composé de 3 types cellulaires (Figure 14) (Stevens and Lowe, 1997; Wheater et al., 2001) :

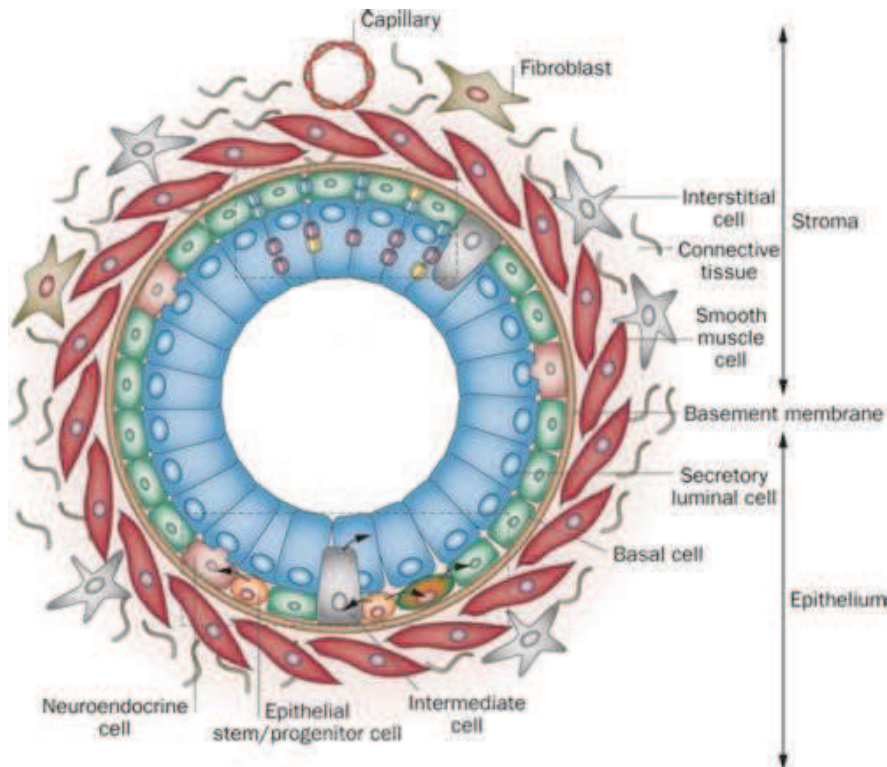
- Les **cellules luminales sécrétoires** sont le type cellulaire le plus représenté de l'épithélium prostatique. Ces cellules, bien différenciées et de forme cylindrique, expriment le RA et sont dépendantes des androgènes pour leur survie. Elles sont à l'origine de l'activité exocrine de la prostate en sécrétant notamment le PSA et la phosphatase acide prostatique. On les distingue des autres cellules de l'épithélium par l'expression des cytokératines 8 et 18 et

du marqueur de surface CD57 (cluster of differentiation 57) (Abate-Shen and Shen, 2000).

- Les **cellules basales**, plus aplaties, restent relativement indifférenciées et sont dépourvues d'activité sécrétoire. Elles constituent une assise cellulaire continue directement en contact avec la membrane basale. Elles expriment très peu le RA et sont, de ce fait, indépendantes des androgènes pour leur survie. Elles sont également caractérisées par l'expression des cytokératines 5 et 14 et du marqueur de surface CD44 (Abate-Shen and Shen, 2000; Long et al., 2005). D'autres marqueurs sont exprimés par ces cellules tels que p63, dont le principal isoforme est  $\Delta Np63\alpha$ , GSTpi (Glutathione S-transferase-pi), permettant de protéger les cellules contre les dommages à l'ADN ou encore la protéine anti-apoptotique Bcl2 (B-cell lymphoma 2) (Long et al., 2005; Signoretti et al., 2000).
- Les **cellules neuroendocrines** représentent une petite population cellulaire dispersée au sein de la couche luminale. L'origine de ces cellules n'est pas encore totalement élucidée. En effet, certaines études suggèrent que ces cellules proviennent des cellules souches prostatiques situées dans la couche basale alors que d'autres sont en faveur d'une origine neuronale (Long et al., 2005). Ces cellules sont différenciées, ne prolifèrent pas et n'expriment pas de récepteur des androgènes d'où leur androgéno-indépendance. Cette population cellulaire est caractérisée par l'expression de marqueurs spécifiques tels que la chromogranine A, la sérotonine, la bombésine, la calcitonine, ou encore la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) (Long et al., 2005)l. Leur fonction dans la glande prostatique n'est pas clairement élucidée mais elles sembleraient jouer un rôle dans la croissance et la différenciation des cellules lumineales par des mécanismes endocrines, paracrines ou exocrines (Bonkhoff, 1998).

Dans les années 90, a été mis en évidence une possible existence de **cellules souches** au sein de la prostate. En effet, des études menées chez le rat mâle ont montré que la déprivation en androgènes autrement appelée castration engendre une mort des cellules

luminales par apoptose tout en laissant intact la couche de cellules basales (Long et al., 2005). De manière intéressante, la réintroduction d'androgènes après une longue période de castration conduit à une restauration complète de la glande prostatique (Collins and Maitland, 2006; Isaacs and Coffey, 1989). Ces observations suggèrent donc qu'il existe, dans la prostate, une population, au sein de la couche de cellules basales, androgéno-indépendante et capable d'auto-renouvellement (Shen and Abate-Shen, 2010). Une forte expression de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  ( $\alpha_2\beta_1^{\text{hi}}$ ) au sein d'une sous-population de cellules basales a été corrélée à des propriétés de cellules souches. En effet, ces cellules ont la capacité de former des colonies et de régénérer *in vivo* un épithélium prostatique totalement différencié (Collins et al., 2001). De plus, un enrichissement des cellules souches à partir de la sous-population des cellules  $\alpha_2\beta_1^{\text{hi}}$  a été rapporté avec le marqueur CD133 (Collins and Maitland, 2006; Richardson et al., 2004; Rizzo et al., 2005). Aussi, un isolement de cellules souches prostatiques à partir de la population basale a été décrit à l'aide des marqueurs de surface Sca-1 (Stem cell antigen-1) et Trop-2 (Burger et al., 2005; Goldstein et al., 2008; Lawson and Witte, 2007; Xin et al., 2005). Plus récemment, dans la prostate de souris adulte, une population de cellules multipotentes et ayant des propriétés d'auto renouvellement importantes a été définie par le phénotype Lin-Sca-1+ CD133+ CD44+ CD117+. De manière très intéressante, lorsqu'une seule cellule ayant ce phénotype est greffée chez la souris *nude* en combinaison avec des cellules stromales du sinus urogénital, il est possible de générer une prostate (Leong et al., 2008).

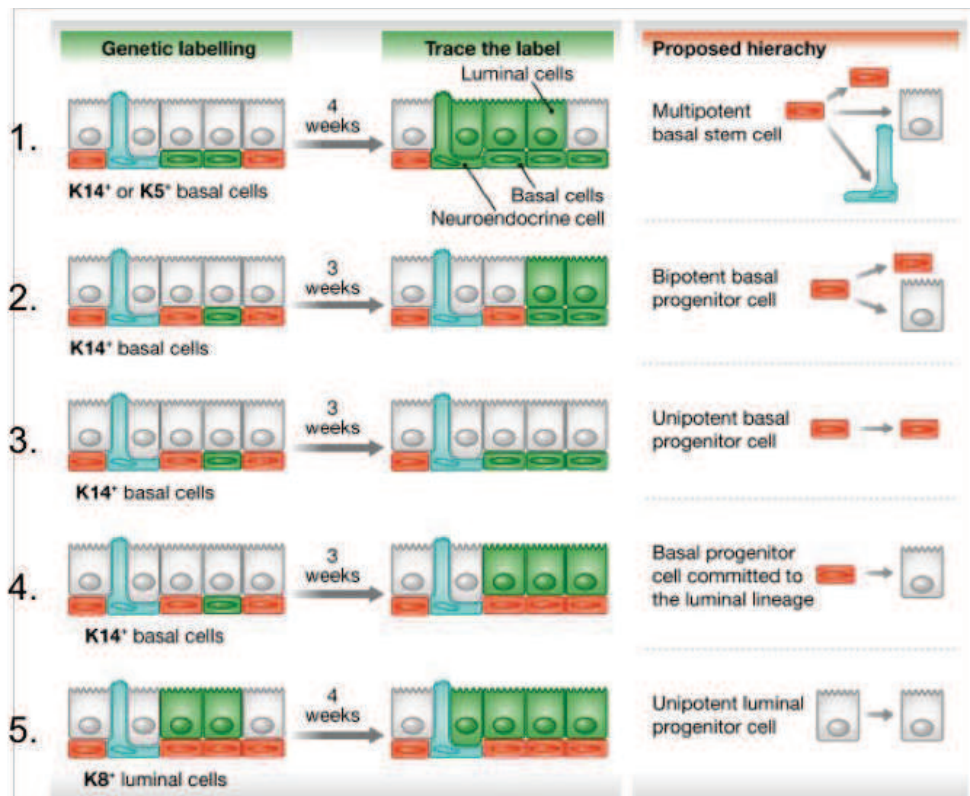


**Figure 14 : Représentation schématique des différents types cellulaires composant l'épithélium et le stroma de la glande prostatique.**

Modifié d'après Czyz et al., 2012 (Czyz et al., 2012).

Enfin, au sein de l'épithélium prostatique, quelques cellules, appelées **cellules intermédiaires**, expriment à la fois des marqueurs de cellules basales et de cellules épithéliales (Verhagen et al., 1988). Des analyses du profil d'expression des cytokératines par immunohistochimie ont permis de mettre en évidence deux types de cellules intermédiaires : une population de cellules exprimant les cytokératines 5, 14 et 18 et une seconde population positive pour les cytokératines 5 et 18 (van Leenders et al., 2000; Xue et al., 1998). Ces cellules pourraient être en cours de différenciation et migrer du compartiment basal au compartiment luminal. Ces données suggèrent que les cellules luminales au cours de leur différenciation perdraient d'abord la cytokératine 14, puis la cytokératine 5 (Long et al., 2005).

Bien que les données précédentes soient en faveur d'un progéniteur basal multipotent capable de se différencier en cellules basales et cellules luminales, l'origine des différentes cellules présentes au sein de la prostate semble bien plus complexe. En effet, à partir d'un modèle inductible permettant de tracer le devenir des cellules prostatiques lors du développement post-natal, il a été mis en évidence l'existence de progéniteurs basaux unipotents, bipotents et multipotents, et de progéniteurs luminaux unipotents (Figure 15) (Goldstein and Witte, 2012; Ousset et al., 2012).



**Figure 15 :** *Modèle inductible de traçage du devenir des cellules prostatiques lors du développement post-natal chez la souris.*

Le marquage des cellules basales K14+ ou K5+ a permis de mettre en évidence l'existence d'un progéniteur basal multipotent se différenciant en cellules basales, luminales et neuroendocrines (1). Le suivi de cellules basales isolées a permis d'identifier des progéniteurs basaux bipotents se différenciant en cellules basales et luminales (2) et des progéniteurs unipotents basaux qui conduisent à des cellules basales (3) ou au lignage épithélial (4). Enfin, le marquage des cellules épithéliales K8+ a mis en évidence l'existence de progéniteurs luminaux (5). Modifié d'après Goldstein et al., 2012. (Goldstein and Witte, 2012).

#### ➤ Le stroma prostatique

Le stroma prostatique est composé d'une matrice extracellulaire riche en fibres de collagène dans laquelle se trouvent divers types cellulaires tels que des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des cellules nerveuses, des cellules ganglionnaires et des cellules endothéliales. Aussi, on y retrouve des infiltrations de macrophages et lymphocytes.

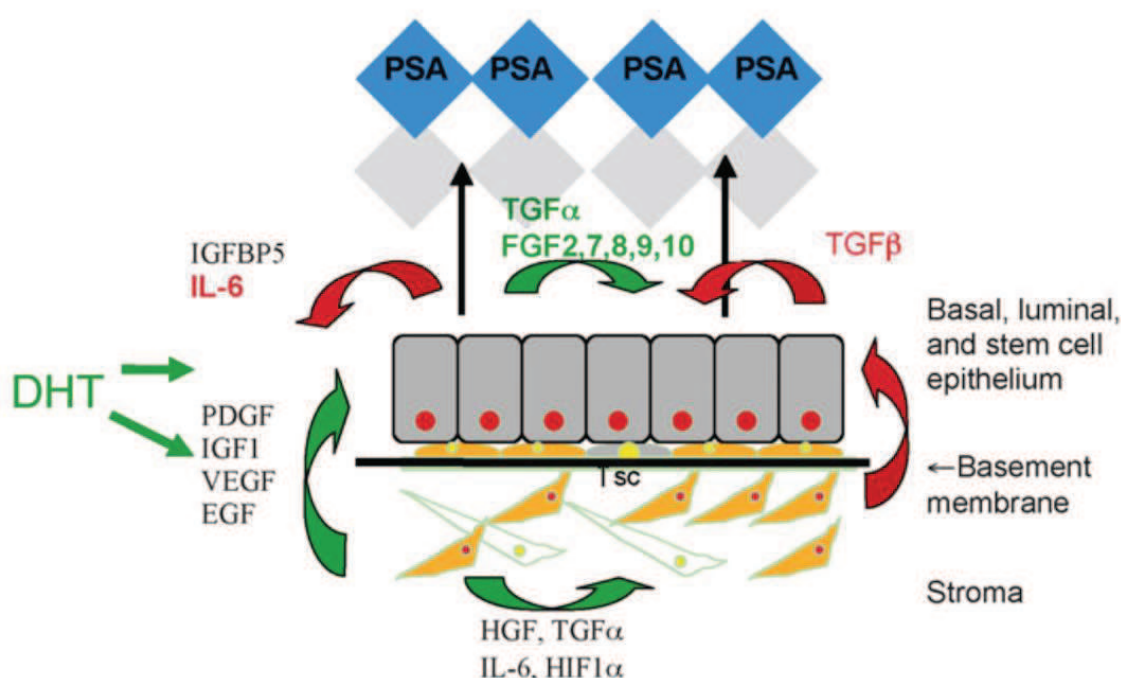
#### ➤ Interactions stroma-épithélium

Les communications entre le stroma et l'épithélium sont très importantes de la morphogénèse prostatique au maintien de l'homéostasie prostatique (Cunha et al., 2004a).

Au cours du développement embryonnaire, la prostate dérive du sinus urogénital embryonnaire, sous l'influence des androgènes. Ce processus nécessite des interactions étroites entre l'épithélium du sinus urogénital (UGE) et le mésenchyme du sinus urogénital (UGM). Des études de recombinaisons tissulaires ont mis en évidence un rôle critique du RA exprimé par les cellules mésenchymateuses de l'UGM dans la différenciation de l'UGE en épithélium prostatique. En retour, les cellules épithéliales prostatiques induisent la différenciation de l'UGM en muscle lisse (Cunha et al., 2004a, 2004b; Hägglöf and Bergh, 2012).

Dans la prostate adulte, la survie et la prolifération des cellules luminales prostatiques sont dépendantes de la production de facteurs de croissance par les cellules stromales. En effet, la 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone (5 $\alpha$ -DHT) produite par les cellules basales à partir de la testostérone diffuse dans le compartiment stromal et active le RA des cellules musculaires lisses. En retour, l'activation de la voie de signalisation des androgènes dans ces cellules aboutit à la production de facteurs de survie et de facteurs de croissance appelés andromédines. Ces andromédines diffusent vers le compartiment épithélial et exercent leur action en liant leurs récepteurs situés à la surface des cellules luminales, activant ainsi des voies de signalisation liées à la survie et la prolifération (Figure 16) (Litvinov et al., 2003). Les andromédines incluent des facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'IGF, l'EGF (Epidermal Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) ou encore le TGF (Hägglöf and Bergh, 2012). Ces différentes molécules peuvent agir comme stimuli inducteurs ou inhibiteurs (Berry et al., 2008). Par exemple, le facteur de croissance FGF-10, produit par les cellules stromales, lie les récepteurs FGFR1IIIb (Fibroblast Growth Factor Receptor 1 IIIb) et FGFR2IIIb au niveau des cellules luminales prostatiques pour induire leur prolifération (Lu et al., 1999). Au contraire, le TGF- $\beta$  agit comme un inhibiteur de la prolifération des cellules épithéliales prostatiques et induit leur apoptose (Hsing et al., 1996; Tanji et al., 2001).

En condition physiologique, le RA présent dans les cellules luminales prostatiques régule uniquement l'expression des marqueurs spécifiques tels que le PSA ou la PAP (Litvinov et al., 2003).



**Figure 16 : Communication entre le compartiment stromal et le compartiment épithélial.**

Les cellules musculaires lisses du stroma sécrètent de nombreux facteurs de croissance importants pour la maintenance de la prostate. Ces facteurs peuvent avoir un effet inhibiteur (ici, en rouge) ou stimulateur (en vert) sur l'épithélium prostatique (Berry et al., 2008).

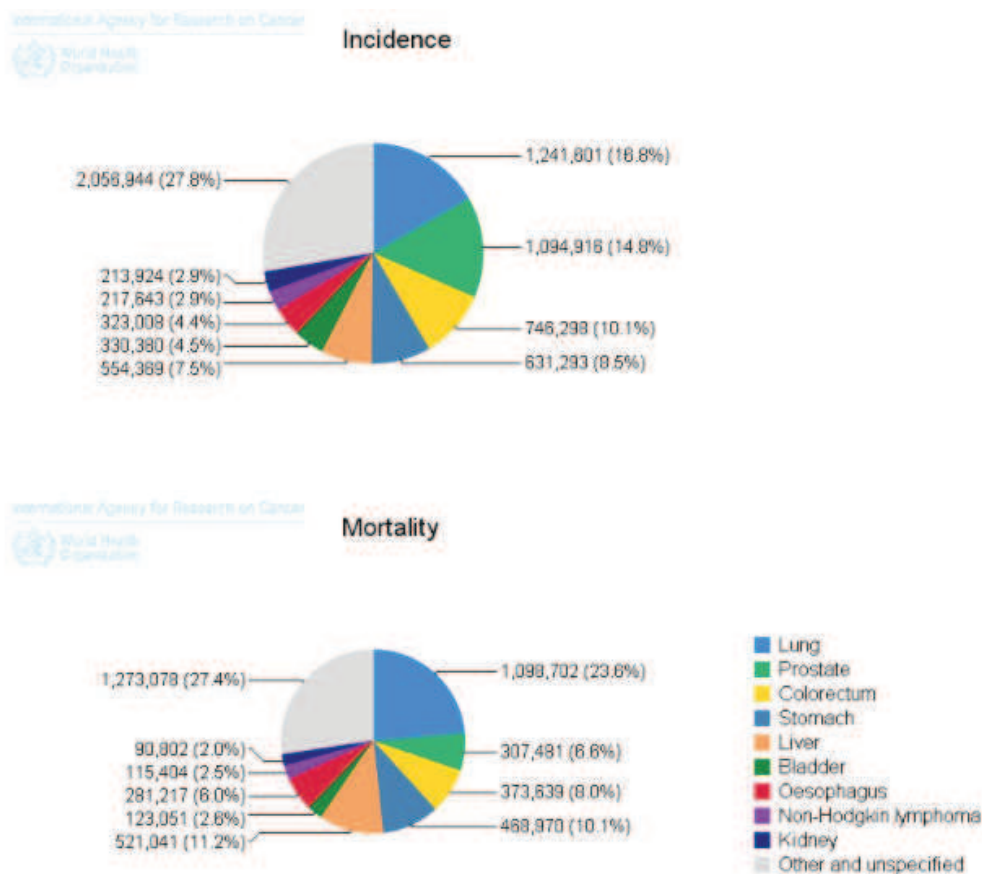
Lors de la carcinogénèse prostatique, cette régulation étroite de l'homéostasie tissulaire est dérégulée. En effet, l'épithélium prostatique pourrait ne plus être capable d'envoyer des stimuli appropriés aux cellules musculaires lisses du stroma, entraînant ainsi leur dédifférenciation en un phénotype plus fibroblastique. En conséquence, les cellules musculaires lisses, en se dédifférenciant, ne seraient plus capables de contrôler la croissance de l'épithélium prostatique (Cunha et al., 2004b). Aussi, durant le processus de tumorigénèse, le RA exprimé par les cellules épithéliales prostatiques est capable d'activer les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et survie. Ainsi, la régulation paracrine de la croissance épithéliale en condition physiologique est délaissée lors de la carcinogénèse prostatique au profit d'une régulation autocrine (Gao et al., 2001).

## 2. Le cancer de la prostate

### 2.1. Epidémiologie

Le cancer de la prostate est aujourd'hui un véritable problème de santé publique. En effet, dans le monde, en 2012, environ 1,1 millions de nouveaux cas de cancer de la prostate

ont été recensés, ce qui le place au deuxième rang juste derrière celui des poumons. En raison de l'utilisation plus large du dosage du PSA et du développement de biopsies prostatiques échoguidées, l'incidence du cancer de la prostate est en constante augmentation (Villers and Grosclaude, 2008). En terme de mortalité, avec 307 000 décès, le cancer de la prostate est le 5<sup>ème</sup> cancer le plus mortel chez l'homme dans le monde en 2012 (Figure 17) (<http://globocan.iarc.fr/>) (Ferlay et al., 2015).



**Figure 17 : Incidence et mortalité dans le monde du cancer de la prostate en 2012.**

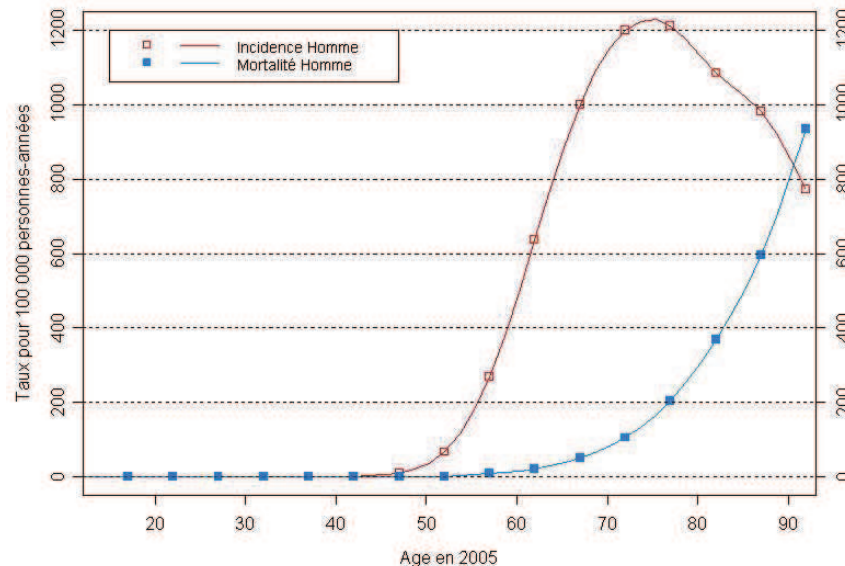
Source <http://globocan.iarc.fr/>

## 2.2. Les facteurs de risque du cancer de la prostate

### ➤ Principal facteur de risque : l'âge.

Le cancer de la prostate est un cancer qui touche la population âgée. En effet, 6 cas de cancer de la prostate sur 10 sont diagnostiqués chez l'homme de plus de 65 ans. Il est rare pour un homme de moins de 40 ans de développer un cancer de la prostate. En moyenne, le cancer de la prostate est diagnostiqué à l'âge de 66 ans. Par exemple, en France, le taux d'incidence du cancer de la prostate augmente progressivement de 50 ans jusqu'à l'âge de 80

ans, puis diminue légèrement pour avoisiner les 560 cas pour 100 000 personnes à plus de 95 ans. Concernant les taux de mortalité, une augmentation progressive est observée dès l'âge de 60 ans (Figure 18).



**Figure 18 :** *Incidence et mortalité du cancer de la prostate en fonction de l'âge en France en 2005.*

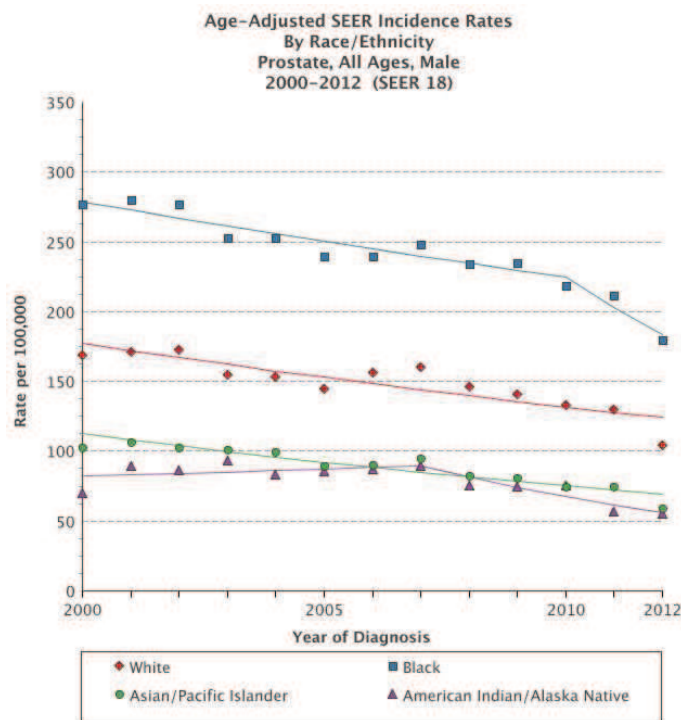
Source : <http://www.invs.sante.fr/>

➤ Facteurs de risque ethnique et géographique

L'incidence du cancer de la prostate présente de très fortes variations selon la localisation géographique et l'origine ethnique (Figure 19). Ainsi, presque 70% des cas de cancer de la prostate apparaissent dans les régions développées avec une très forte incidence en Australie/Nouvelle Zélande et Amérique du Nord. Cependant, l'incidence élevée dans ces pays pourrait en partie s'expliquer par l'accès aux techniques de diagnostic tels que le dosage du PSA et la réalisation de biopsies.

A un niveau de vie égale, les populations noires africaines ont un risque très élevé de développer un cancer de la prostate, tandis que les populations asiatiques présentent un risque très faible (INSERM, 2008). Aussi, les populations Afro-Américaines ont un risque plus important de développer un cancer de la prostate avancé comparé aux populations caucasiennes hispaniques ou non hispaniques (Hoffman et al., 2001). De manière générale, les Afro-Américains développent un cancer de la prostate 2 à 3 ans plus tôt que la population caucasienne. Aussi, à des âges similaires, les Afro-Américains présentent un risque de

mortalité environ 3 fois plus important par rapport aux Européens et Américains caucasiens (Hussein et al., 2015).



**Figure 19 : Incidence du cancer de la prostate en fonction de l'origine ethnique.**

Les populations noires présentent une incidence élevée de cancer de la prostate alors que les populations caucasiennes ont une incidence intermédiaire. Enfin, les populations d'origine asiatique ont une incidence plus faible de cancer la prostate. D'après <http://seer.cancer.gov>

Les différences observées en fonction des origines ethniques et géographiques ne sont pas encore totalement comprises. Toutefois, les différences hormonales pourraient expliquer ces variations. En effet, le niveau de testostérone serait 15% plus élevé dans les populations masculines noires que les populations caucasiennes. Aussi, la 5 $\alpha$ -réductase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT serait plus active dans les populations noires (Kheirandish and Chinegwundoh, 2011).

De plus, des facteurs génétiques ont été identifiés comme facteur de susceptibilité à l'origine de ces différences ethniques. Par exemple, une région de 3,8Mb au niveau du locus 8q24 semble contribuer au risque élevé de cancer de la prostate dans les populations Afro-Américaines (Freedman et al., 2006).

L'incidence du cancer de la prostate chez les japonais américains est plus importante que chez les japonais natifs supportant que les habitudes alimentaires telles que les régimes riches en graisse pourraient aussi contribuer à ces différences ethniques et géographiques (Kheirandish and Chinegwundoh, 2011; Parkin et al., 2001).

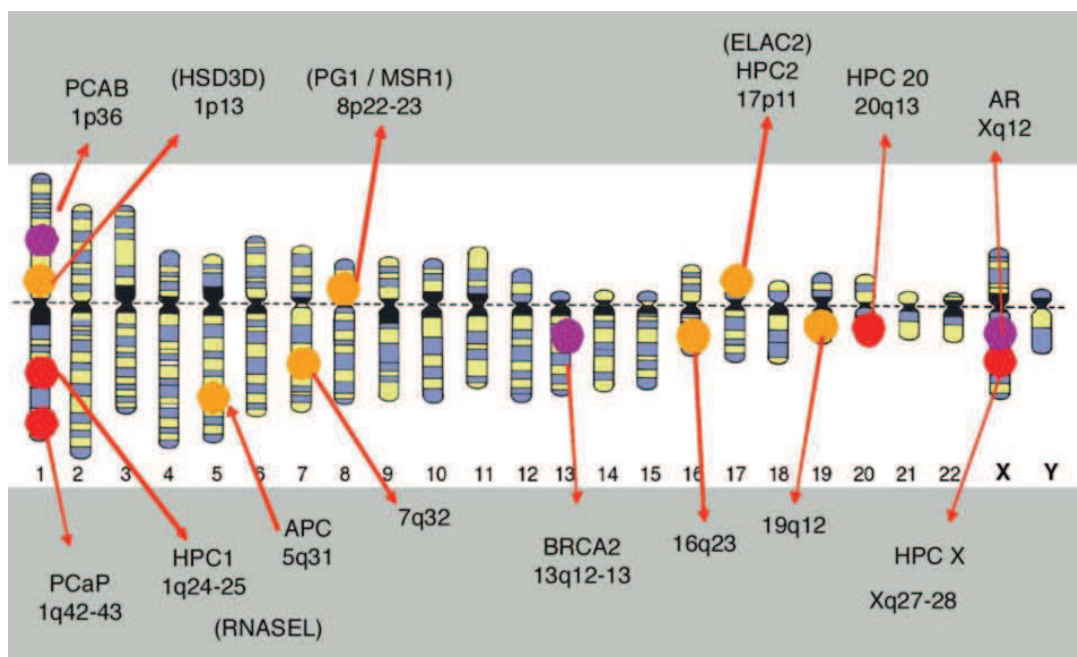
➤ Facteurs de risque familiaux et héréditaires

Dans les années 1950, les travaux cliniques de G. Morganti *et al.* avaient mis en évidence l'existence d'une ségrégation familiale possible dans le cancer de la prostate. Les formes familiales du cancer de la prostate concernent les familles présentant au moins 2 cas de cancers de la prostate chez des apparentés de premier degré (père, frère) et sont recensées dans environ 20% des cas. Ces formes familiales peuvent être liées au hasard ou à l'exposition des membres de la famille à un carcinogène commun. Cependant, dans 5% des cas, le cancer de la prostate est d'origine héréditaire, avec une véritable transmission mendélienne. Cette forme héréditaire est reconnue par des critères plus stricts à savoir avoir 3 cas de cancers de la prostate chez les apparentés de premier degré (père, frères) ou second degré (grands-parents, oncles) ou avoir 2 cas diagnostiqués avant l'âge de 55 ans (Cussenot and Cancel-Tassin, 2004; Fournier et al., 2004). Le cancer de la prostate héréditaire se manifeste en moyenne 6 ans plus tôt que le cancer de la prostate sporadique. Cependant, il n'y a pas de différence en terme de survie ou concernant les caractéristiques cliniques (Bratt et al., 2002).

L'existence de ces formes familiales est associée à un risque plus important de développer un cancer de la prostate pour les apparentés de premier et second degré. Par exemple, lorsque le père est diagnostiqué pour un cancer de la prostate avant 60 ans, le risque relatif pour son fils de développer un cancer de la prostate est augmenté de 1,5 à 2,5 fois (Hussein et al., 2015; Kiciński et al., 2011). Ce risque varie en fonction du nombre d'apparentés atteints, du degré de parenté et de l'âge au diagnostic de l'apparenté porteur du cancer (Cussenot and Cancel-Tassin, 2004).

Ces formes familiales et héréditaires supportent l'importance de facteurs génétiques prédisposant au développement du cancer de la prostate. En 1996, la région 1q24-25 localisée au niveau du chromosome 1, désignée sous le nom de HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1), a été décrite comme locus de prédisposition au cancer de la prostate (Smith et al., 1996). Un effort considérable a été entrepris afin de caractériser les gènes présents au niveau de cette région (Sood et al., 2001). En particulier, le gène RNase L localisé en position 1q25 et codant pour une ribonucléase a été identifié comme un des gènes de susceptibilité au niveau du locus HPC1. Bien que les résultats soient parfois contradictoires d'une étude à l'autre, plusieurs mutations ont été identifiées et associées aux cancers de la prostate héréditaires et sporadiques. Parmi les mutations décrites, la mutation faux-sens R462Q (Arginine → Glutamine) entraîne une baisse de l'activité enzymatique de RNaseL diminuant ainsi sa

capacité à induire l'apoptose (Alvarez-Cubero et al., 2013; Xiang et al., 2003). D'autres loci pour des gènes de prédisposition aux formes héréditaires de cancer de la prostate ont été identifiés comme PcaP (predisposing for prostate cancer) (1q42.2-43), HPCX (Xq27-28), HPC20 (20q13), HPC2 (17q11) aussi appelé ELAC2, ou PG1 (Prostate Cancer Susceptibility Gene 1) (8p22-23) où se trouve le gène MSR1 (Macrophage Scavenger Receptor 1) (Alvarez-Cubero et al., 2013; Cussenot and Cancel-Tassin, 2004). Les principaux loci de prédisposition au cancer de la prostate décrits à ce jour sont résumés dans la figure 20.



**Figure 20 :** Localisation chromosomique des principaux gènes de prédisposition au cancer de la prostate.

La prédisposition au cancer de la prostate peut être le résultat de mutations comme pour le gène RNaseL situé au niveau du locus HPC1 ou de polymorphismes comme celui retrouvé dans le gène codant pour le récepteur des androgènes (AR) (Fournier et al., 2004).

Récemment, les gènes BRCA1 et BRCA2 (Breast cancer 1 ou 2), qui prédisposent au cancer du sein, ont été décrits dans le cancer de la prostate. En particulier, des mutations dans BRCA1 et BRCA2 ont été associées à un cancer de la prostate plus agressif avec des scores de Gleason plus élevés et une plus haute probabilité de métastases ganglionnaires et métastases à distance (Castro et al., 2013; Mitra et al., 2008). Toutefois, des mutations germinales de BRCA2 ont été retrouvées chez seulement 2% des hommes avec un cancer de la prostate avant l'âge de 55 ans (Edwards et al., 2003b). De même, une étude réalisée à partir d'une cohorte de patients au Royaume-Uni révèle que seulement 0,75% des patients ont une mutation délétère dans le gène BRCA1. Cependant, la présence de ces mutations confère un risque relatif de cancer de la prostate augmenté de 3,7 fois (Leongamornlert et al., 2012).

Enfin, une mutation rare mais récurrente (G84E (Glycine → Acide Glutamique)) a été identifiée dans le gène HOXB13 (homeobox B13) codant pour un facteur de transcription à homeobox impliqué dans le développement de la prostate. Cette mutation a été associée à un risque augmenté de cancer de la prostate héréditaire (Ewing et al., 2012). De même, cette mutation G84E représente également un facteur de risque pour les cancers de la prostate sporadiques, bien que les patients porteurs de celle-ci soient rares (Huang and Cai, 2013). Aussi, aucune association entre la sévérité de la maladie et la présence de la mutation n'a été décrite (Karlsson et al., 2014).

#### ➤ Les facteurs de risque hormonaux

Comme décrit précédemment, le RA est un acteur clé dans la prolifération et survie des cellules cancéreuses prostatiques. L'activité transcriptionnelle du récepteur est contrôlée en partie par la région N-terminale contenant la première fonction de transactivation AF-1. Ce domaine transcriptionnel est codé par l'exon 1 du gène et contient des répétitions CAG (codon glutamine) et GGC (codon glycine). Il a été décrit qu'un petit nombre de répétitions CAG (<18-23) et GGC (<16) est associé à un haut niveau de transactivation du récepteur et par conséquent à un risque plus élevé de cancer de la prostate (Cussenot and Cancel-Tassin, 2004; Fournier et al., 2004). Aussi, les individus ayant un RA avec un faible nombre de répétitions CAG ont un risque plus important de développer un cancer de la prostate agressif avec métastases à distance (Giovannucci et al., 1997).

Un autre polymorphisme a été aussi décrit au sein de l'enzyme 5 $\alpha$ -réductase. En effet, au niveau du dernier exon, le dinucléotide TA peut être répété 0, 9 ou 18 fois. Les individus porteur des allèles (TA)<sub>18</sub> ont une sensibilité accrue au cancer de la prostate. De façon intéressante, ces allèles sont retrouvés exclusivement dans la population afro-américaine. De plus, au niveau de l'exon 1 du gène codant pour cette enzyme, deux mutations ont été décrites. La première A49T (Alanine → Thréonine) augmente l'activité de l'enzyme et est donc associée au risque de cancer de la prostate. Au contraire, la deuxième mutation V89L (Valine → Leucine) confère une protection vis-à-vis du cancer de la prostate chez les individus homozygotes (Leu/Leu) (Fournier et al., 2004).

D'autres polymorphismes associés au cancer de la prostate ont été décrits au niveau des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme des androgènes comme CYP3A4 (cytochrome P450 3A4), CYP17 ou encore HSD3B1 et 2 (3-bêta-hydroxystéroïde-déshydrogénase type 1 et 2) (Chang et al., 2002; Zeigler-Johnson et al., 2004).

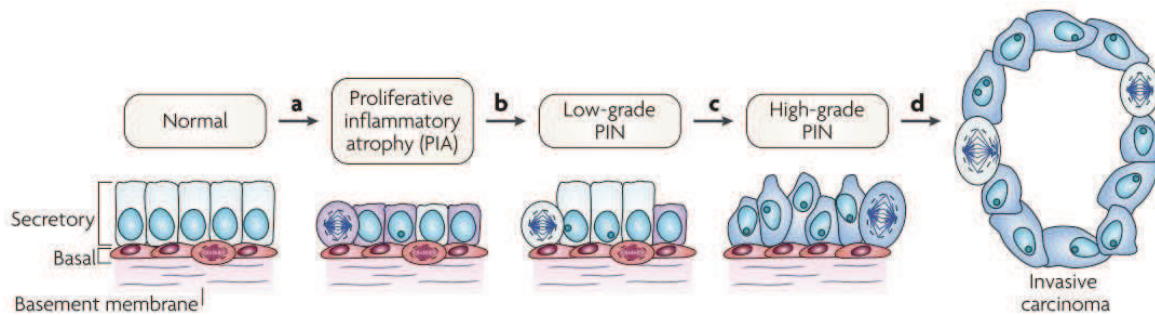
Finalement, des études ont décrit des polymorphismes au niveau du gène codant pour le récepteur de la vitamine D. Ces polymorphismes sont associés soit à une augmentation ou à une diminution du risque de développer un cancer de la prostate. Aussi, des taux élevés de vitamine D ont été associés à un risque moindre de cancer de la prostate (Fournier et al., 2004).

### *2.3. Etiologie du cancer de la prostate et base de la cancérogénèse*

Comme mentionné précédemment, la zone périphérique est le site privilégié pour le développement du cancer de la prostate avec environ 70% des cancers se développant dans cette zone. Seulement 25% des cancers de la prostate prennent naissance dans la zone de transition et les 5% restants ont lieu dans la zone centrale (Fourcade, 1997).

Le cancer de la prostate est un cancer multifocal comme en témoigne les nombreuses lésions cancéreuses génétiquement distinctes présentes au sein de la tumeur primaire (Shen and Abate-Shen, 2010). Bien que le cancer de la prostate est un cancer touchant l'homme âgé, des lésions histologiques de cancer de la prostate ont été décrites chez l'homme sain âgé de 20-40 ans, suggérant que l'initiation du cancer de la prostate a lieu très tôt. A partir de là, une accumulation de transformations génétiques et épigénétiques pourraient conduire à l'apparition d'un cancer de la prostate détectable.

La cancérogénèse prostatique est caractérisée par une succession d'étapes avec une accumulation d'anomalies génétiques conduisant à une prolifération anarchique des cellules prostatiques (Figure 21).



**Figure 21 : Modèle de cancérogénèse prostatique.**

Le développement du cancer de la prostate est un processus lent, faisant intervenir une succession d'événements moléculaires conduisant à l'apparition d'un cancer de la prostate détectable. L'une des premières étapes de la cancérogénèse prostatique est l'apparition d'une atrophie inflammatoire proliférative (PIA) (a). Celle-ci conduit ensuite à une néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) de bas grade (b) puis de haut grade (c). Enfin, l'apparition d'un carcinome invasif est la conséquence d'une accumulation de nombreuses altérations génétiques (d) (De Marzo et al., 2007a).

#### ➤ L'atrophie inflammatoire proliférative (PIA)

L'atrophie inflammatoire proliférative correspond à des lésions prostatiques avec un épithélium atrophique présentant un fort index mitotique et est associée à une inflammation chronique ou aigue. Cependant, au sein de ces zones, les cellules prolifératives sont incapables de se différencier en cellules sécrétoires prostatiques (Nelson et al., 2003). Comme pour le cancer de la prostate, le site privilégié des PIA est la zone périphérique de la prostate (Palapattu et al., 2005). Plusieurs études ont rapporté le rôle des PIA comme une lésion précurseur au développement du cancer de la prostate. En effet, des études morphologiques ont décrit une transition entre les PIA et des néoplasies intra-épithéliales prostatiques (PIN) de haut grade (De Marzo et al., 2007b). Aussi, une altération des mêmes voies de signalisation a été rapportée dans les PIA et dans le cancer de la prostate. Par exemple, au niveau des lésions d'atrophie focale, les suppresseurs de tumeur NKX3.1, p27 et PTEN (phosphatase and tensin homolog) sont sous-exprimés comme il est fréquemment observé dans les PIN et le cancer de la prostate (De Marzo et al., 2007a). Cependant, toutes les lésions PIA ne sont pas associées à un cancer de la prostate et inversement (Billis and Magna, 2003). Il a été proposé que seules les régions contenant des PIA incapables de se protéger contre les dommages oxydatifs à l'ADN pourraient évoluer vers des lésions PIN ou un cancer de la prostate (Palapattu et al., 2005). L'exposition de la prostate à des agents pathogènes, à des composés chimiques tels que l'acide urique présent dans l'urine, à des agents carcinogènes alimentaires ou encore aux oestrogènes sont autant de facteurs conduisant à une inflammation au sein de la prostate. Aussi, il a été décrit que les corps amylacés présents dans la lumière de la glande prostatique

induisent une inflammation de la prostate et sont impliqués dans la carcinogénèse prostatique (De Marzo et al., 2007a).

Lors de la réponse inflammatoire, les cellules de l'immunité produisent de nombreux radicaux libres responsables d'une mort cellulaire importante. Ainsi, la prolifération accrue observée dans les PIA favoriserait le renouvellement de l'épithélium suite aux dommages à l'ADN induits par ce stress oxydant. Cependant l'exposition accrue aux radicaux libres favorisent aussi l'apparition de mutations affectant des oncogènes, des suppresseurs de tumeur ou des gènes gardiens de l'intégrité du génome (Nelson et al., 2003; Palapattu et al., 2005). Ainsi, une diminution de p27, NKX3.1 et PTEN est observée favorisant l'entrée des cellules prostatiques dans le cycle cellulaire (De Marzo et al., 2007a). De plus, les cellules épithéliales dans les PIA montrent des signes de stress cellulaire en exprimant des gènes tels que GSTP1 (Glutathione S-Transferase Pi 1), GSTA1 (Glutathione S-transferase A1) ou COX-2 (Cyclooxygenase-2). La perte de GSTP1 par hyperméthylation de son promoteur pourrait conduire à la transition entre PIA et lésions de PIN (De Marzo et al., 2007a; Nelson et al., 2003).

#### ➤ Les néoplasies intra-épithéliales prostatiques (PIN)

La néoplasie intra-épithéliale prostatique est constituée d'acini ou de canaux prostatiques dont l'architecture est bénigne (Fournier et al., 2004). Cependant, au niveau histologique, ces lésions sont bien caractérisées avec l'apparition d'une hyperplasie des cellules épithéliales luminales, une réduction du nombre de cellules basales, des nucléoles et noyaux proéminents et une atypie nucléaire (Shen and Abate-Shen, 2010). On distingue 2 types de PIN : les PIN de bas grade et les PIN de haut grade. La présence de PIN de haut grade au sein d'une biopsie augmente le risque d'adénocarcinome de 15 fois par rapport à une biopsie sans PIN. De plus, les PIN de haut grade ont un index prolifératif et un nombre de noyaux aneuploïdes plus élevés comparés aux PIN de bas grade mais similaires à ce qui est observé dans un adénocarcinome. Aussi, l'expression des marqueurs de différenciation des cellules épithéliales prostatiques tend à diminuer suivant le grade des PIN, avec une diminution encore plus importante dans les adénocarcinomes. Finalement, des changements apparaissent au niveau du stroma prostatique avec une augmentation du nombre de petits vaisseaux sanguins, bien que ce nombre soit plus faible comparé aux adénocarcinomes (Bostwick et al., 1996). Au stade de PIN de haut grade, les cellules sont génétiquement instables et prolifèrent de façon importante accumulant de plus en plus d'altérations génétiques tels que des réarrangements

conduisant aux gènes de fusion TMPRSS2-ETS par exemple. Ces modifications conduisent à la progression vers un carcinome invasif (De Marzo et al., 2007a).

➤ L'adénocarcinome prostatique

L'adénocarcinome prostatique diffère des PIN de haut grade par la disparition des cellules basales. En effet, la présence d'un adénocarcinome prostatique peut être confirmée en immunohistochimie par l'absence de marquage pour p63 et pour les cytokératines 5 et 14. Aussi, une expression élevée de  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase (AMACR), un marqueur luminal, a été décrite (Humphrey, 2007). De plus, dans les adénocarcinomes prostatiques, une rupture de la membrane basale favorisant ainsi l'invasion des cellules dans le stroma a été observée (Abate-Shen and Shen, 2000).

La vaste majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes acineux, cependant, d'autres catégories de cancers de la prostate plus rares ont été décrites telles que les adénocarcinomes ductaux, les carcinomes mucineux ou l'adénocarcinome à différenciation neuroendocrine (Shen and Abate-Shen, 2010).

#### *2.4. Diagnostic et dépistage du cancer de la prostate*

Dans la majorité des cas, les patients ayant un cancer de la prostate localisé sont souvent asymptomatiques. La présence de symptômes témoigne un stade plus avancé de cancer de la prostate. Ainsi, la présence de troubles mictionnels est la conséquence d'un envahissement ou d'une compression extrinsèque par évolution locale du cancer de la prostate et révèle un cancer localement avancé avec une atteinte des organes avoisinants. L'apparition de symptômes tels que des douleurs osseuses ou des compressions médullaires résulte d'un cancer de la prostate métastatique (Roupret and Beley, 2008).

Actuellement les techniques de dépistage du cancer de la prostate reposent sur le dosage du PSA, le toucher rectal et la réalisation d'un examen anatomo-pathologique par biopsies.

➤ Le dosage du PSA

Comme mentionné précédemment, le PSA est une glycoprotéine normalement sécrétée par les cellules luminales de la prostate. Bien que cette protéine se retrouve principalement dans le sperme, il est normal de la retrouver en petite quantité dans le sang. Actuellement, la société américaine du cancer recommande le dosage du PSA à partir de 50

ans pour la population générale et 45 ans pour les populations à haut risque (facteur ethnique ou formes familiales) (Smith et al., 2005). La valeur seuil de PSA total habituellement retenue est de 4ng/mL. Cependant, cette valeur seuil dépend de l'âge du patient et du volume prostatique. Par exemple, un taux de PSA total supérieur à 2,5ng/mL à l'âge de 45 ans doit être considéré comme anormal alors que ce ne serait pas le cas pour un patient âgé de 65 ans (Long et al., 2011). Bien que ce dosage permette de détecter un cancer de la prostate à un stade précoce, il est encore très controversé. En effet, une élévation du taux de PSA sérique peut témoigner de diverses pathologies que cela soit une hyperplasie bénigne, un cancer de la prostate ou même d'une prostatite (Dufour et al., 2009). De plus, des patients ayant une valeur de PSA inférieure à 4ng/mL peuvent avoir un cancer de la prostate potentiellement agressif (Bradford et al., 2006). Cependant, l'intérêt du dépistage du cancer de la prostate par dosage du PSA sérique a été montré dans une étude réalisée dans une région du Tyrol en Autriche. Dans cette région, les hommes âgés de 45 à 75 ans ont bénéficié d'un dosage systématique du PSA. Une diminution très significative de la mortalité par cancer de la prostate a été observée comparée aux autres régions d'Autriche n'ayant pas bénéficié de ce programme de dépistage systématique (Bartsch et al., 2008). Cependant, bien que le screening du PSA tende à diminuer la mortalité par cancer de la prostate, environ 41 % des patients seraient sur-diagnostiqués résultant en un sur-traitement. Ainsi, des stratégies contournant ce problème de sur-diagnostic sont nécessaires avant de considérer l'éventualité d'introduire systématiquement le dosage du PSA à toute la population (Schröder et al., 2014).

Dans le sang, le PSA peut se trouver sous une forme libre ou complexé à des protéines du sérum tels que l' $\alpha_1$ -antichymotrypsine. Afin de pouvoir mieux discriminer les pathologies bénignes du cancer de la prostate, il a été proposé de doser le PSA libre dans le sang. En effet, la proportion de PSA libre serait plus faible chez un homme atteint d'un cancer de la prostate qu'une hyperplasie bénigne (Bradford et al., 2006). Ainsi, un rapport PSA libre/PSA total inférieur à 20% témoignerait d'un risque de cancer de la prostate alors qu'un rapport supérieur à 20% serait en faveur d'une hyperplasie bénigne de la prostate (Roupret and Beley, 2008).

#### ➤ Le toucher rectal

Le toucher rectal permet d'examiner le volume, la consistance et la régularité de la prostate. Une augmentation du volume de la prostate, un durcissement et des irrégularités à sa surface peuvent évoquer un cancer de la prostate. Le toucher rectal est une méthode de

diagnostic complémentaire au dosage du PSA et permet parfois de détecter un cancer malgré un taux de PSA considéré comme normal (Roupret and Beley, 2008).

➤ L'examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique est le seul examen qui puisse faire le diagnostic de cancer de la prostate. Cet examen se réalise au moyen de biopsies échoguidées avec prélèvement au minimum de 12 carottes qui permettent de cartographier l'ensemble de la prostate de la base à son apex. Ces biopsies sont ensuite examinées par le médecin anatomopathologiste qui précisera le type histologique du cancer, le score de Gleason ou encore le degré d'envahissement du cancer (Dufour et al., 2009; Long et al., 2011; Roupret and Beley, 2008).

*2.5. Classification TMN du cancer de la prostate*

La classification TMN (Tumor, Metastasis, Node) est un système proposé en 1940 par le chirurgien français Pierre Denoix permettant de classer les tumeurs en fonction de leur extension anatomique (Brierley, 2006).

La classification se base sur la taille de la tumeur et son degré de propagation dans les tissus voisins (T), le nombre de ganglions lymphatiques voisins atteints (N) et la présence de métastases (M) (Chang and Amin, 2008; Roupret and Beley, 2008; Salomon et al., 2010).

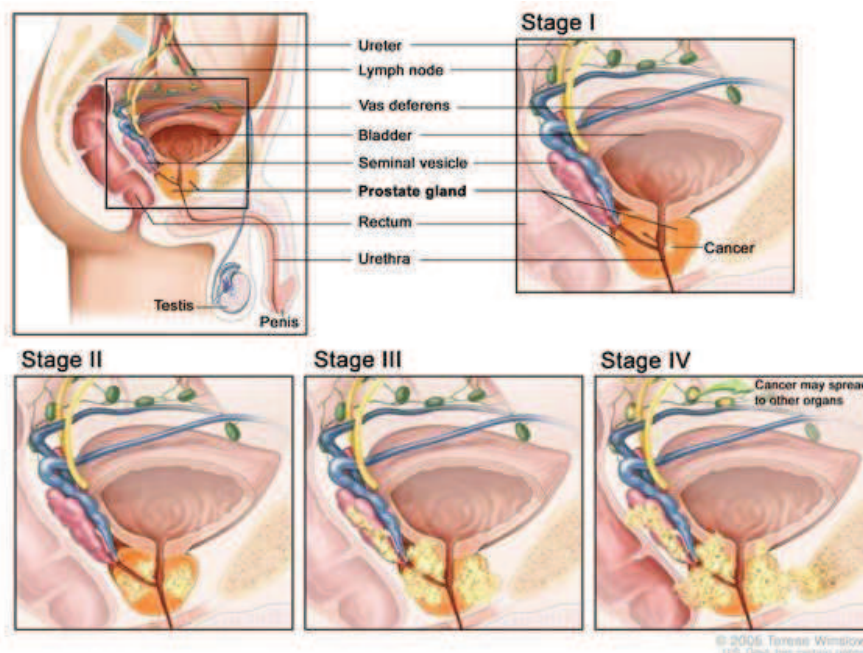
➤ Extension de la tumeur primitive (T)

En fonction de l'extension de la tumeur primitive on distingue 4 stades (Figure 22) :

- Le stade T1 caractérise une tumeur non palpable au toucher rectal et non visible en imagerie. Il est subdivisé en stade T1a, T1b et T1c. Le stade T1a désigne une tumeur qui occupe moins de 5% du tissu réséqué. Au contraire, lorsque la tumeur occupe plus de 5% du tissu réséqué, on parle de stade T1b. A ces deux stades, la découverte du cancer se fait sur une résection prostatique réalisée pour d'autres raisons qu'une suspicion de cancer (par exemple, une résection trans-urétrale de prostate pour une hyperplasie bénigne de la prostate).

Le stade T1c correspond à la découverte d'une tumeur sur une biopsie prostatique réalisée en raison d'un taux élevé de PSA.

- Le stade T2 caractérise une tumeur qui est limitée à la prostate. En fonction de l'extension de la tumeur au sein de la prostate, on distingue le stade T2a, T2b, et T2c. Le stade T2a correspond à une tumeur atteignant la moitié d'un lobe prostatique ou moins et le stade T2b qualifie une tumeur envahissant plus d'un lobe sans atteindre les deux lobes. Enfin, le stade T2c désigne une tumeur atteignant les deux lobes prostatiques.
- Lorsque la tumeur prostatique s'étend au delà de la capsule prostatique, on parle de stade T3. En particulier, le stade T3a désigne une atteinte du tissu extra prostatique (uni- ou bilatérale) et le stade T3b qualifie une atteinte des vésicules séminales (uni- ou bilatérale).
- Le stade T4 caractérise une tumeur atteignant des structures avoisinantes autres que les vésicules séminales comme le sphincter externe, le rectum, les muscles releveurs de l'anus ou la paroi pelvienne.



***Figure 22 : Représentation schématique des différents stades « T » de la classification TMN du cancer de la prostate***

➤ Propagation de la tumeur au niveau des ganglions lymphatiques avoisinants (N)

Ce stade réfère le nombre de ganglions régionaux atteints correspondant essentiellement aux ganglions pelviens situés en dessous de la bifurcation des artères iliaques. On distingue le stade N0 caractérisant une absence d'atteinte ganglionnaire et le stade N1 avec une atteinte des ganglions régionaux. Lorsque la métastase ganglionnaire est inférieure à 0,2 cm, on peut parler de stade N1mi. Enfin, Nx signifie que l'atteinte des ganglions régionaux n'a pas été évaluée.

➤ Propagation de la tumeur vers des organes éloignés (M)

Ce stade identifie la présence de métastases à distance. L'absence de métastases à distance est annotée M0 et la présence de métastases est notée M1. Les métastases à distance peuvent atteindre les ganglions lymphatiques non régionaux (M1a), les os (M1b) ou d'autres organes comme les poumons, le foie ou les glandes surrénales (M1c).

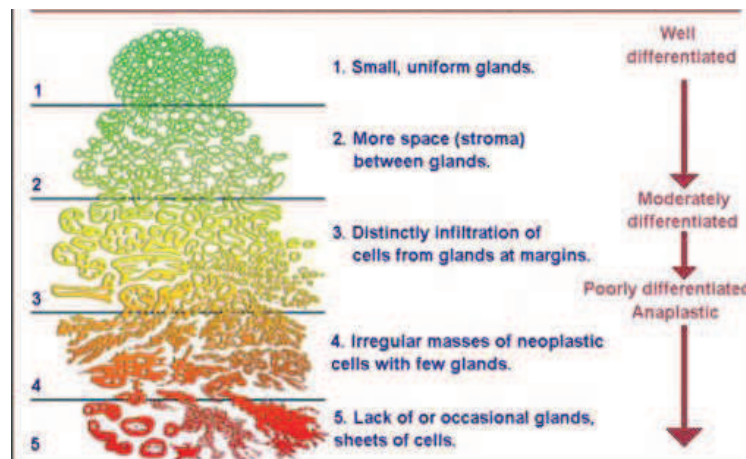
Au moment du diagnostic, 60% des tumeurs sont localisées (stade T1 ou T2), 30% sont localement avancées (stade T3) et 10% sont des formes métastatiques (stade N+ ou M+) (Roupret and Beley, 2008).

## *2.6. Le score de Gleason*

Le score de Gleason, crée en 1966 et redéfini en 2005, est reconnu internationalement et adopté par l'organisation mondiale de la santé (Salomon et al., 2010). Il s'agit d'un système de classification histologique utilisé pour exprimer des résultats obtenus à partir de biopsies prostatiques, de copeaux de résection endoscopique ou pièces de prostatectomie. Ce score définit le degré de différenciation de la tumeur et a un intérêt pronostique. Le grade histologique de Gleason comporte cinq sous-groupes notés de 1 (composante tumorale bien différenciée) à 5 (composante tumorale indifférenciée) (Figure 23) (Fournier et al., 2004).

En raison de l'hétérogénéité fréquente au sein d'une même tumeur, un score de Gleason est établi en additionnant la somme des deux grades des deux composantes tumorales les plus représentées. Un score de Gleason compris entre 2 et 4 définit un cancer de la prostate bien différencié et de bon pronostic. Un score entre 5 et 7 correspond à un cancer de la prostate moyennement différencié et un score entre 8 et 10 caractérise un cancer de la prostate

indifférencié et de pronostic plus mauvais (Roupret and Beley, 2008). De plus, un score de Gleason à 3+4 désigne un cancer moins agressif car plus différencié qu'un score de Gleason 4+3 où la composante 4 est la plus représentée. Au moment du diagnostic, aux Etats Unis dans la période de 1990 à 1995, 15 à 20% des tumeurs avaient un score entre 2 et 4, 46 à 56 % avaient un score entre 5 et 7 et 21 à 29 % des tumeurs avaient un score entre 8 et 10 (Fournier et al., 2004).



**Figure 23: Représentation schématique du grade de Gleason**

Le Grade 1 définit des petites glandes uniformes et bien différenciées. Le grade 2 correspond à des glandes simples arrondies et plus dispersées avec des foyers à bords mal définis. Le grade 3 révèle la présence de glandes de taille et forme variables avec des foyers à bords très irréguliers. Le grade 4 définit la présence de massifs irréguliers de glandes fusionnées. Enfin, le grade 5 correspond à une disparition des structures glandulaires. Ce dernier stade représente une zone tumorale indifférenciée.

La classification TMN et l'analyse du score de Gleason permettent d'estimer la gravité du cancer de la prostate mais également une bonne prise en charge du patient en lui proposant un traitement adapté.

### *2.7. La classification d'Amico*

La classification d'Amico permet de classer les formes localisées de cancer de la prostate en fonction du risque évolutif du cancer. Trois groupes pronostics ont été établis en fonction du taux de PSA, de la différenciation tissulaire évaluée par le score de Gleason et de l'envahissement clinique défini par la classification TMN :

- **Groupe à faible risque de rechute** :  $PSA \leq 10 \text{ ng/mL}$  et score de Gleason  $\leq 6$  et stade clinique T1c ou T2a.

- **Groupe à risque intermédiaire** : PSA entre 11 et 20ng/mL ou score de Gleason égal à 7 ou stade clinique T2b
- **Groupe à haut risque de rechute** : PSA >20ng/mL ou score de Gleason compris entre 8 et 10 ou stade clinique T2c

Cette classification permet d'estimer le pronostic de la maladie et donc d'adapter la décision thérapeutique initiale (Long et al., 2011; Salomon et al., 2010).

### *2.8. Les traitements du cancer de la prostate*

A l'heure actuelle, plusieurs traitements sont disponibles pour le cancer de la prostate dont les plus courants sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Le choix de la thérapie dépend de l'âge du patient, de l'étendue du cancer estimée par la classification TMN, du score de Gleason, du taux de PSA ou encore du risque de rechute.

#### ➤ La surveillance

La fréquence de diagnostic des formes de cancer de la prostate latentes ou peu évolutives est en constante évolution ces dernières années avec le dosage du PSA. Afin d'éviter le sur-traitement de tels cancers, il est possible en accord avec le patient de ne pas recourir immédiatement à un traitement curatif. La surveillance comporte l'abstention surveillance ou la surveillance active.

L'abstention surveillance concerne des patients symptomatiques ayant une espérance de vie inférieure à 10 ans et avec une tumeur non agressive de stade T1 ou T2. Ces patients bénéficient uniquement d'un traitement palliatif (Long et al., 2011; Salomon et al., 2010). De façon intéressante, une étude récente a montré que chez de tels patients, il n'y a aucun bénéfice de la chirurgie puisque celle-ci ne conduit pas à une baisse de la mortalité par cancer (Wilt et al., 2012).

Une surveillance active peut être mise en place pour les patients avec une tumeur localisée à très faible risque de progression et ayant une espérance de vie supérieure à 10 ans. Le but de la surveillance active est de ne débiter un traitement qu'en cas d'évolution du cancer de la prostate. Un suivi du patient à l'aide de mesures du taux de PSA, de touchers rectaux et de biopsies est réalisé afin de suivre l'évolution du cancer de la prostate (Long et al., 2011; Salomon et al., 2010).

➤ La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale est le traitement de référence des cancers de la prostate localisés pour des patients âgés de moins de 70 ans et ayant une espérance de vie supérieure à 10 ans. Elle est préconisée pour des tumeurs limitées à la prostate à risque de rechute faible ou intermédiaire selon la classification d'Amico. Cependant, elle peut être envisagée chez les patients à risque élevé lorsque l'atteinte extra-capsulaire est limitée (stade T3a) (Salomon et al., 2010). L'acte chirurgical consiste en l'ablation de la glande prostatique et des vésicules séminales et, est parfois associé à un curage ganglionnaire (Dufour et al., 2009). L'exérèse ganglionnaire est réalisée pour les groupes à risque intermédiaire ou élevé de rechute ; celle-ci n'étant pas recommandée pour les groupes à faible risque (Long et al., 2011). La prostate et les ganglions prélevés sont analysés par le médecin anatomopathologiste en vue de préciser le degré d'extension de la tumeur et l'atteinte ganglionnaire. Cette analyse permet d'envisager ou non des traitements complémentaires à la chirurgie.

En raison de la section des canaux déférents, la prostatectomie radicale conduit systématiquement à une infertilité du patient. De plus, dans 60 % des cas, elle est associée à un dysfonctionnement érectile (Roupret and Beley, 2008). Toutefois, il est possible chez les patients à risque faible ou intermédiaire de conserver la fonction érectile en préservant les bandelettes vasculo-nerveuses (Salomon et al., 2010). Aussi, une incontinence urinaire peut être observée dans 10% des cas (Roupret and Beley, 2008).

➤ La radiothérapie

La radiothérapie externe est préconisée pour les patients de plus de 70 ans ou pour les malades inopérables. Elle consiste à diriger des rayons produits par une source externe au niveau de la prostate et des vésicules séminales en vue d'irradier la tumeur. Une dose de 70 grays est progressivement délivrée en 6 semaines à raison d'une séance par jour en moyenne. La radiothérapie conformationnelle en 3D permet de localiser, par tomodensitométrie, le volume cible et ainsi diminuer les effets secondaires sur les tissus avoisinants (Long et al., 2011; Roupret and Beley, 2008). En effet, les effets secondaires les plus observés sont liés à l'irritation des organes voisins de la prostate conduisant à des rectites, cystites ou iléites. Aussi, comme pour la prostatectomie radicale, dans 50% des cas est observé un dysfonctionnement érectile (Dufour et al., 2009; Roupret and Beley, 2008).

La curiethérapie consiste en l'implantation de grains radioactifs, le plus souvent de l'iode<sup>125</sup>, dans la glande prostatique par voie trans-périnéale. Elle peut être proposée pour

soigner des patients ayant une tumeur de bon pronostic (stades T1c/T2a), un taux de PSA inférieur à 10ng/mL, un score de Gleason inférieur à 7 et une prostate n'excédant pas 50 grammes. L'avantage de la curiethérapie est de pouvoir délivrer des doses plus importantes que la radiothérapie externe à un endroit précis, ce qui diminue l'effet sur les organes voisins (Dufour et al., 2009; Long et al., 2011). Pour les groupes de risque faible et intermédiaire de rechute selon la classification d'Amico, ce traitement montre le même taux de survie sans récurrence que la prostatectomie radicale ou la radiothérapie externe (Stokes, 2000).

#### ➤ Nouvelles thérapies alternatives pour les cancers de la prostate localisés

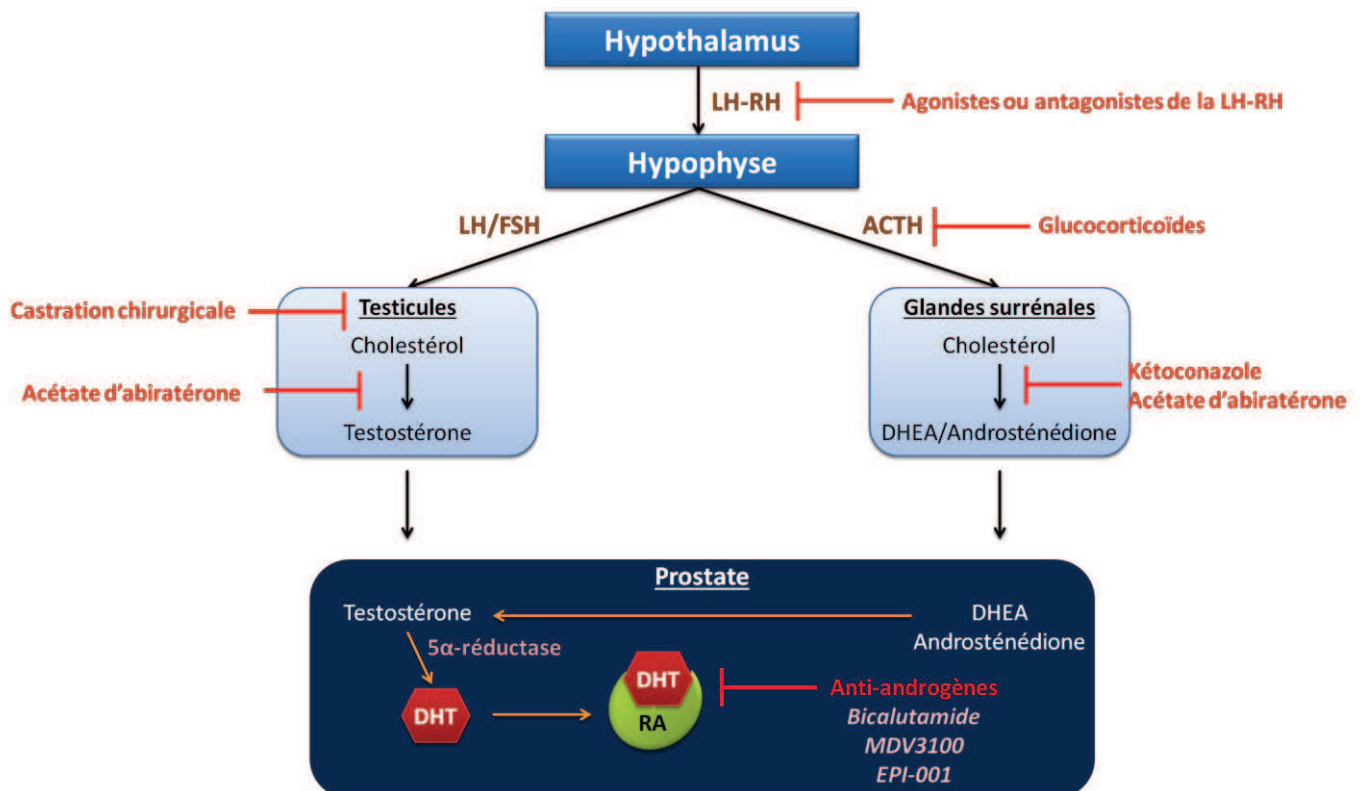
De nouvelles thérapies ont été développées récemment comme alternative à la chirurgie ou radiothérapie. Par exemple, en 1993 a été développée la thérapie aux ultra-sons focalisés de haute intensité (HIFU) dont le principe est de placer, par voie endorectale, un émetteur d'ultrasons à haute intensité, focalisés sur la glande prostatique (Merckx et al., 2010). Cette thérapie présente l'avantage d'être peu invasive et de ne nécessiter le plus souvent de qu'une seule intervention. Cependant, une résection endoscopique de la prostate au préalable est nécessaire afin de limiter le risque de dysurie ou de rétention urinaire (Dufour et al., 2009).

Un autre traitement alternatif est la cryothérapie qui consiste à congeler l'ensemble ou une partie de la glande prostatique à l'aide d'une crysonde introduite par voie périnéale. A l'heure actuelle, le recul est insuffisant pour juger l'efficacité de cette thérapie comparée aux thérapies conventionnelles. Toutefois, il a été rapporté sur une série de 73 patients que la cryothérapie limitée à la tumeur pourrait offrir un résultat similaire à la prostatectomie radicale pour les patients de risque faible ou intermédiaire (Mohammed et al., 2014).

#### ➤ L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est le traitement de référence des formes métastatiques du cancer de la prostate. Elle résulte des travaux du Dr. Charles Brenton Huggins qui, dès 1941, a montré une diminution de la phosphatase acide dans le sérum de patients ayant un cancer de la prostate métastatique, après élimination des androgènes par orchidectomie ou administration d'oestrogènes (Huggins and Hodges, 1941). Ces travaux, qui mettent en avant le caractère hormono-dépendant du cancer de la prostate, lui ont valu l'obtention du prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1966.

Comme mentionné auparavant, la prostate est sous le contrôle des androgènes, dont la synthèse est régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire. De plus, la voie de signalisation du RA est essentielle à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. Ainsi, cette hormono-dépendance est mise à profit pour le traitement par hormonothérapie ou castration médicale. Cette thérapie consiste à bloquer toute activation de la voie de signalisation du RA (Figure 24).



**Figure 24 : Principes de l'hormonothérapie dans le cancer de la prostate**  
FSH : Follicule-Stimulating Hormone

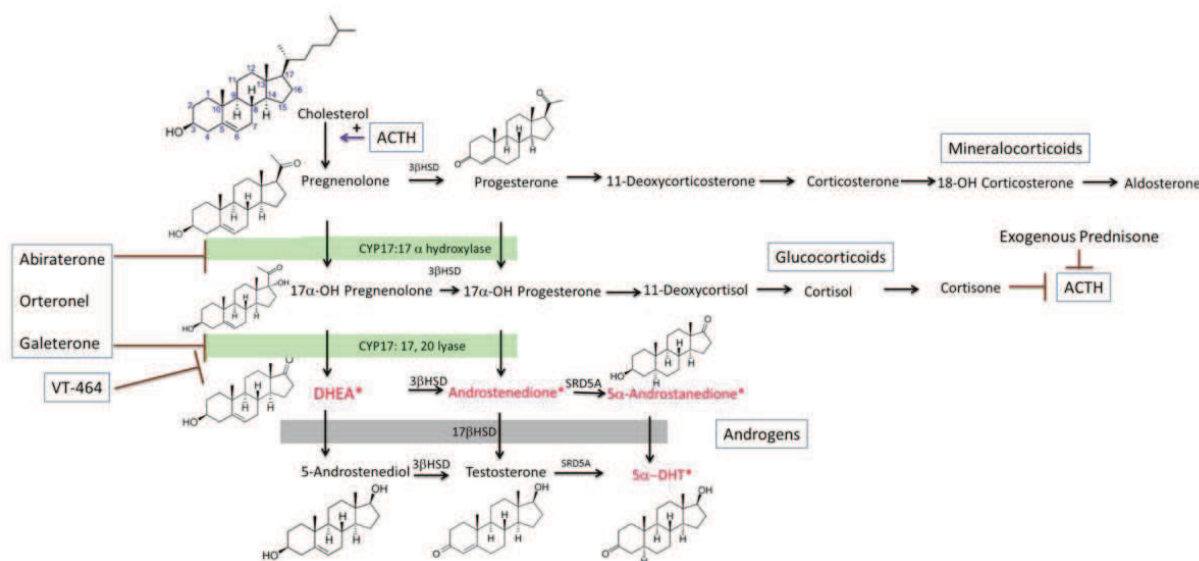
Jusque dans les années 1970, la déprivation en androgènes était effectuée soit par castration chirurgicale ou administration de diethylstilbestrol (DES), un oestrogène non stéroïdien de synthèse. Bien que les bénéfices soient réels, ces traitements étaient associés à des effets secondaires importants. Par exemple, le DES entraîne une forte toxicité cardiovasculaire (Perlmutter and Lepor, 2007).

En 1971, la caractérisation de la structure de la LH-RH et la synthèse d'agonistes de cette hormone par Andrew Schally a été une réelle avancée pour le traitement par hormonothérapie. Bien que ces agonistes entraînent dans un premier temps une augmentation transitoire du niveau de testostérone qualifiée de "*flare up*", une boucle d'autorégulation se met très rapidement en place conduisant à une réduction des récepteurs de la LH-RH situés au

niveau de l'hypophyse. Il en résulte alors une diminution de la synthèse de la LH entraînant un défaut de stimulation des testicules et donc une baisse de la production de testostérone. Ces agonistes ont un effet similaire sur le volume tumorale comparé au DES et à l'orchidectomie. Pour contrecarrer cet effet "*flare up*", des antagonistes de la LH-RH inhibant directement le récepteur ont été développés. Ces antagonistes ont l'avantage de baisser la testostéronémie très rapidement sans causer d'effet "*flare up*" (Denmeade and Isaacs, 2002; Wong et al., 2014).

De plus, pour éviter cet effet "*flare up*", un anti-androgène peut être administré durant les premières semaines en combinaison avec les agonistes de la LH-RH.

Les agonistes ou antagonistes de la LH-RH n'agissent qu'au niveau de la production d'androgènes testiculaires. Toutefois, 10% des androgènes sont issus de précurseurs surrénaliens et pourraient suffire à soutenir la prolifération des cellules tumorales prostatiques. Ainsi, des résistances à la castration sont très rapidement observées. A ce stade, il est utile de recourir à un blocage androgénique complet. En première intention, le blocage androgénique complet combine les agonistes ou antagonistes de la LH-RH avec des anti-androgènes stéroïdiens ou non (Long et al., 2011). Les anti-androgènes stéroïdiens, tels que l'acétate de cyprotérone, ont l'avantage d'avoir un effet direct sur le RA et une action progestative en inhibant la sécrétion de la LH. Au contraire, les anti-androgènes non stéroïdiens, tels que le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide, agissent uniquement sur le RA (Chen et al., 2009; Salomon et al., 2010). L'ajout de ces anti-androgènes est associé à une réponse biologique dans 60 à 80% des cas pour une durée médiane de 4 à 6 mois (Long et al., 2011). En deuxième ligne thérapeutique, des inhibiteurs de la synthèse des androgènes sont administrés chez le patient (Figure 25).



**Figure 25 : Voies de biosynthèse des stéroïdes et cibles thérapeutiques.**

La testostérone est convertie en DHT dans le tissu périphérique. L'acétate d'abiratéronne inhibe à la fois l'activité de la 17 $\alpha$ -hydroxylase et de la 17,20-lyase. L'orteronel, la galeterone et le VT-464 sont des inhibiteurs de la CYP17,20 lyase. Astérisque et noté en rouge : Androgènes intervenant dans la biosynthèse de la DHT via la voie de la 5 $\alpha$ -androstènedione. 3 $\beta$ HSD : 3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase ; SRD5A : steroid 5 alpha reductase ; DHT : dihydrotestostérone ; DHEA : dehydroepiandrosterone (Stein et al., 2014).

Par exemple, l'administration de glucocorticoïdes inhibe la sécrétion de l'ACTH par un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, ce qui conduit à une diminution de la synthèse des androgènes surrénaliens (Chen et al., 2009). Aussi, le kétoconazole, un inhibiteur non spécifique des enzymes du cytochrome P450 qui interviennent dans la biosynthèse des androgènes surrénaliens, conduit à une baisse de 50% de la production surrénalienne. Récemment, un inhibiteur spécifique de l'enzyme CYP17 (Cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase), impliquée dans la biosynthèse des androgènes dans les testicules et les glandes surrénales, a été mis sur le marché. Il s'agit de l'acétate d'abiratéronne commercialisé sous le nom de Zytiga®. Cette molécule est associée à une survie globale plus importante que le groupe placebo mais doit être combinée à la prise de corticoïdes tels que la prednisone afin d'éviter les effets secondaires dus à l'excès de minéralocorticoïdes (Ang et al., 2009; Wong et al., 2014). L'enzalutamide (ou MDV3100) est une autre alternative de traitement, qui, pour le moment, est indiqué uniquement pour les patients après chimiothérapie. Il s'agit d'un anti-androgène de seconde génération ayant une haute affinité pour la liaison au RA. Cette molécule présente des propriétés remarquables puisqu'elle affecte aussi la translocation du récepteur, la liaison à l'ADN et le recrutement de cofacteurs (Wong et al., 2014).

Dans le cas de résistances à ces traitements ou d'aggravation des symptômes, il est indiqué de proposer une chimiothérapie à ces patients.

➤ La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à injecter en intraveineux des molécules capables d'empêcher les cellules cancéreuses de se multiplier. La chimiothérapie est actuellement indiquée chez les patients résistants à l'hormonothérapie ayant eu deux augmentations successives du taux de PSA au dessus de la référence antérieure (Salomon et al., 2010). Le docetaxel (TAXOTERE®) est actuellement proposé en première ligne de chimiothérapie. Ce médicament est un alcaloïde dérivé des aiguilles d'ifs de la famille des taxanes qui favorise l'assemblage de la tubuline en microtubules stables et inhibe leur dépolymérisation. Ainsi, en inhibant la dynamique normale du réseau de microtubules, il empêche la progression des cellules cancéreuses dans le cycle cellulaire. Le cabazitaxel (JEVTANA®) offre aujourd'hui une nouvelle possibilité de chimiothérapie efficace en deuxième ligne. Cette molécule est un dérivé semi-synthétique d'un taxane naturel dont le fonctionnement est similaire au docetaxel. L'étude TROPIC a montré qu'il existait une amélioration de la survie globale avec le cabazitaxel contre une autre molécule de chimiothérapie qu'est le mitoxantrone (15,1 mois versus 12,7 mois). Le cabazitaxel est donc le premier traitement à démontrer un bénéfice de survie pour les patients résistants à l'hormonothérapie et au docetaxel (Long et al., 2011).

➤ Les nouvelles molécules en cours de développement

Actuellement, un effort considérable est réalisé afin de trouver de nouvelles molécules thérapeutiques permettant de traiter les patients résistants à l'hormonothérapie. Ainsi, de nouveaux anti-androgènes sont actuellement en cours de développement. Parmi ceux ci, la molécule EPI-001 est le premier anti-androgène ciblant la partie N-terminale du RA (Sadar, 2011). Cette molécule a été identifiée à partir d'un screening d'une librairie d'extraits d'éponges marines pour l'inhibition de l'activation du RA. EPI-001 interagit avec la partie AF-1 du RA, inhibe son interaction avec des cofacteurs tels que CBP et réduit l'interaction avec les éléments de réponse aux androgènes. En conséquence, cette molécule bloque la prolifération dépendante des androgènes et est associée à une réduction du volume de tumeurs résistantes à la castration *in vivo* (Andersen et al., 2010). De façon très intéressante, EPI-001 et ses analogues sont capables d'inhiber l'activité des variants constitutifs du RA

contrairement aux médicaments actuellement utilisés comme le bicalutamide ou l'enzalutamide (Myung et al., 2013).

L'anti-androgène ARN-509 (Janssen Research & Development, LLC), capable d'inhiber la translocation nucléaire du RA, d'empêcher son recrutement au niveau des éléments de réponse et d'interférer avec le recrutement de cofacteurs, est actuellement en cours d'étude dans un essai clinique de phase III. Aussi, d'autres molécules comme AZD3514 (AstraZeneca), qui inhibe la translocation du RA et diminue son expression, EZN-4176, un oligonucléotide anti-sens induisant la dégradation de l'ARN messenger du RA ou encore ODM-201 (Orion Corporation), un nouvel anti-androgène de haute affinité inhibant la translocation nucléaire, sont actuellement analysées dans des essais cliniques de phase I et II (Agarwal et al., 2014; Wong et al., 2014).

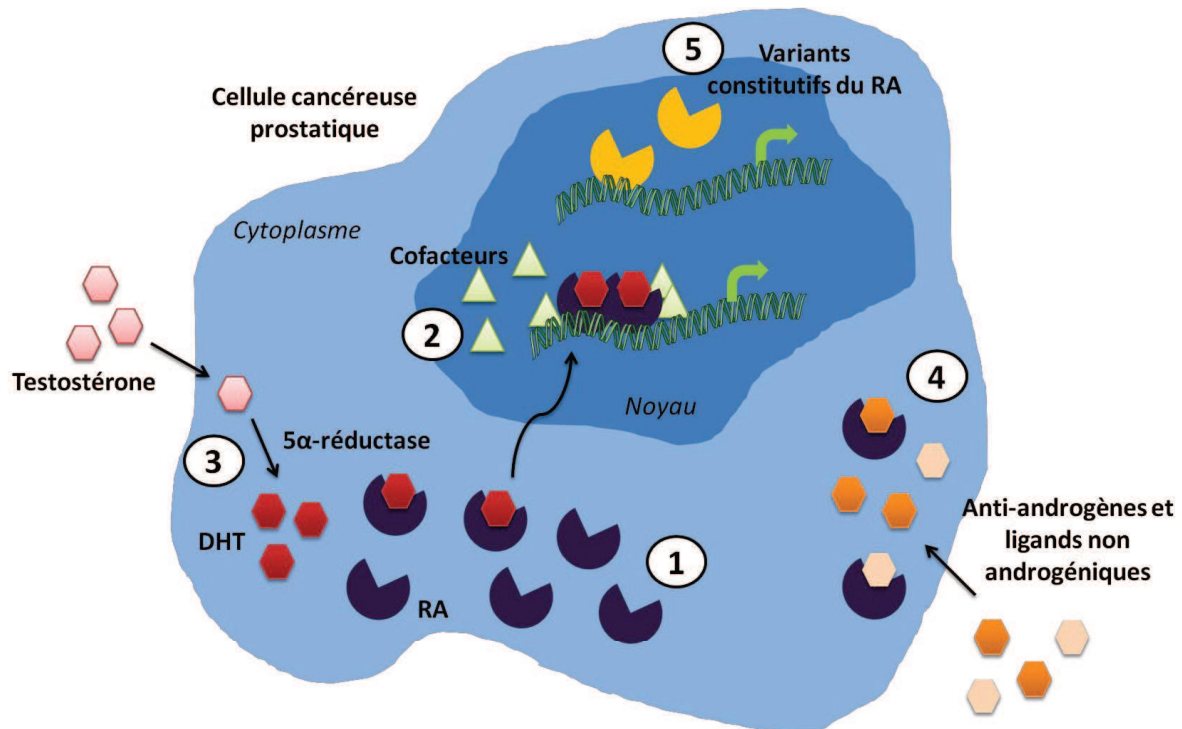
Aussi, de nouveaux inhibiteurs de la synthèse des androgènes ont été développés tels que l'Orteronel (TAK-700), la Galeterone (TOK-001) ou le VT-464 et sont actuellement en cours d'étude dans divers essais cliniques (Figure 25) (Agarwal et al., 2014; Stein et al., 2014; Wong et al., 2014).

### **III. Les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie**

Bien que le traitement par hormonothérapie soit efficace pendant 12 à 18 mois, les patients rechutent inévitablement et progressent vers un cancer de la prostate résistant à la castration (CRPC). La résistance à la castration se caractérise par une croissance de la tumeur malgré de faibles taux d'androgènes. De nombreux mécanismes liés à cette résistance ont été décrits à ce jour et incluent des événements directement associés à la voie de signalisation du RA et des événements impliquant d'autres voies de signalisation.

#### **1. Les mécanismes de résistance liés au RA**

L'augmentation du taux de PSA observée chez les patients résistants à la castration témoigne d'un mécanisme de réactivation de la voie de signalisation du RA (Figure 26).



**Figure 26: Mécanismes de résistance à la castration liés au RA**

Lors de la résistance à la castration, la voie de signalisation du RA est réactivée par divers mécanismes : **1.** Amplification et surexpression du RA; **2.** Altération du niveau d'expression des cofacteurs; **3.** Augmentation de la concentration d'androgènes intra-tumorale et surexpression des enzymes clés de la biosynthèse des androgènes; **4.** Mutations ponctuelles du RA conférant de nouvelles capacités de liaison à des anti-androgènes ou à des ligands non androgéniques. **5.** Expression de variants constitutivement actifs du RA.

L'un des mécanismes associé au CRPC est l'amplification et la surexpression du RA. Ces altérations conduisent à une sensibilité accrue de la voie de signalisation du RA malgré de très faible taux d'androgènes (Karantanos et al., 2013). Il est important de noter que la surexpression du RA n'est pas toujours associée à une augmentation du nombre de copies du gène du RA, attestant de mécanismes alternatifs aboutissant à cette surexpression (Chen et al., 2004). De plus, les amplifications sont très rares dans les cancers de la prostate hormono-naïfs et sont seulement retrouvées dans environ 20 % des tumeurs résistantes à la castration (Edwards et al., 2003a). Ainsi, ces résultats suggèrent que dans 80% des cas, un mécanisme autre que l'amplification du RA est à l'origine de la résistance à la castration.

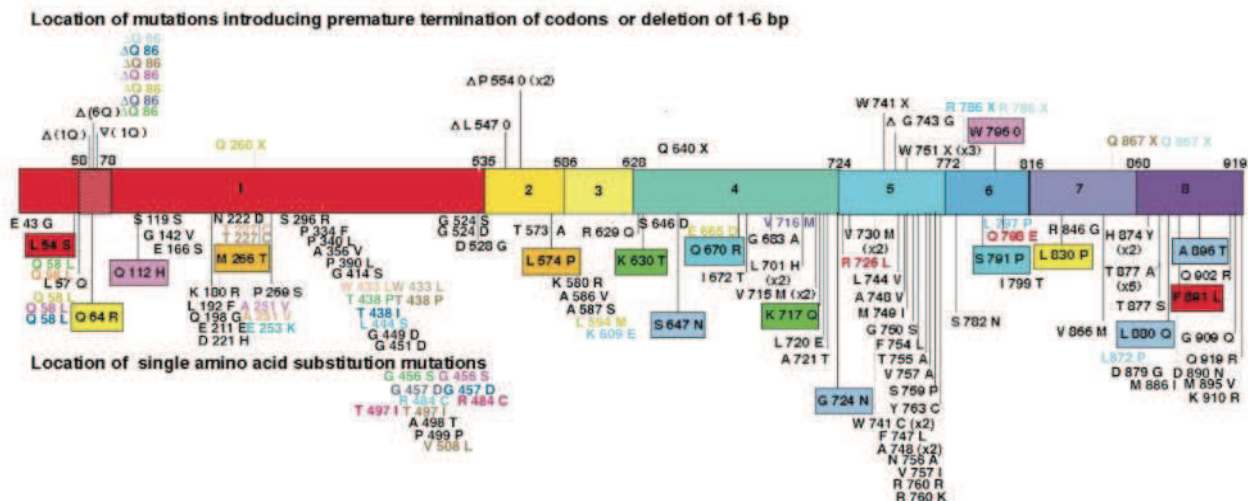
Comme mentionné précédemment, l'activité du RA est fortement dépendante de son interaction avec des cofacteurs. Ainsi, il a été rapporté qu'une altération du niveau d'expression des coactivateurs du RA pourrait être à l'origine des CRPC. Une analyse réalisée à partir d'échantillons de patients ayant un CRPC révèle une expression plus importante des

coactivateurs SRC-1 et SRC-2 comparée à des tumeurs androgéno-dépendantes (Gregory et al., 2001). De plus, SRC-2 est induit lors de la déprivation androgénique et active les voies de signalisation PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/AKT et MAPK pour conduire au développement de CRPC (Qin et al., 2014).

Bien qu'un effondrement du taux de DHT dans le sérum de patients traités par castration médicale ait été décrit, celui-ci reste toutefois important au sein du tissu prostatique (Nishiyama et al., 2004). De plus, la concentration en testostérone est plus élevée dans des métastases de patients résistants à la castration comparée à des tumeurs localisées de patients non traités par hormonothérapie. (Montgomery et al., 2008). Ainsi, ces données suggèrent qu'il existe un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses prostatiques sont capables de produire des androgènes *de novo* leur conférant ainsi une résistance au traitement hormonal (Ripert et al., 2013). L'un des mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses à la déprivation androgénique est la synthèse d'androgènes à partir de précurseurs surrénaliens. La HSD3B2 majoritairement exprimée dans les glandes surrénales et les testicules convertit la DHEA en androstènedione. Une surexpression de cette enzyme a été observée dans des CRPC, augmentant ainsi le niveau d'androstènedione disponible. De plus, une augmentation de l'enzyme AKR1C3 (aldo-keto reductase family 1, member C3), impliquée dans la conversion de l'androstènedione en testostérone, et de la 5 $\alpha$ -réductase de type I (SRDA1 ((steroid 5 $\alpha$ -reductase type I)) a été également décrite. Ainsi, l'ensemble de ces surexpressions enzymatiques révèlent un mécanisme possible par lequel la concentration d'androgènes intra-tumorale est augmentée lors de l'échappement hormonal (Stanbrough et al., 2006). Par ailleurs, les cellules cancéreuses résistantes à la castration favoriseraient une autre voie de biosynthèse de la DHT où l'androstènedione est préférentiellement convertie en 5 $\alpha$ -dione par la 5 $\alpha$ -réductase de type I, laquelle conduit ensuite à la production de DHT (Chang et al., 2011b). Aussi, une surexpression de l'enzyme clé CYP17 pourrait conférer un mécanisme de résistance à l'acétate d'abiratéron (Mostaghel et al., 2011).

En réponse au traitement par castration, le RA est la cible de mutations « gain de fonction » aboutissant à un récepteur plus sensible et/ou capable de lier un plus large panel de ligands (Bergerat and Céraline, 2009; Devlin and Mudryj, 2009). L'apparition de telles mutations au sein du RA est un événement rare. Cependant, l'utilisation d'antagonistes du RA augmente l'incidence de ces mutations sans doute par une pression de sélection induite

par le traitement (Taplin et al., 1999). Ces mutations sont détectées dans 10 à 30 % des patients atteints de CRPC (Devlin and Mudryj, 2009). A ce jour, de nombreuses mutations ont été décrites tout au long du gène codant pour le RA (Figure 27). Toutefois, la grande majorité de ces mutations se trouve au niveau du domaine de liaison du ligand ou au niveau des sites d'interaction avec les cofacteurs (partie N-terminale et C-terminale) (Bergerat and Céraline, 2009; Karantanos et al., 2013).



**Figure 27 : Ensemble des mutations décrites au sein du gène codant pour le RA.**

Les mutations qui sont illustrées dans la même couleur ont été découvertes au sein du même échantillon tumoral. Ce schéma illustre l'ensemble des mutations décrites en 2010 ; depuis de nouvelles mutations ont été rapportées. D'après <http://androgendb.mcgill.ca>

Des mutations ponctuelles dans la partie NTD pourraient moduler les capacités de transactivation du récepteur en altérant son interaction avec les cofacteurs. Les mutations G142V (Glycine → Valine) ou D221H (Asparagine → Histidine) localisées au niveau de la région TAU-1 ont été identifiées dans des échantillons de CRPC. Le RA porteur de ces mutations expose des propriétés de transactivation à 2nM de DHT plus importantes que le RA sauvage. Toutefois, ces mutants présentent des activités de transactivation similaires au récepteur sauvage lorsque les coactivateurs SRC-2, CBP ou p300 sont surexprimés (Chen et al., 2005). Ainsi, les mécanismes conduisant à cette augmentation d'activité transcriptionnelle ne sont pas encore élucidés.

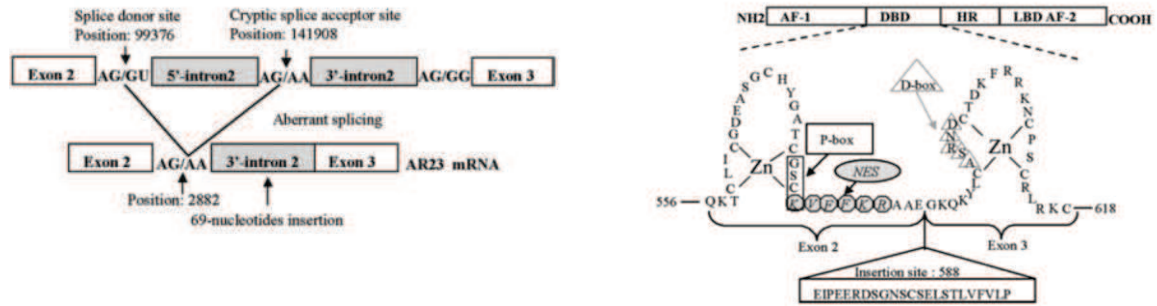
Au laboratoire, un double-mutant du RA portant les mutations T575A et T877A (Thréonine → Alanine) a été isolé chez un patient résistant à la castration. La mutation T575A est localisée au niveau du DBD juste avant de la P-Box. Il a été montré que le RA porteur de cette mutation présente une altération pour la liaison à ses éléments de réponse spécifiques. Toutefois, il expose une capacité de liaison à des éléments de réponse non

spécifiques du RA plus importante comparée à un récepteur sauvage (Monge et al., 2006). La mutation T877A a été décrite dans les cellules LNCaP et dans des cancers de la prostate avancés. Cette mutation localisée au niveau du LBD permet au RA d'être activé en réponse au cortisol, à la 17 $\alpha$ -hydroxy-progestérone mais aussi à l'hydroxyflutamide, un anti-androgène (Gaddipati et al., 1994; Veldscholte et al., 1990). La mutation T877A conduit à une altération de la structure conformationnelle du RA lors de la liaison de l'hydroxyflutamide empêchant alors le recrutement du complexe corépresseur NCoR (Berrevoets et al., 2004). Ainsi, le RA T575A/T877A a une double fonction dans les CRPC puisqu'il peut être activé par une variété de ligands et interagir avec des éléments de réponse non spécifiques du RA (Monge et al., 2006).

De nombreuses autres mutations ponctuelles dans le LBD ont été décrites à ce jour, et sont responsables de résistances aux différents anti-androgènes. Par exemple, la mutation F876L (Thréonine  $\rightarrow$  Phénylalanine) confère une résistance aux nouvelles thérapies comme l'enzalutamide et l'ARN-509 (Joseph et al., 2013; Korpai et al., 2013). De plus, cette mutation a été détectée dans de l'ADN circulant de patients participant à l'essai clinique de phase I pour l'ARN-509. Ces mutations n'étaient pas observées dans les échantillons de sérum avant traitement suggérant que les mutations pourraient soit apparaître *de novo* pendant le traitement ou qu'elles étaient sous le seuil de détection au début de l'essai clinique (Joseph et al., 2013). Ainsi, sous l'effet de telles mutations, les anti-androgènes deviennent de véritables agonistes.

De plus, certaines mutations ont un impact sur le recrutement des cofacteurs. En effet, en présence de DHT, les mutations E872Q (Acide Glutamique  $\rightarrow$  Glutamine) et M886I (Méthionine  $\rightarrow$  Isoleucine) potentialise l'activité transcriptionnelle du RA lorsque les coactivateurs SRC-2 et CBP sont surexprimés (Chen et al., 2005).

Au laboratoire, nous avons également détecté, à partir de métastases osseuses d'un patient résistant à la castration, un variant du RA, nommé AR23, contenant une insertion de 23 acides aminés dans le DBD entre les deux doigts de zinc. Cette insertion résulte d'un épissage alternatif aberrant conduisant à la rétention de 69 nucléotides entre l'exon 2 et l'exon 3 (Figure 28).



**Figure 28: Représentation schématique de l'ARNm et de la protéine du récepteur AR23**

AR23 résulte d'une rétention de 69 nucléotides issue d'un épissage aberrant entre un site donneur 5' AG/GU et un site cryptique accepteur 3'AG/AA. La séquence nucléotidique insérée correspond à la partie 3' de l'intron 2. Cet ARNm ainsi produit code pour une protéine avec une insertion de 23 acides aminés entre les deux doigts de zinc en position 508 (Jagla et al., 2007).

Ce variant démontre des propriétés de translocation altérée puisqu'il est localisé dans le cytoplasme malgré une stimulation avec la DHT. Toutefois, de façon inattendue, dans les cellules LNCaP stimulées par la DHT, ce variant n'est pas transloqué dans le noyau, forme des agrégats cytoplasmiques et est capable d'activer deux promoteurs sensibles au RA, le MMTV-LTR et celui du gène du PSA. Ainsi, l'AR23 pourrait coopérer avec le RA endogène des cellules LNCaP pour induire la transcription de ses gènes cibles (Jagla et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, l'AR23 augmente l'activité transcriptionnelle du RA sauvage dans un modèle de co-expression (Steinkamp et al., 2009). Aussi, le récepteur AR23 est capable d'induire l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells) et au contraire de diminuer l'activité transcriptionnelle de AP-1 (Activator protein 1) (Jagla et al., 2007). De plus, en présence de l'AR23, le récepteur sauvage est moins inhibé par le bicalutamide ou l'hydroxyflutamide (Steinkamp et al., 2009). Bien que le mode d'action de ce variant n'est pas clairement élucidé, ces résultats suggèrent qu'il expose des activités cytoplasmiques non génomiques et pourrait fonctionner comme un leurre lors du traitement par castration (Bergerat and Céraline, 2009; Steinkamp et al., 2009).

Enfin, l'expression de variants constitutivement actifs du RA représente un mécanisme important d'échappement au traitement hormonal. Il s'agit de récepteurs dépourvus de leur partie C-terminale contenant le LBD et la deuxième fonction de transactivation AF-2 (Figure 29). Au laboratoire, nous avons identifié un grand nombre de mutations non sens, principalement dans l'exon 4 du RA, conduisant à l'apparition d'un codon STOP prématuré. Par exemple, dans le récepteur AR Q640X, la Glutamine en position 640 est remplacée par un

codon STOP conduisant à une protéine tronquée à la fin de la zone charnière (Bergerat and Céraline, 2009; Céraline et al., 2004; Lapouge et al., 2007; Marcias et al., 2010). Plus récemment, des épissages alternatifs avec rétention de séquences introniques aboutissant à des transcrits courts ou longs ont été décrits comme étant un second mécanisme à l'origine des variants constitutifs du RA. L'un des transcrits les plus étudiés est le récepteur AR-V7 qui possède les exons 1, 2, 3 et une nouvelle séquence exonique cryptique dérivée de l'intron 3, aboutissant alors à une insertion de 16 acides aminés dans la partie C-terminale de la protéine (Dehm et al., 2008; Guo et al., 2009; Hörnberg et al., 2011; Hu et al., 2009, 2011; Marcias et al., 2010; Sun et al., 2010; Watson et al., 2010). Les mécanismes conduisant à cet épissage alternatif aberrant ne sont pas encore clairement élucidés. Cependant, il a été proposé que des délétions intragéniques du RA sont à l'origine d'un épissage altéré (Li et al., 2011, 2012). Par exemple, une délétion de 48kb dans l'intron 1 du gène du RA dans les cellules cancéreuses prostatiques CWR-R1 est associée à une expression importante du variant AR-V7 (Li et al., 2012). De plus, une surexpression ou une modification du recrutement de facteurs d'épissage comme hRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1), U2AF65 (U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 2) et ASF/SF2 (splicing factor 2 / alternative splicing factor) pourraient être à l'origine des variants d'épissage (Liu et al., 2014b; Nadiminty et al., 2015).



**Figure 29 : Exemple de variants constitutivement actifs du RA.**

Le récepteur AR Q640X est un exemple de mutations non sens retrouvées dans des échantillons de métastases osseuses de patients en échappement hormonal. Les épissages alternatifs conduisent à des transcrits courts comme le récepteur AR-V7 ou AR3, ou à des transcrits longs comme le récepteur AR-V6. Dans tous les cas, un codon STOP apparaît prématurément.

De plus, un clivage du récepteur entier (AR-FL) par la calpaïne 2, une protéase dépendante du calcium, pourrait conduire à l'expression de variants constitutivement actifs du RA. En effet, le traitement des cellules cancéreuses prostatiques 22RV1 avec de la calpaïne 2 résulte en une diminution de l'AR-FL et une augmentation des variants constitutifs (Libertini et al., 2007). En accord avec ce mécanisme, le niveau d'expression de la calpaïne 2 est plus élevé dans des cancers de la prostate métastatiques comparé à des cancers localisés (Mudryj and Tepper, 2013).

Ces variants sont d'ores et déjà exprimés dans des tumeurs primaires mais leur expression est augmentée dans des métastases osseuses dérivées de patients résistants à la castration (Hörnberg et al., 2011). De plus, l'expression de ces variants dans les CRPC est aussi associée à une résistance aux nouvelles thérapies comme l'enzalutamide et l'acétate d'abiratéron (Antonarakis et al., 2014; Li et al., 2013; Mostaghel et al., 2011; Nadiminty et al., 2013).

Ces variants jouent un rôle très important dans la résistance à la castration de part leur localisation exclusivement nucléaire en absence de ligand et leur activité transcriptionnelle ligand indépendante. Aussi, ils soutiennent la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* et *in vivo* dans un environnement appauvri en androgènes (Guo et al., 2009).

Ces variants constitutifs du RA stimulent l'expression de gènes cibles canoniques du RA tels que le PSA. De plus, ils sont capables d'induire un profil transcriptionnel qui leur est propre indépendamment d'un récepteur sauvage. Notamment, le récepteur AR-V7 régule un ensemble de gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme le gène UBE2C (Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2C) intervenant dans la dégradation des cyclines mitotiques (Hörnberg et al., 2011; Hu et al., 2012). Il semblerait que la régulation des gènes cibles canoniques du RA par les variants nécessite une hétérodimérisation entre les variants et l'AR-FL. Au contraire, les variants contrôlent l'expression de leurs gènes cibles en s'homodimérisant entre eux ou en s'hétérodimérisant avec une autre forme de variant (Xu et al., 2015). Toutefois, certains variants d'épissage tels que l'AR-V1 et l'AR-V9 nécessitent la présence de l'AR-FL pour exercer leur activité transcriptionnelle (Lu and Luo, 2013).

Comme pour le récepteur sauvage, l'activité transcriptionnelle des variants est étroitement régulée par des cofacteurs. La protéine Vav3, une Rho-GTPase GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor), est un coactivateur connu du RA sauvage et est souvent surexprimée dans les CRPC. Cette protéine peut interagir avec le variant AR-V7 et augmenter

son activité transcriptionnelle. De plus, Vav3 contrôle positivement la translocation nucléaire de l'AR-V7 (Peacock et al., 2012). Aussi, le corépresseur FOXO1 (Forkhead Box O1) lie l'AR-V7 via son domaine TAU-5 et inhibe son activité. En phosphorylant FOXO1, la kinase AKT conduit à son export nucléaire, relevant ainsi l'inhibition de l'activité transcriptionnelle du variant AR-V7 induite par FOXO1 (Chan and Dehm, 2014; Mediwala et al., 2012). Par ailleurs, phospho-MED1 (Mediator Complex Subunit 1) et FOXA1 sont des médiateurs clés de la régulation des gènes par l'ARv567<sup>es</sup>. En effet, phospho-MED1, FOXA1 et ARv567<sup>es</sup> forment un complexe au niveau des régions "enhancers" et promotrices de UBE2C résultant à la formation d'une boucle d'ADN et à l'induction de la transcription du gène UBE2C (Liu et al., 2014a).

Enfin, en plus d'exercer des effets au sein de la cellule qui les exprime, les variants constitutifs du RA démontrent aussi des actions paracrines. En effet, des expériences de co-cultures ont montré que l'expression du récepteur AR Q640X dans les cellules LNCaP stimule la sécrétion de facteurs solubles capables d'induire la translocation du récepteur endogène des cellules LNCaP avoisinantes non transfectées (Lapouge et al., 2007). Cependant, les facteurs conduisant à cet effet n'ont pas encore été identifiés.

## **2. Intercommunication du RA avec d'autres voies de signalisation**

Comme mentionné précédemment, le RA est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles capables de réguler son activité. Les CRPC ont été associés notamment à des altérations affectant l'état de phosphorylation du récepteur (Karantanos et al., 2013). En effet, plusieurs kinases connues pour phosphoryler le récepteur sont surexprimées ou ont une activité augmentée dans des tumeurs résistantes à la castration.

Parmi celle-ci, la kinase Src expose une activité élevée dans les CRPC. En réponse à des facteurs de croissance comme l'EGF, la kinase Src phosphoryle le RA au niveau de la tyrosine 534 (Y534) ce qui favorise ainsi sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle en absence d'androgènes (Guo et al., 2006).

Par ailleurs, la tyrosine kinase Etk est surexprimée dans des CRPC et son expression a été corrélée à un niveau de phosphorylation important du RA. Cette kinase est capable de stabiliser le RA en empêchant son interaction avec Mdm2 et donc sa dégradation par le protéasome (Dai et al., 2010).

De plus, en réponse à l'interleukine 6 (IL-6), la tyrosine kinase Fer phosphoryle et interagit avec le RA au niveau de la tyrosine 223 résultant ainsi à une augmentation de son

activité transcriptionnelle (Rocha et al., 2013). Le niveau d'expression de l'IL-6 étant important dans les CRPC, ces données suggèrent que la voie IL-6/Fer/RA pourrait être un mécanisme conduisant à l'échappement hormonal (Drachenberg et al., 1999).

Dans le cancer de la prostate, la voie PI3K/AKT est dérégulée dans 42% des cancers localisés et 100% des cancers avancés, ce qui suggère que des altérations de cette voie de signalisation seraient aussi un prérequis au développement de CRPC (Edlind and Hsieh, 2014). L'implication de cette voie dans les CRPC a été confirmée dans un modèle de souris PTEN<sup>loxp/loxp</sup>; PB-Cre4 conduisant à une délétion de PTEN restreinte à la prostate. La délétion de PTEN dans ce modèle murin récapitule les différentes étapes de la progression du cancer de la prostate observées chez l'homme. La castration de ces souris à 16 semaines, lorsqu'un adénocarcinome invasif est déjà formé, conduit très rapidement à une diminution du nombre de cellules cancéreuses par apoptose. Cependant, après 10 semaines de castration, un nombre important de cellules cancéreuses avec un fort index mitotique et exprimant le RA persiste (Wang et al., 2003). Des études approfondies ont ensuite montré que le RA est nécessaire au développement des CRPC induits par la perte de PTEN, suggérant qu'il existe une interconnexion entre la voie PI3K/AKT et le RA (Jiao et al., 2007). Par ailleurs, le blocage de la voie PI3K/AKT dans les modèles de délétion de PTEN ne conduit que partiellement à une diminution de la croissance tumorale des CRPC. En revanche, l'inhibition simultanée de la voie PI3K/AKT et MAPK/ERK supprime efficacement la croissance des CRPC (Jia et al., 2013).

L'ensemble de ces données montre qu'il existe de nombreuses interconnexions entre le RA et d'autres voies de signalisation permettant aux cellules cancéreuses prostatiques de s'adapter à un environnement appauvri en androgènes.

### **3. Autres mécanismes de résistance à l'hormonothérapie**

Dans les CRPC, les cellules cancéreuses activent également des mécanismes indépendants de la voie de signalisation du RA pour soutenir leur croissance tumorale. A ce jour, de nombreuses études se sont focalisées sur ces mécanismes et seulement quelques exemples seront traités dans cette partie.

Une surexpression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans des xénogreffes de cancer de la prostate résistantes à l'enzalutamide et à l'ARN-509 a été mise en évidence. De plus, une analyse du niveau d'expression du GR dans des métastases osseuses de patients traités par l'enzalutamide a montré une corrélation entre ce récepteur et la réponse clinique au traitement (Arora et al., 2013). Par ailleurs, des études de ChiP-sequencing ont révélé que le GR et le RA ont des sites de liaison à l'ADN qui se chevauchent et sont capables de réguler un ensemble de gènes communs (Arora et al., 2013; Sahu et al., 2013). Aussi, ces études ont confirmé que le GR est capable de contourner l'inhibition du RA induite par l'enzalutamide en induisant un programme transcriptionnel en partie similaire au RA. Enfin, la surexpression du GR lors de la déprivation androgénique résulte d'une boucle d'auto-régulation négative entre les deux récepteurs (Arora et al., 2013).

La surexpression de protéines anti-apoptotiques tels Bcl-2 ou la clustérine a été associée à la résistance à la castration (Katsogiannou et al., 2015). De plus, la protéine chaperonne Hsp27 est surexprimée dans les CRPC et protège les cellules cancéreuses de l'apoptose induite par la déprivation androgénique (Rocchi et al., 2004, 2005). Notamment, la protéine Hsp27 exerce son rôle cytoprotecteur en interagissant avec des partenaires tels que TCTP (translationally controlled tumor protein) ou eIF4E (eukaryotic translational initiation factor) et empêchent ainsi leur dégradation par le protéasome (Andrieu et al., 2010; Baylot et al., 2012). L'expression de TCTP est associée à une diminution de p53 suggérant que la résistance à l'apoptose induite par la castration est en partie liée à la perte de p53 (Baylot et al., 2012). La protéine eIF4E lie les ARN messagers lors de l'initiation de la traduction et permet le bon positionnement du ribosome au niveau de l'extrémité 5' des ARN messagers. Ainsi, en interagissant avec eIF4E, Hsp27 protège le processus d'initiation de la traduction protéique et favorise la survie cellulaire (Andrieu et al., 2010).

Des altérations de l'expression des oncogènes ou suppresseurs de tumeurs confèrent également une résistance à la thérapie hormonale. Par exemple, 77% des CRPC présentent une augmentation du nombre de copies de l'oncogène c-myc, impliqué dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Nupponen et al., 1998). Aussi, la fréquence des tumeurs ayant une amplification de c-myc est augmentée suite au traitement par hormonothérapie (Kaltz-Wittmer et al., 2000).

La surexpression de c-myc dans des cellules cancéreuses prostatiques permet de contourner l'effet des anti-androgènes et conduire à la prolifération de ces cellules indépendamment du RA (Bernard and Pourtier-Manzanedo, 2003). De plus, des altérations des suppresseurs de tumeurs PTEN, p53 ou encore RB1 ont été également associées au CRPC (Kaltz-Wittmer et al., 2000; Katsogiannou et al., 2015).

L'adaptation des cellules cancéreuses prostatiques à la déprivation androgénique se caractérise par un profil d'expression génique particulier pouvant être régulé par les miRNAs. De plus en plus d'études ont montré une implication des miRNAs dans les CRPC. En effet, l'acquisition d'un phénotype androgéno-indépendant dans les cellules LNCaP est associée à une dérégulation d'un panel de miRNAs capables de contrôler l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la survie de ces cellules (Ottman et al., 2014). MiR-19a est surexprimé dans des lignées cellulaires androgéno-indépendantes et dans des tissus humains de CRPC. En ciblant directement le suppresseur de tumeur BTG1 (B Cell Translocation Gene 1), miR-19a favorise la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques (Lu et al., 2015). La perte d'expression de miR-34a pourrait aussi contribuer à la résistance à la castration en favorisant la prolifération et la survie des cellules cancéreuses. En effet, miR-34a régule négativement l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que la cycline D1 ou CDK6 (cyclin dépendente kinase 6) et dans la survie tels que Bcl-2 (Katsogiannou et al., 2015; Thieu et al., 2014).

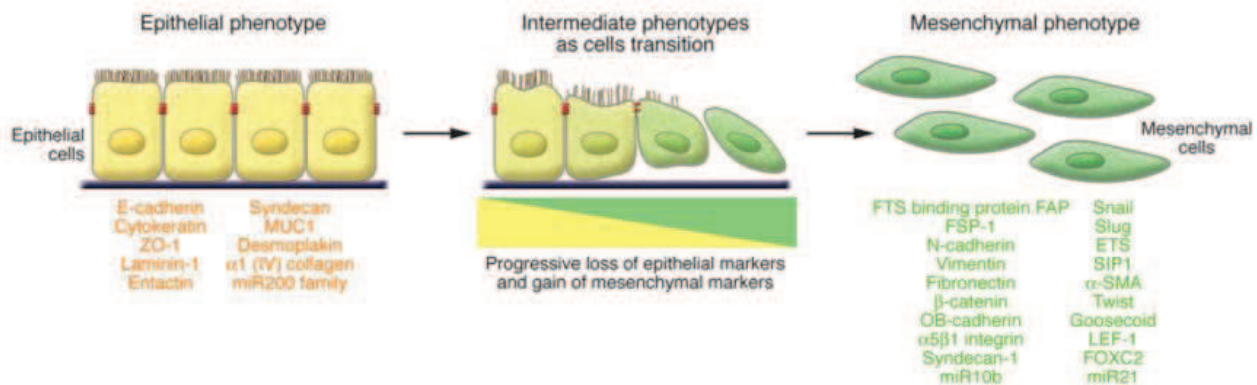
Dans la prostate saine, les cellules neuroendocrines représentent une population mineure indépendante des androgènes pour leur survie. Ainsi, il en découle que ces cellules ne sont pas affectées par la castration. L'acquisition d'un phénotype neuroendocrinien constitue donc un mécanisme de résistance aux thérapies hormonales. En effet, plusieurs études révèlent que la déprivation androgénique est associée à une différenciation neuroendocrine (Hirano et al., 2004; Ismail A et al., 2002). En accord avec ces données, une augmentation de marqueurs de cellules neuroendocrines tels que la chromogranine A et la tubuline-beta III est observée dans des CRPC (Nordin et al., 2013). L'implication des cellules neuroendocrines dans les CRPC n'est pas encore clairement définie. Cependant, ces cellules sécrètent des neuropeptides tels que la bombésine ou l'andromédulline capables d'agir de manière paracrine ou endocrine sur les cellules cancéreuses en activant la voie du signalisation du RA (Jongsma et al., 2000; Katsogiannou et al., 2015). Une différenciation

neuroendocrinienne a été trouvée dans 85,1% des patients avec un CRPC, témoignant l'importance de développer de nouvelles thérapies, telles que les analogues de la somatostatine, visant à cibler ces cellules (Matei et al., 2012).

#### **IV. La progression tumorale et transition épithélio-Mésenchymateuse (EMT)**

Lors de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent une morphologie et un profil d'expression génique et protéique spécifiques leur conférant des propriétés de migration et d'invasion et leur permettant de former des métastases à distance. Pour le cancer de la prostate, les sites privilégiés de métastases sont principalement les ganglions lymphatiques, les os, les poumons, le foie et les glandes surrénales (Bubendorf et al., 2000). L'analyse de ces métastases montre qu'elles sont pour la plupart très différenciées et ont une morphologie similaire à la tumeur primaire. Toutefois, la tumeur primaire et les métastases associées sont caractérisées par la présence de régions dédifférenciées, en particulier au niveau du front invasif. Cette dédifférenciation présente les caractéristiques d'une transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) (Brabletz, 2012).

Le terme d'EMT définit un switch entre un phénotype épithélial et un phénotype mésenchymateux. Les cellules épithéliales perdent donc leurs caractéristiques, à savoir l'adhésion des cellules entre elles et à la membrane basale ou leur polarité apico-basale pour acquérir les caractéristiques des cellules mésenchymateuses tels que la mobilité, l'invasion et la résistance à l'apoptose (Figure 30) (Polyak and Weinberg, 2009).

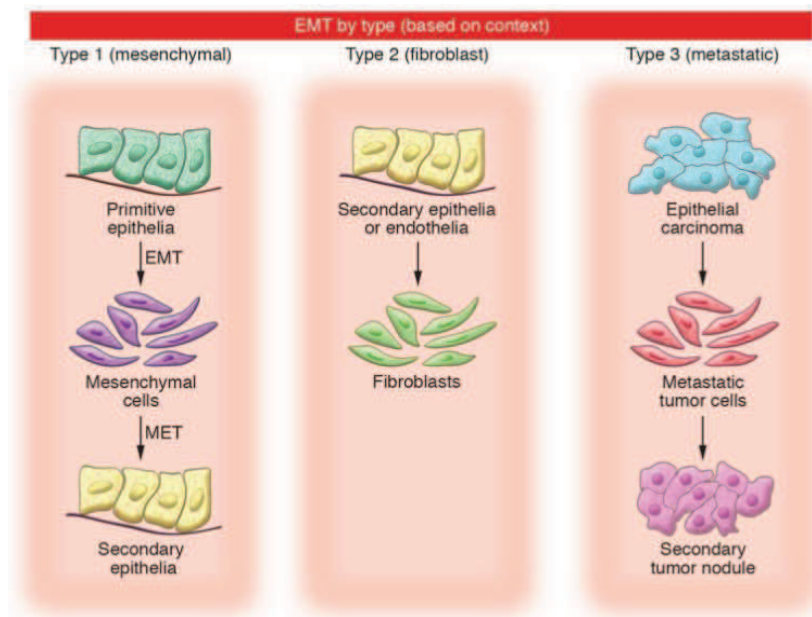


**Figure 30 : La transition Epithélio-Mésenchymateuse**

L'EMT implique une transition entre des cellules polarisées en cellules mésenchymateuses capables de motilité. Elle se caractérise par une perte des marqueurs épithéliaux (en orange) concomitante à une expression de marqueurs mésenchymateux (en vert). Certaines cellules ont un phénotype intermédiaire et co-expriment des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. Cette EMT, qualifiée de partielle, est observée lors de la régénération tissulaire et la progression tumorale. ZO-1: Zonula Occludens; MUC1: mucin 1, cell surface associated; FSP-1: Fibroblast-specific protein 1; SIP1: survival of motor neuron protein interacting protein 1; FOXC2: Forkhead box C2. (Kalluri and Weinberg, 2009)

L'EMT est un processus transitoire où les cellules, douées de plasticité cellulaire, peuvent retrouver leur phénotype épithélial via un processus de transition Mésenchymo-Epithélial (MET) (Kalluri, 2009). L'EMT est observée lors de l'embryogénèse, lors de la régénération tissulaire ou lors de la progression tumorale. Ainsi, il a été proposé de classer l'EMT en 3 sous-types basés sur le contexte biologique (Figure 31) (Kalluri and Weinberg, 2009; Zeisberg and Neilson, 2009).

## 1. Les différents sous-types d'EMT



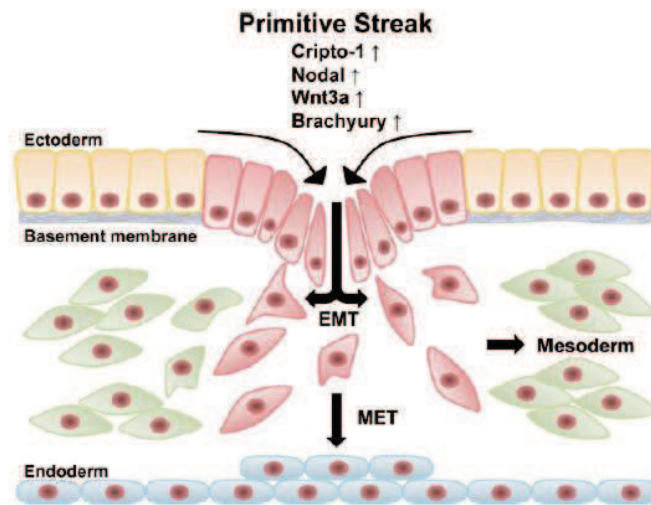
**Figure 31 : Représentation des 3 sous-types d'EMT**

L'EMT de type 1 est observée au cours de l'embryogénèse par exemple lors de la gastrulation ou lors de la migration des cellules de la crête neurale. L'EMT de type 2 apparaît quand des cellules épithéliales secondaires ou cellules endothéliales se différencient en fibroblastes capables de régénérer un tissu suite à une blessure. Enfin, l'EMT de type 3 intervient lors de la progression tumorale, où les cellules cancéreuses acquièrent un phénotype mésenchymateux leur permettant de migrer vers de nouveaux sites de métastases. Modifié d'après Zeisberg et al., 2009 (Zeisberg and Neilson, 2009)

### 1.1. L'EMT de type 1

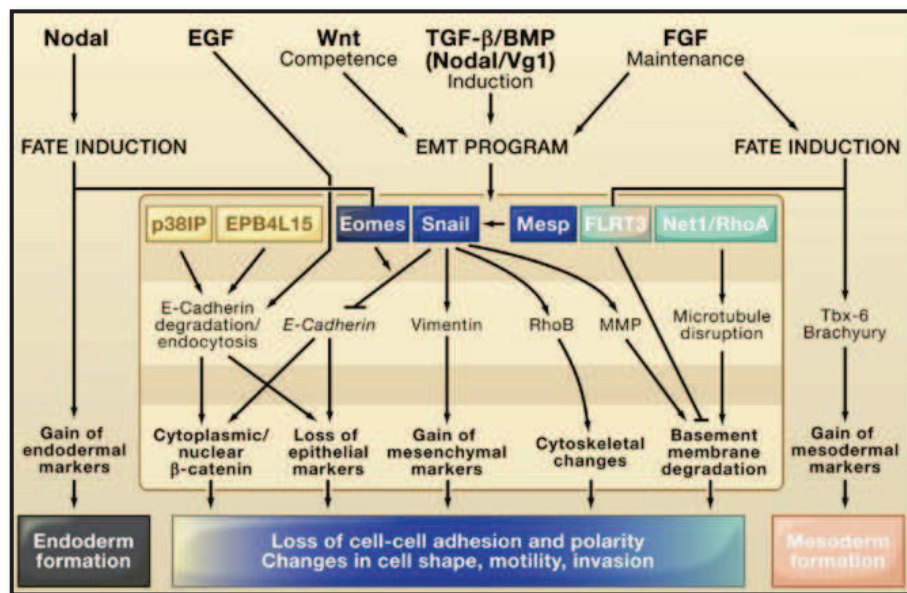
L'EMT de type 1 est observée chez l'embryon au cours de la gastrulation ou de la formation de la crête neurale par exemple. Des cellules épithéliales primitives subissent une transition en cellules mésenchymateuses motiles capables de générer un épithélium secondaire (Zeisberg and Neilson, 2009).

La gastrulation consiste en la mise place des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme). Au cours de ce processus, de nombreuses voies de signalisations sont activées afin de mettre en place un programme d'EMT conduisant en retour à des mouvements morphogénétiques et à la spécification cellulaire (Figure 32 et 33) (Thiery et al., 2009).



**Figure 32 :** Mise en place des 3 feuillet embryonnaires lors de la gastrulation.

En réponse à de nombreux signaux, les cellules de l'ectoderme au niveau de la ligne primitive subissent une EMT conduisant à la formation du mésoderme et de l'endoderme (Rangel et al., 2012).



**Figure 33:** Ensemble des voies de signalisation activées lors de la gastrulation.

(Thiery et al., 2009)

D'abord, une activation de la voie Wnt conduit à l'apparition de la ligne primitive, laquelle mène en retour à la formation des 3 feuillet embryonnaires (Kalluri and Weinberg, 2009). Ensuite, une expression du FGF et des membres de la famille du TGF- $\beta$  notamment Nodal et Vg1 contribue avec la voie Wnt à la mise en place d'un programme d'EMT au sein des cellules de l'ectoderme situées au niveau de la ligne primitive. Ainsi, ces cellules migrent

dans le tissu sous-jacent et conduisent à la formation du mésoderme et de l'endoderme via une MET (Rangel et al., 2012). Aussi, Nodal et le FGF interviennent respectivement dans la spécification de l'endoderme et du mésoderme. Durant la gastrulation, les facteurs de transcription SNAIL, Eomes (Eomesodermin) et Mesp1 et 2 (Mesoderm Posterior Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor 1 ou 2) sont des régulateurs clés de l'EMT. Notamment, SNAIL réprime l'expression de la E-cadhérine, un marqueur épithélial impliqué dans l'adhésion cellulaire, et induit l'expression de métalloprotéases (MMP) capables de dégrader la membrane basale. De plus, Net1 (Neuroepithelial Cell Transforming 1) en réprimant RhoA (Ras Homolog Family Member A) perturbe l'interaction entre les cellules de l'ectoderme au niveau de la ligne primitive et la membrane basale favorisant ainsi le processus d'invasion (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

Comme mentionné précédemment, les cellules de la crête neurale subissent également une EMT, et les voies de signalisation mises en jeu sont similaires à celles impliquées dans la gastrulation (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

En conclusion, au cours du développement, de nombreuses EMT successives sont nécessaires à la différenciation en types cellulaires spécialisés et à l'acquisition d'organes avec des structures tridimensionnelles complexes (Thiery et al., 2009).

### *1.2. L'EMT de type 2*

**L'EMT de type 2** a lieu lors d'une régénération tissulaire aussi bien physiologique comme la cicatrisation d'une blessure que pathologique comme la fibrose.

Le rôle de l'EMT lors de la fibrose est relativement bien étudié dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La fibrose résulte d'une accumulation et sécrétion importante de collagène par des myofibroblastes en réponse à une inflammation excessive. Des études de traçage ont mis en évidence que ces myofibroblastes proviennent en partie de cellules épithéliales ayant subi une EMT (Iwano et al., 2002). Toutefois, ils peuvent également dériver de la moelle osseuse, des cellules endothéliales via une transition endothélio-mésenchymateuse ou de fibroblastes résidents activés (Kalluri and Weinberg, 2009). Les voies de signalisation impliquée dans cette EMT sont similaires à celles observées lors de l'EMT de type 1 (Thiery et al., 2009). Dans des conditions inflammatoires, les macrophages et fibroblastes résidents activés sécrètent des facteurs tels que le TGF- $\beta$ , le PDGF (Platelet-derived growth factor), l'EGF ou le FGF-2. Sous l'influence de ces facteurs de croissance, les cellules épithéliales subissent une EMT qualifiée de partielle en raison de la

co-expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux au sein de la même cellule. Par ailleurs, les cellules inflammatoires sécrètent des MMP ce qui induit une dégradation de la membrane basale, favorisant ainsi la migration des cellules ayant subi l'EMT dans le tissu interstitiel. Une fois dans le tissu interstitiel, les cellules perdent l'ensemble des marqueurs épithéliaux restants pour finalement acquérir un phénotype totalement fibroblastique (Kalluri and Weinberg, 2009).

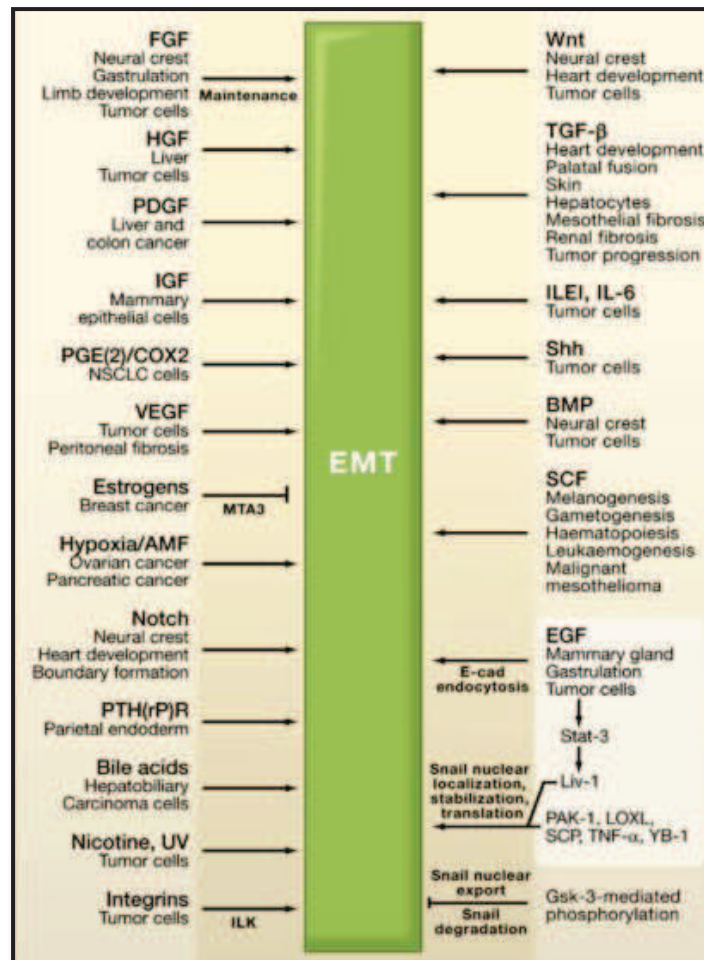
### *1.3. L'EMT de type 3*

**L'EMT de type 3** apparaît dans des cellules cancéreuses épithéliales qui acquièrent un phénotype mésenchymateux en vue de former des métastases à distance. Bien que l'EMT soit largement décrite dans des modèles cellulaires *in vitro*, sa pertinence en clinique a été largement débattue. Cependant, la mise en évidence de petits agrégats de cellules tumorales au niveau du front invasif qui s'étendent de la masse tumorale au tissu adjacent a confirmé l'existence de l'EMT au sein de tumeurs humaines (Prall, 2007). En effet, au niveau du front invasif de la tumeur primaire, se trouvent des cellules exprimant des marqueurs mésenchymateux tels que l' $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin), FSP-1 (Fibroblast specific protein 1), la vimentine et la desmine (Kalluri and Weinberg, 2009). Bien que certaines cellules subissent une EMT totale, d'autres co-expriment des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux témoignant d'une EMT partielle (de Herreros et al., 2010). L'EMT partielle permet le maintien d'une cohésion entre les cellules leur permettant de migrer collectivement alors qu'une EMT totale est en faveur d'une migration individuelle (Friedl and Wolf, 2003, 2010). En réponse à des signaux provenant du stroma comme l'EGF, le PDGF ou le TGF- $\beta$ , les cellules cancéreuses subissent l'EMT, pénètrent dans la circulation sanguine, quittent le flux sanguin et subissent le phénomène de MET leur permettant de former des micro- et macro-métastases à distance comparables histologiquement à la tumeur primaire (Kalluri and Weinberg, 2009).

## **2. Les voies de signalisation de l'EMT**

L'EMT est induite en réponse à une très grande variété de cytokines agissant, entre autre, à travers des récepteurs tyrosines kinases (RTK) ou sérine thréonine kinase, telles que le FGF, l'EGF ou le TGF- $\beta$  par exemple. Toutefois, d'autres ligands initiateurs de l'EMT conduisent à l'activation des voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, Hedgehog, NF- $\kappa$ B ou

Notch (Figure 34) (Thiery et al., 2009). L'ensemble de ces molécules activent de nombreuses voies de signalisation interconnectées les unes aux autres et conduisent à l'expression de régulateurs clés capables d'orchestrer le programme de l'EMT (Polyak and Weinberg, 2009).



**Figure 34:** Diversité des voies de signalisation impliquées dans la modulation des gènes de l'EMT.

(Thiery et al., 2009)

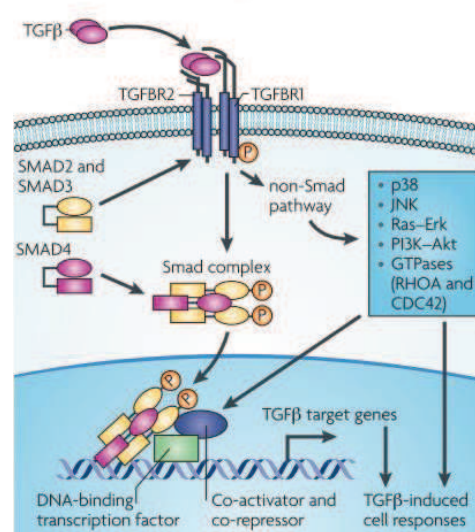
### 2.1. La voie de signalisation du TGF-β

L'une des voies de signalisation la mieux caractérisée dans l'induction de l'EMT est la voie du TGF-β. Le TGF-β exerce son action en se fixant à un complexe de récepteurs transmembranaires composé de deux hétérodimères TGFβR1/TGFβR2, ce qui conduit à l'activation de ce complexe par phosphorylation. Il s'ensuit l'activation de la voie SMAD-dépendante et SMAD-non dépendante (Figure 35).

L'activation de la voie SMAD-dépendante se caractérise par la phosphorylation des protéines R-SMAD, le plus souvent SMAD2 et SMAD3 par le TGFβR1. Une fois activées, SMAD2 et SMAD3 forment un complexe avec SMAD4 puis ce complexe est transloqué dans

le noyau. Le complexe ainsi formé coopère avec de nombreux facteurs de transcription pour induire l'expression de ses gènes cibles (Ikushima and Miyazono, 2010). En particulier, le complexe SMAD régule l'expression de SNAIL, un facteur de transcription clé de l'EMT, en interagissant avec ses éléments de réponse au niveau du promoteur. En induisant l'expression de SNAIL, le TGF- $\beta$  induit indirectement la diminution de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine (de Herreros et al., 2010).

De plus, le TGF- $\beta$  active la voie SMAD-indépendante, en contrôlant des voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT, la voie Ras-ERK, ou la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) par exemple (Ikushima and Miyazono, 2010).



**Figure 35:** *Voies de signalisation du TGF- $\beta$  SMAD-dépendante ou non dépendante.*  
(Ikushima and Miyazono, 2010)

Par ailleurs, le TGF- $\beta$  peut conduire à des modifications des propriétés d'adhésion cellulaire indépendamment d'une régulation nucléaire des gènes impliqués dans l'EMT. En effet, TGF $\beta$ RII peut phosphoryler la protéine Par6, un régulateur de la polarité cellulaire et des jonctions serrées. La protéine Par6 phosphorylée interagit avec l'ubiquitine E3 ligase Smurf1 (SMAD Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 1) ce qui favorise la dégradation de la protéine RhoA, et donc la dissolution des jonction serrées (Ozdamar et al., 2005).

Dans la prostate normale, le TGF- $\beta$ , sécrété par les cellules stromales, inhibe la croissance et induit la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. Cependant, à des stades avancés du cancer de la prostate, la sécrétion augmentée du TGF- $\beta$  par les cellules stromales conduit à la progression tumorale et à l'EMT en raison de l'activation constitutive

de certaines voies de signalisation comme la voie PI3K/AKT ou la voie RAS (Ao et al., 2006; Lawrence et al., 2007).

### *2.2. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine*

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine conduit à l'EMT par la stabilisation de la  $\beta$ -caténine notamment à travers l'inhibition de sa phosphorylation par la GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 beta). Il en résulte une augmentation du niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine, qui, une fois dans le noyau, conduit à la transcription de gènes impliqués dans l'EMT tels que SNAIL ou des MMP (Barbolina et al., 2011; Polyak and Weinberg, 2009). En particulier, dans le cancer de la prostate, l'inactivation de la GSK3 $\beta$  résulte de l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT due à la perte de PTEN (Lawrence et al., 2007). Aussi, une augmentation du niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine dans les cellules cancéreuses prostatiques peut résulter d'une stimulation par IGF-1 (Verras and Sun, 2005). Comme la  $\beta$ -caténine et la E-cadhérine appartiennent au même complexe jonctionnel, une perte de la E-cadhérine lors de l'EMT conduit alors à une accumulation de la  $\beta$ -caténine au sein de la cellule (Onder et al., 2008). La  $\beta$ -caténine ainsi libérée transloque dans le noyau et active ses gènes cibles. Ces données démontrent donc l'importance des interconnexions entre les différentes voies de signalisation pour maintenir le programme de l'EMT.

### *2.3. Autres voies de signalisation impliquées dans l'EMT*

La voie de signalisation Notch joue aussi un rôle dans l'EMT. Toutefois, dans la prostate, son implication dans l'EMT semble être dépendante du contexte. En effet, une surexpression de Notch-1 a été associée à une EMT dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 stimulées avec le PDGF-D (Kong et al., 2010). Au contraire, dans les cellules prostatiques normale RWPE-1, Notch-1 a un effet inhibiteur sur l'EMT (Bertrand et al., 2014).

Les voies de signalisation impliquant les RTK à travers la stimulation par l'EGF, l'IGF ou le FGF peuvent aussi conduire à l'EMT. De nombreuses altérations de ces voies de signalisation ont été mises en évidence dans divers cancers comme des activations constitutives des RTK, ou des surexpression de leur cytokine (Polyak and Weinberg, 2009). Ces modifications aberrantes pourraient ainsi contribuer à activer l'EMT.

Enfin, la voie Sonic Hedgehog est également impliquée dans l'EMT dans le cancer de la prostate (Yamamichi et al., 2014).

### 3. Profil d'expression associé à l'EMT

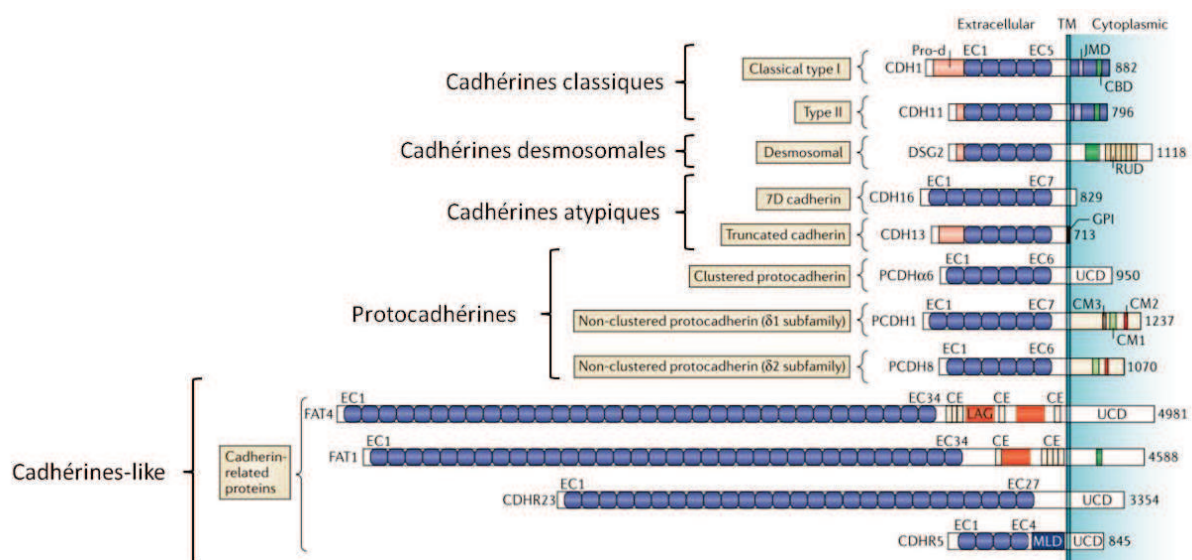
L'activation des voies de signalisation décrites ci-dessus conduit à l'expression de régulateurs clés de l'EMT comprenant des facteurs de transcription et des miRNAs. Ces derniers induisent ensuite des modifications du profil d'expression des protéines de surface et des protéines du cytosquelette notamment.

#### 3.1. Modifications des protéines de surface lors de l'EMT

L'EMT est caractérisée par une perte des jonctions inter-cellules et des jonctions avec la membrane basale.

##### ➤ Le switch des cadhérines

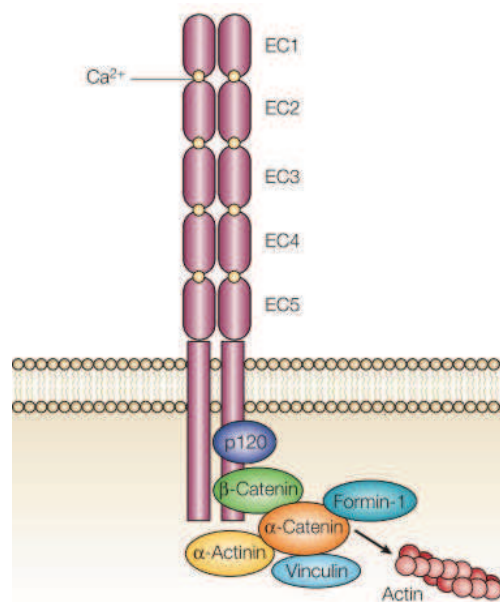
Les cadhérines constituent une large superfamille de molécules impliquées dans l'adhésion cellules-cellules (Figure 36).



**Figure 36:** Représentation des membres de la famille des cadhérines ayant une implication dans le cancer.

La superfamille des cadhérines est subdivisée en 5 groupes : les cadhérines classiques de type I et II, les cadhérines desmosomales, les cadhérines atypiques, les protocadhérines et les cadhérines-like (ou cadherin-related proteins). Modifié d'après van Roy, 2014. (Brasch et al., 2012; van Roy, 2014).

Les plus connues sont les cadhérines classiques qui établissent des jonctions homophiliques dépendantes du calcium et qui constituent les jonctions adhérentes (Gumbiner, 2005). Les cadhérines classiques sont des protéines transmembranaires qui forment des homodimères (Figure 37). Elles possèdent une partie extracellulaire organisée en 5 domaines répétés stabilisés entre eux par la liaison de 3 ions calcium (Brasch et al., 2012). La partie intracellulaire est liée à un complexe protéique contenant le caténine p120 qui interagit avec la partie supérieure du domaine cytoplasmique, la  $\beta$ -caténine qui lie la région distale et l' $\alpha$ -caténine. Cette dernière établit des liens avec le cytosquelette d'actine soit directement ou indirectement via l' $\alpha$ -actinine ou la vinculine (Gumbiner, 2005).



***Figure 37: Structure générale des cadhérines classiques***

La région extracellulaire des cadhérines classiques est constituée de 5 domaines répétés (EC domains : extracellular cadherin domains) qui sont liés ensemble par des ions calcium (cercles jaunes). La partie intracellulaire est complexée avec un certain nombre de protéines reliées au cytosquelette d'actine (Gumbiner, 2005).

L'une des modifications la mieux caractérisée lors de l'EMT est le switch des cadhérines impliquant une diminution de la E-cadhérine concomitante à une augmentation de la N-cadhérine (Zeisberg and Neilson, 2009). La E-cadhérine et la N-cadhérine sont deux cadhérines classiques, la première étant exprimée par les cellules épithéliales et la seconde par les cellules nerveuses, les cellules endothéliales ou les cellules mésenchymateuses (Derycke and Bracke, 2004; Gumbiner, 2005).

Dans la progression tumorale, ce switch des cadhérines est néanmoins largement débattu. En effet, une diminution de la E-cadhérine concomitante à une augmentation de la N-cadhérine a été observée dans des modèles de xénogreffes prostatique LAPC9 et LuCaP35 (Sun et al., 2012; Tanaka et al., 2010). Aussi, ce switch des cadhérines a été observé dans des échantillons métastatiques de cancer de la prostate (Tomita et al., 2000). Toutefois, dans certains modèles, l'expression de la E-cadhérine persiste malgré une augmentation de la N-cadhérine. En particulier, dans de tels modèles, il a été montré que la E-cadhérine présente une localisation cytoplasmique (McKeithen et al., 2010; Tiwari et al., 2013). De plus, bien qu'une augmentation de la N-cadhérine ait été décrite dans des biopsies de tumeurs prostatiques par Jennbacken et al., aucune modification de l'expression de la E-cadhérine n'a été observée (Jennbacken et al., 2010).

La perte de la E-cadhérine lors de l'EMT contribue à la déstabilisation des jonctions adhérentes et est associée à des propriétés migratoires et invasives. En effet, la réexpression de la E-cadhérine dans des cellules tumorales déficientes pour celle-ci induit un phénotype épithélial et diminue la migration des cellules qui l'expriment (de Herreros et al., 2010).

Le clivage de la partie extracellulaire de la E-cadhérine peut également contribuer à la progression tumorale. En effet, l'ectodomaine de la E-cadhérine est le substrat de nombreuses protéases tels que les MMP, les désintégrines protéases ADAM10 et ADAM15 (A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 10 ou 15) ou certaines kallikréines comme KLK6 et KLK7 (Kallikrein-Related Peptidase 6 et 7) (Berx and van Roy, 2009; Dittmer et al., 2009; Johnson et al., 2007; Najy et al., 2008a). Le clivage de la E-cadhérine par ADAM15 conduit à un fragment soluble capable d'interagir avec les récepteurs HER2 et HER3 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 ou 3) dans des cellules cancéreuses de sein. Cette interaction conduit à l'activation de la voie de signalisation ERK impliquée dans la prolifération et la migration cellulaire (Najy et al., 2008a). Une augmentation de l'expression de ADAM15 a été également mise en évidence lors de la progression du cancer de la prostate (Najy et al., 2008b). Par ailleurs, les fragments solubles de la E-cadhérine contribuent à augmenter la capacité invasive de cellules cancéreuses pancréatiques (Johnson et al., 2007). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que le clivage de la E-cadhérine favorise l'EMT en altérant les jonctions inter-cellules et contribue aussi à la progression tumorale en activant des voies de signalisation impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire.

La N-cadhérine, bien qu'exprimée physiologiquement par de nombreuses cellules, est un marqueur clé de la progression tumorale. En effet, elle est capable d'induire la migration et l'invasion des cellules cancéreuses qui l'expriment via des modifications du cytosquelette et la formation de lamellipodes (Hazan et al., 2000; Li et al., 2001). La fonction de la N-cadhérine dans l'invasion a été renforcée par une récente étude qui montre que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la N-cadhérine conduit à une diminution de l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* et *in vivo* (Tanaka et al., 2010). L'expression de la N-cadhérine dans les cellules cancéreuses favorise la migration vers un site secondaire par son habilité à former des liaisons homophiliques avec la N-cadhérine exprimée par les cellules du stroma et les cellules de l'endothélium par exemple (Berx and van Roy, 2009; van Roy, 2014). De plus, la N-cadhérine favorise la survie des cellules cancéreuses prostatiques et des mélanomes en activant la voie PI3K/AKT. En effet, la voie PI3K/AKT conduit à l'inactivation par phosphorylation de la protéine proapoptotique BAD (BCL2-associated agonist of cell death) et à l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (Li et al., 2001; Tran et al., 2002). Aussi, récemment, l'expression de la N-cadhérine a été associée à l'angiogenèse. Dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3, la N-cadhérine active la voie PI3K/AKT laquelle, en retour, induit l'expression de la molécule angiogénique MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Enfin, cette dernière conduit à la formation d'un réseau capillaire par les cellules endothéliales HMEC (Nalla et al., 2011). Finalement, la N-cadhérine semble également impacter la prolifération. Cependant, des études ont montré des effets opposés concernant celle-ci. D'abord, il a été rapporté que la N-cadhérine a un effet inhibiteur de la prolifération et est associée à une expression des inhibiteurs de CDK p21 et p27 (Derycke and Bracke, 2004). Au contraire, un modèle de souris conditionnel conduisant à la substitution de la E-cadhérine par la N-cadhérine au niveau de l'intestin est associé à la formation de lésions néoplasiques avec un fort index de prolifération (Libusova et al., 2010).

La N-cadhérine potentialise également la progression tumorale en agissant sur certaines voies de signalisation. Par exemple, en liant le récepteur FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), elle prévient son internalisation et maintient une activation permanente de cette voie (van Roy, 2014). Par ailleurs, le clivage de la N-cadhérine par des protéases pourrait stimuler la voie de signalisation du FGFR (Berx and van Roy, 2009).

Comme pour la E-cadhérine, un certain nombre de protéines telles les MMP, la plasmine ou ADAM10 peuvent cliver la N-cadhérine et conduire à un fragment soluble (Derycke and Bracke, 2004; Derycke et al., 2006; Kohutek et al., 2009; De Wever et al.,

2007). Ces fragments solubles de la N-cadhérine conduisent à la progression tumorale en augmentant par exemple, la migration de cellules de glioblastomes (Kohutek et al., 2009). Aussi, ils contribuent à la migration des cellules endothéliales et à l'angiogenèse de manière dépendante de la voie FGFR/ERK (Derycke et al., 2006). Un clivage de la N-cadhérine par ADAM10 conduit également à une redistribution de la  $\beta$ -caténine et une activation de la transcription de ses gènes cibles comme c-myc, la cycline D1 ou c-jun (Reiss et al., 2005).

#### ➤ Autres modifications des protéines de surface

Une diminution des protéines constituant les jonctions serrées (claudines et occludines) et les desmosomes (desmoplakines et plakophilines) est aussi observée lors de l'EMT. Ces modifications conduisent à une déstabilisation de ces jonctions et ainsi à une perte d'adhésion entre les cellules (Lamouille et al., 2014).

Les intégrines sont des glycoprotéines capables de lier les composants de la matrice extracellulaire et d'activer des voies de signalisation en réponse au ligand (Rathinam and Alahari, 2010). Lors de l'EMT, les cellules quittent l'assise épithéliale et n'interagissent donc plus avec la membrane basale mais avec différents constituants de la matrice extracellulaire. Ainsi, en réponse à ce nouvel environnement, une modification du profil d'expression des intégrines est observée. En effet, les intégrines épithéliales tels que  $\alpha_6\beta_4$  qui interagit avec la membrane basale, sont remplacées par des intégrines plus adaptées comme  $\alpha_5\beta_1$ , une intégrine liant la fibronectine (Lamouille et al., 2014; Zeisberg and Neilson, 2009). Toutefois, ce profil d'expression des intégrines est dépendant du contexte cellulaire.

### 3.2. *Réorganisation du cytosquelette lors de l'EMT*

L'EMT se caractérise par une modification du cytosquelette d'actine favorisant la motilité des cellules cancéreuses via la formation de lamellipodes et de filopodes. De plus, un réarrangement des fibres d'actine conduit à la formation de fibres de stress contribuant à augmenter la contractilité des cellules. Cette réorganisation du cytosquelette est finement contrôlée par des protéines de la famille des RHO GTPases avec RhoA qui conduit à la formation de fibres de stress et Rac1 (Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1) et cdc42 (Cell Division Cycle 42) qui induisent la formation des lamellipodes et filopodes (Lamouille et al., 2014). Lors de l'EMT, les cytokératines, constituant les filaments intermédiaires dans les cellules épithéliales, sont remplacées par la vimentine. De plus, d'autres marqueurs tels que l' $\alpha$ -SMA et FSP-1, une petite protéine dépendante du calcium impliquée notamment dans

la migration et l'invasion cellulaire, deviennent exprimés lors de l'EMT (Boye and Maeldandsmo, 2010; Zeisberg and Neilson, 2009).

### *3.3. Marqueurs de la matrice extracellulaire induits lors de l'EMT*

L'EMT est aussi associée à une augmentation de la sécrétion des protéases comme MMP9 et MMP2, capables de dégrader la matrice extracellulaire et ainsi faciliter le processus d'invasion (Lamouille et al., 2014). Aussi, une augmentation de la production de fibronectine et de la lamine 5, deux composants de la matrice extracellulaire est observée lors de l'EMT (Yang et al., 2007; Zeisberg and Neilson, 2009).

### *3.4. Mécanismes de régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux lors de l'EMT*

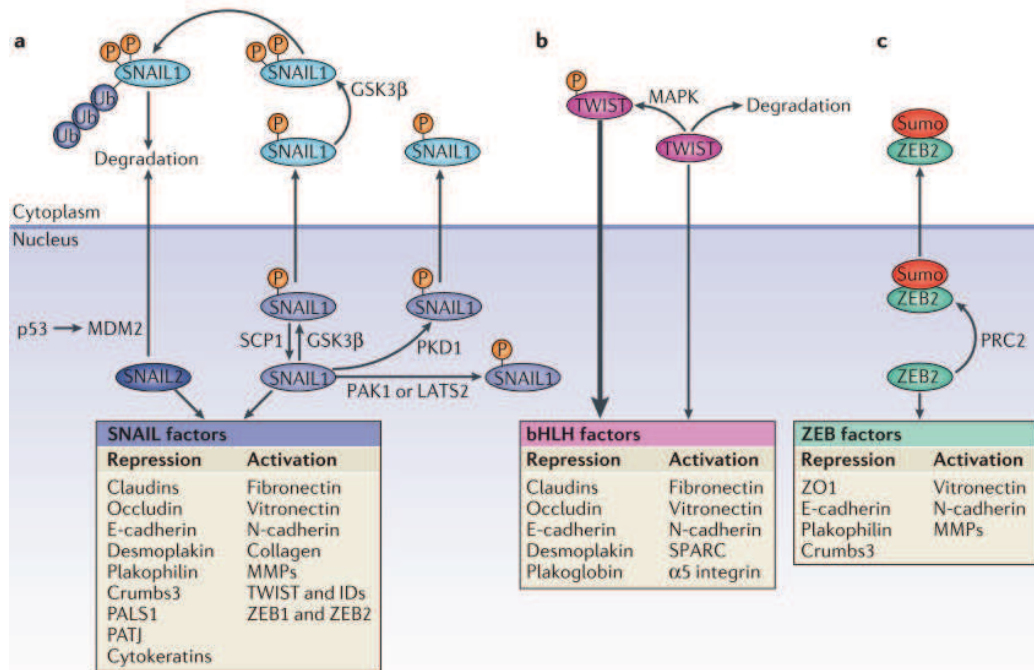
Les mécanismes conduisant au profil d'expression observé au cours de l'EMT impliquent des altérations génétiques et épigénétiques ainsi que des régulations transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles.

#### ➤ Régulation des marqueurs épithéliaux : exemple de la E-cadhérine

Les mécanismes de régulation de la E-cadhérine lors de l'EMT ont été largement étudiés. Des pertes d'hétérozygotie du chromosome 16 en position q21-22 où se trouve le gène de la E-cadhérine (CDH1) ont été fréquemment observées dans de nombreux cancers dont le cancer de la prostate. Aussi, des mutations inactivatrices de la E-cadhérine résultant par exemple de délétions, de mutations non sens ou faux sens ont été également rapportées dans divers cancers (Berx and van Roy, 2009). Une hyperméthylation du promoteur du gène *CDH1* est responsable d'une perte d'expression de la E-cadhérine dans des lignées cellulaires de cancer du sein et de la prostate (Graff et al., 1995).

De plus, des modifications de la E-cadhérine au niveau protéique sont également observées au cours de l'EMT. L'augmentation de l'activité du récepteur membranaire c-Met, du récepteur à l'EGF ou de Src conduit à une importante phosphorylation de la partie cytoplasmique de la E-cadhérine, aboutissant en retour à son internalisation et dégradation par le protéasome (Berx and van Roy, 2009).

L'expression de la E-cadhérine est aussi régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs de transcription induits lors de l'EMT, dont les principaux sont les facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox) (Figure 38) (Berx and van Roy, 2009).



**Figure 38: Principaux régulateurs de l'EMT**

L'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux est principalement régulée par les facteurs de transcription SNAIL (a), TWIST (b) et ZEB (c). L'activité de ces facteurs de transcription est contrôlée par des modifications post-traductionnelles. (a) Ainsi, de nombreuses kinases et phosphatases affectent le niveau de phosphorylation de SNAIL1 contrôlant ainsi sa localisation subcellulaire et sa dégradation. La dégradation de SNAIL2 est dépendante du recrutement de MDM2. (b) La phosphorylation de TWIST par MAPK p38, JNK et ERK le protège contre la dégradation et favorise son import nucléaire. (c) Enfin, la sumoylation de ZEB2 conduit à son export nucléaire et en conséquence à une diminution de son activité (Lamouille et al., 2014).

Les facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB répriment l'expression de la E-cadhérine en se liant aux E-box situées au niveau du promoteur et en recrutant des complexes répresseurs afin d'exercer leur activité inhibitrice. Par exemple, après avoir lié les E-box, SNAIL1 recrute le complexe répresseur Polycomb 2 (PRC2), un complexe multi-protéique comprenant les méthyltransférases EZH2 (enhancer of zeste homologue 2), G9a et SUV39H1 (suppressor of variegation 3–9 homologue 1), le corépresseur SIN3A, des histones désacétylases et la déméthylase LSD1 (Lys-specific demethylase 1). Ce complexe conduit à des modifications du niveau d'acétylation et de méthylation des histones et donc à la modulation de la transcription de la E-cadhérine (Lamouille et al., 2014). SNAIL1 forme

également un complexe transcriptionnel répresseur avec SMAD3 et SMAD4 qui, en liant le promoteur de la E-cadhérine, conduit à sa répression. En accord avec ces données, des éléments de réponse aux facteurs de transcription SMAD se trouvent à proximité des E-box situées au niveau du promoteur de la E-cadhérine. Ce complexe de répression régule aussi l'expression d'autres marqueurs épithéliaux tels que l'occludine ou la claudine-3 (Vincent et al., 2009). Enfin, l'activité des facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB est étroitement régulée par des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, sumoylations et ubiquitinylation (Figure 38) (Lamouille et al., 2014). Beaucoup d'autres médiateurs de l'EMT ont été décrits à ce jour comme par exemple les facteurs de transcription FOX (forkhead box), GATA ou KLF8 (Kruppel-like factor 8) ; ce dernier régulant directement l'expression de la E-cadhérine en liant les "GT Box" au niveau du promoteur (Lamouille et al., 2014; Thiery et al., 2009). Ces facteurs de transcription coopèrent entre eux afin d'initier et maintenir le processus de l'EMT.

#### ➤ Régulation des marqueurs mésenchymateux

Les mécanismes à l'origine de l'expression des marqueurs mésenchymateux lors de l'EMT sont beaucoup moins décrits que ceux réprimant l'expression des marqueurs épithéliaux. En effet, la plupart des études montrent des associations entre certains facteurs de transcription et l'expression de marqueurs mésenchymateux sans définir clairement le mécanisme sous-jacent. Il a été suggéré que les facteurs de transcription SNAIL, TWIST et ZEB conduisent également à l'induction de l'expression des marqueurs mésenchymateux (Derycke and Bracke, 2004; Lamouille et al., 2014). En particulier, le facteur de transcription TWIST1 régule directement la transcription de la N-cadhérine dans les cellules cancéreuses prostatiques PC3 en liant des éléments de réponse E-box situés au niveau de l'intron 1 du gène de la N-cadhérine (Alexander et al., 2006). TWIST1 a donc la capacité de réprimer l'expression de la E-cadhérine et de stimuler la transcription de la N-cadhérine. La monométhylation H4K20 induite par la méthyltransférase SET8 a été proposée comme un mécanisme contrôlant la double fonction de TWIST1. Cependant la raison pour laquelle la monométhylation H4K20 est une marque répressive au niveau du gène de la E-cadhérine et activatrice pour le gène de la N-cadhérine reste à être déterminée (Yang et al., 2011).

➤ EMT et miRNA

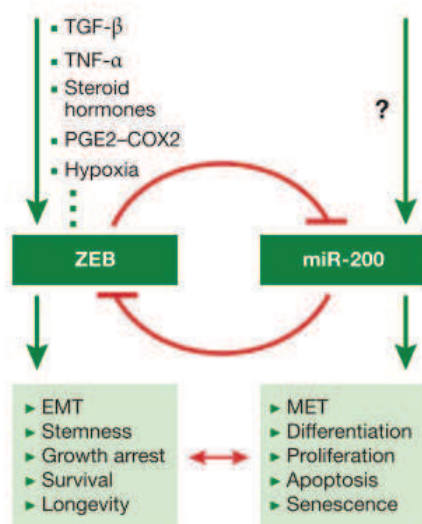
Les miRNA sont de puissants régulateurs post-transcriptionnel de l'EMT et de la MET en raison de leur habilité à contrôler l'expression des ARN messagers codant pour les protéines clés qui conduisent à ces processus (Figure 39).

| miRNA                           | Cible du miRNA |
|---------------------------------|----------------|
| miR-30a/miR-34/miR-148a/miR-203 | <i>SNAIL</i>   |
| miR-1/miR-29/miR-200            | <i>SNAIL2</i>  |
| miR-29                          | <i>TWIST</i>   |
| miR-145/miR-200/miR-205         | <i>ZEB1</i>    |
| miR-145/miR-203/miR-205         | <i>ZEB2</i>    |

**Figure 39:** Principaux miRNA impliqués dans la régulation des facteurs de transcription clés de l'EMT.

(Polyak and Weinberg, 2009; Wang et al., 2015; Zaravinos, 2015)

De nombreuses boucles d'autorégulation entre ces miRNA et les facteurs clés de l'EMT sont mises en place afin de maintenir de manière stable un phénotype épithélial ou mésenchymateux. La boucle d'autorégulation entre les membres de la famille miRNA-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR429) et les facteurs de transcription ZEB est sans doute la mieux caractérisée (Figure 40).



**Figure 40:** Boucle d'autorégulation entre les membres de la famille miRNA-200 et les facteurs de transcription ZEB.

L'expression de ZEB est induite en réponse à un ensemble de facteurs comme le TGF-β résultant en l'activation du programme de l'EMT. Les facteurs conduisant à l'expression de miR-200 ne sont pas clairement définis (Brabletz and Brabletz, 2010).

De part leur capacité à contrôler l'expression de ZEB1 et ZEB2, les membres de la famille miRNA-200 sont capables d'induire la MET et sont donc de puissants inducteurs de la différenciation épithéliale. En effet, les parties 3'UTR de ZEB1 et ZEB2 contiennent respectivement 8 et 9 sites de liaison pour les miRNA-200 (Brabletz and Brabletz, 2010). Par ailleurs, les facteurs de transcription ZEB répriment directement l'expression des membres de la famille miRNA-200 en liant leurs sites de liaison très conservés au niveau du promoteur (Brabletz and Brabletz, 2010; Zaravinos, 2015). En accord avec ces données, lors de l'EMT, il existe une corrélation inverse entre l'expression des miRNA-200 et des facteurs de transcription ZEB (Kong et al., 2009; Wellner et al., 2009). Par exemple, l'induction de l'EMT par le PDGF-D dans des cellules cancéreuses prostatiques est associée à une diminution de l'expression de miR-200a, miR-200b et miR-200c concomitante avec une augmentation de ZEB (Kong et al., 2009). Au cours de l'EMT, l'expression des facteurs de transcription ZEB est contrôlée par l'activation d'un ensemble de voies de signalisation comme la voie du TGF- $\beta$ . Au contraire, le contrôle de l'expression des membres de la famille miRNA-200 est beaucoup moins décrit. Cependant, le suppresseur de tumeur p53 contrôle positivement l'expression des membres de cette famille en se liant à ses éléments de réponse au niveau de la région promotrice (Chang et al., 2011a; Kim et al., 2011). Ainsi, une perte de p53 pourrait conduire à une diminution des miRNA-200 entraînant une dérégulation de ZEB et donc l'initiation du programme de l'EMT.

Enfin, en plus de maintenir le processus de l'EMT, cette boucle d'autorégulation contribue à l'induction de propriétés de cellules souches. En effet, ZEB1 est capable d'induire l'expression de marqueurs de cellules souches tels que Bmi1 (B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1 Homolog) et Sox2 ((Sex determining region Y)-box 2) en réprimant l'expression de miR-200, miR-183 et miR-203 (Wellner et al., 2009).

#### **4. EMT et propriétés de cellules souches**

Plusieurs études récentes suggèrent que l'EMT est associée à l'acquisition de caractéristiques de cellules souches (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). En effet, l'induction de l'EMT dans des cellules épithéliales humaines immortalisées de sein génère une sous-population de cellules CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>, un profil antigénique correspondant au phénotype observé dans les cellules souches normales et cancéreuses mammaires. Cette sous-population expose à la fois des marqueurs associés à l'EMT et des caractéristiques de cellules souches telles que la capacité à former des mammosphères et à s'autorenouveler (Mani et al.,

2008). Ainsi, l'EMT participe à l'agressivité tumorale en conférant aux cellules cancéreuses des caractéristiques mésenchymateuses et des caractéristiques de cellules souches. L'acquisition de telles propriétés par les cellules cancéreuses favorise respectivement leur dissémination métastatique et leur habilité à former de larges colonies au niveau des sites de métastases de part leur capacité d'auto renouvellement (Scheel and Weinberg, 2011).

Enfin, l'EMT et l'acquisition de propriétés de cellules souches contribuent au développement de résistances thérapeutiques, incluant la résistance à la castration (Li et al., 2014; Singh and Settleman, 2010). La déprivation androgénique conduit à une induction d'une EMT associée avec des caractéristiques de cellules souches dans la prostate normale de souris (Sun et al., 2012). Aussi, une expression du marqueur de cellules souches Nanog dans les cellules LNCaP est responsable d'une résistance à la castration (Jeter et al., 2011). Ainsi, ces études suggèrent que la castration induit un programme d'EMT associé à des propriétés de cellules souches contribuant au développement de CRPC.

# **OBJECTIFS ET PROJET DE THESE**

Comme mentionné dans l'introduction, les variants constitutivement actifs du RA jouent un rôle important dans la résistance à la castration. De plus, plusieurs études suggèrent que ces variants pourraient aussi contribuer à la progression du cancer de la prostate. En effet, bien que déjà présents à des stades localisés, ces variants sont encore plus exprimés dans des métastases osseuses de patients résistants à la castration (Hörnberg et al., 2011). Des études précédentes réalisées au laboratoire ont montré que l'expression des variants est associée à une augmentation des activités transcriptionnelles de NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et AP-1, deux facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et migration (Lapouge et al., 2008). De plus, ces variants constitutivement actifs pourraient soutenir la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques qui les expriment en induisant des gènes impliqués dans le cycle cellulaire tels que UBE2C, c-myc ou CDK1 (cyclin dependent kinase 1) (Hörnberg et al., 2011; Hu et al., 2012).

A la lumière de ces études, mon projet de recherche, qui a débuté lors de mon Master 2, a consisté à étudier l'impact des variants constitutifs du RA sur la progression du cancer de la prostate.

Dans un premier temps, j'ai étudié l'impact des variants du RA sur l'expression des marqueurs de l'EMT comme la E-cadhérine, la N-cadhérine, la vimentine, SNAIL, TWIST et ZEB.

Dans un second temps, je me suis focalisée sur les mécanismes moléculaires conduisant à l'expression de ces marqueurs de la progression tumorale en présence des variants constitutifs. Cette seconde partie visait également à comprendre les différences de mode d'action entre un RA de taille normal (AR-FL) et un variant constitutif du RA.

Ce projet avait donc pour finalité d'avoir une meilleure compréhension du mode d'action des variants constitutifs du RA lors de la résistance à la castration.

# **RESULTATS**

## **Article 1**

### **Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells**

**Félicie Cottard**, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

Publié dans PLoS One. 2013 May 2;8(5):e63466. doi: 10.1371/journal.pone.0063466. Print 2013.

Une meilleure compréhension du mode d'action des variants constitutivement actifs dans les cancers de la prostate résistants à la castration est nécessaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Comme des études récentes suggèrent un éventuel rôle des variants constitutifs du RA dans la progression du cancer de la prostate, nous avons recherché l'impact de ceux-ci sur l'expression des marqueurs associés à l'EMT. Pour ce faire, nous avons choisi comme modèle d'étude, les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP qui sont androgéno-dépendantes et qui expriment un RA endogène T877A. Ainsi, en transfectant ces cellules avec un variant constitutif du RA, nous obtenons un modèle de co-expression entre un récepteur de taille normale (AR-FL) et un variant constitutif du RA, mimant ce qui est observé au sein des tumeurs prostatiques humaines.

Par des techniques de RT-qPCR, Western Blot et Immunofluorescence, j'ai pu montrer que les variants constitutifs du RA sont associés à une induction de l'expression de la N-cadhérine, la vimentine, et des facteurs de transcription SNAIL et ZEB1. Toutefois, aucune différence d'expression de la E-cadhérine n'était observée dans notre modèle.

Aussi, dans cet article, j'ai étudié la contribution du récepteur endogène (AR-FL) présent dans les cellules LNCaP sur l'expression de la N-cadhérine. Afin de répondre à cette question, le niveau d'expression de la N-cadhérine a été analysé par RT-qPCR en présence de doses croissantes de DHT ou du nouvel anti-androgène MDV3100. Ces expériences ont permis de mettre en évidence un effet répresseur de l'AR-FL sur l'expression de la N-cadhérine induite par les variants constitutifs du RA.

# Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells

Félicie Cottard<sup>1</sup>, Irène Asmane<sup>1,2</sup>, Eva Erdmann<sup>1</sup>, Jean-Pierre Bergerat<sup>1,2</sup>, Jean-Emmanuel Kurtz<sup>1,2</sup>, Jocelyn Céraline<sup>1,2\*</sup>

**1** INSERM U1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **2** CHRU Strasbourg, Hematology and Oncology Unit, Strasbourg, France

## Abstract

Androgen receptor (AR) signaling pathway remains the foremost target of novel therapeutics for castration-resistant prostate cancer (CRPC). However, the expression of constitutively active AR variants lacking the carboxy-terminal region in CRPC may lead to therapy inefficacy. These AR variants are supposed to support PCa cell growth in an androgen-depleted environment, but their mode of action still remains unresolved. Moreover, recent studies indicate that constitutively active AR variants are expressed in primary prostate tumors and may contribute to tumor progression. The aim of this study was to investigate the impact of constitutively active AR variants on the expression of tumor progression markers. N-cadherin expression was analyzed in LNCaP cells overexpressing the wild type AR or a constitutively active AR variant by qRT-PCR, Western blot and immunofluorescence. We showed here for the first time that N-cadherin expression was increased in the presence of constitutively active AR variants. These results were confirmed in C4-2B cells overexpressing these AR variants. Although N-cadherin expression is often associated with a downregulation of E-cadherin, this phenomenon was not observed in our model. Nevertheless, in addition to the increased expression of N-cadherin, an upregulation of other mesenchymal markers expression such as *VIMENTIN*, *SNAIL* and *ZEB1* was observed in the presence of constitutively active variants. In conclusion, our findings highlight novel consequences of constitutively active AR variants on the regulation of mesenchymal markers in prostate cancer.

**Citation:** Cottard F, Asmane I, Erdmann E, Bergerat J-P, Kurtz J-E, et al. (2013) Constitutively Active Androgen Receptor Variants Upregulate Expression of Mesenchymal Markers in Prostate Cancer Cells. PLoS ONE 8(5): e63466. doi:10.1371/journal.pone.0063466

**Editor:** Zoran Culig, Innsbruck Medical University, Austria

**Received:** January 9, 2013; **Accepted:** April 2, 2013; **Published:** May 2, 2013

**Copyright:** © 2013 Cottard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the University of Strasbourg; the Ligue Contre le Cancer, the Alsace Contre le Cancer; and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Prostatiques (ARTP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: ceraline@unistra.fr

## Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men over 50 years of age and the second cause of male mortality due to cancer in Europe. Androgens signaling plays a key role in PCa cells proliferation or survival [1], and androgen withdrawal remains the main treatment for local recurrence and androgen-dependent metastatic PCa. However, the benefit of this therapy is transient and all tumors ultimately recur as castration-resistant PCa (CRPC).

Genetic and splicing events affecting the androgen receptor (AR) gene have been linked to CRPC. Constitutively active AR variants, lacking the carboxy-terminal region that encompasses the ligand binding domain and the activation function 2, might contribute to the progression of PCa into castration resistance. These constitutively active AR variants result from premature stop codons due to nonsense mutations as reported for the ARQ640X [2,3,4,5] or from alternative splicing with the retention of a cryptic exonic sequence as described for AR-V7 [4,6,7,8,9,10].

The role of constitutively active AR variants in CRPC has been shown in many studies [7,8,11,12]. The expression of these truncated AR variants is increased by a 20-fold in CRPC

compared with localized PCa [9], and is correlated with the capacity of PCa cells to grow *in vitro* and *in vivo* in the absence of androgen [7]. However, the exact molecular mechanisms leading to their activation and their mode of action in PCa and CRPC remain unclear.

Recent studies suggest that constitutively active AR variants could play a role in tumor progression. Indeed, although these constitutively active AR variants are already expressed in primary prostate tumors, their expression is all the more expressed in bone metastasis [8]. Furthermore, their expression is associated with an increase of NFAT (Nuclear factor of activated T-cell) and AP-1 (Activator Protein-1) activity, two transcription factors involved in cell proliferation, migration and survival [13].

N-cadherin, which belongs to cadherin superfamily, is located at adherens junctions in nervous, endothelial or mesenchymal cells and is involved in tumor progression [14,15]. Indeed, N-cadherin expression is increased in most cancers and promotes tumor cells migration, invasion and survival [14]. Increased N-cadherin expression is also associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT), a phenomenon characterized by a decrease of epithelial markers such as E-cadherin and an increase of

mesenchymal markers such as Vimentin or N-cadherin [16,17,18,19]. These molecular and cellular modifications play an important role in tumor cells dissemination at secondary sites [20,21].

More recently, studies have shown that castration-resistant PCa is associated with an upregulation of N-cadherin expression in cellular models as well as PCa xenografts and clinical samples of CRPC [22,23,24]. Moreover, monoclonal antibodies against N-cadherin have been shown to delay the emergence of castration resistance and to reduce the growth of CRPC xenografts [23]. Taken together, these data show that there is a correlation between N-cadherin expression and resistance to castration. Nevertheless, molecular mechanisms whereby N-cadherin expression is increased in CRPC remain unknown.

The aim of this work was to show a possible link between the presence of constitutively active AR variants and the expression of tumor progression markers. More particularly, we focused on the impact of constitutively active AR variants on the expression of N-cadherin and other mesenchymal markers. In the present study, we have shown that *N-CADHERIN* as well as *VIMENTIN*, *SNAIL* and *ZEI1* are upregulated in the presence of constitutively active AR variants in PCa.

## Materials and Methods

### Cell culture

The human prostate carcinoma LNCaP cell line, clone FGC and the 22Rv1 cell line (ECACC, Salisbury, United Kingdom) was maintained in RPMI-1640 complete medium containing 10% fetal calf serum (FCS), 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, France) and 1mM sodium pyruvate (Invitrogen, Fisher Scientific, France).

C4-2B cell line (ViroMed Laboratories, Minnetonka, MN, USA) was maintained in DMEM medium supplemented with 20% Ham's F12, 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 5 µg/mL insulin, 13.65 pg/mL triiodo-thyronine, 4.4 µg/mL apo-transferrin human, 0.244 µg/mL d-biotin and 12.5 µg/mL adenine (Sigma-Aldrich, France).

### Plasmids and transfection

For immunofluorescence experiments, the wild type androgen receptor (AR) (AR-WT) and the constitutively active AR Q640X and AR Q670X [25] variants were linked to EGFP as previously described [2,3]. For gene expression analysis and Western-blot, pE-ARWT, pE-ARQ640X and pE-AR-V7 plasmids were constructed by inserting the corresponding AR cDNA between the *NheI* and *BamHI* sites in pEGFP-C3.

For transfections, the JetPEI<sup>TM</sup> transfection reagent (Polyplus Transfection, Ozyme, France) was used according to the manufacturer's protocol. LNCaP cells were seeded in 10 cm dishes at  $1 \times 10^6$  cells/dish or in 6-wells plate at  $2 \times 10^5$ /well. Three days later, the medium was changed and cells were transfected with 10 µg of the indicated plasmid using 20 µl of JetPEI transfection reagent for 10 cm dishes or with 3 µg of plasmid using 6 µl of JetPEI for 6-wells plate. Medium was changed 48 h after and cells were incubated up to 9 days according to the experiments. The medium was changed every two days and for incubations beyond 4 post-transfection days, cells were incubated in the presence of 400 µg/mL geneticin (Invitrogen, France).

### Impact of androgens on N-cadherin expression

LNCaP cells were seeded in 6-wells plate in complete medium and transfected as previously described. Twenty four hours later,

medium was changed to phenol red free RPMI-1640 supplemented with 5% dextran-coated charcoal-stripped FCS (DCC-FCS) and with the indicated concentration of dihydrotestosterone (DHT) (Sigma-Aldrich, France) or vehicle (ethanol).

For experiment with MDV3100, transfected LNCaP cells were incubated in RPMI-1640 supplemented with 5% DCC-FCS containing the indicated DHT dose and 100 nM MDV3100 (Enzalutamide, Selleck Chemicals, Euromedex, France) or vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO). To confirm the effects of androgens on N-cadherin expression, 22Rv1 cells were grown in RPMI-1640 with 100 nM or 1 µM MDV3100, or DMSO.

### Cell Sorting

LNCaP cells were seeded in 10cm dishes at  $1 \times 10^6$  cells/dish and were transfected with pEGFP-ARWT or pEGFP-ARQ640X. Four days after transfection, cells were trypsinized and sorted thanks to the green fluorescence (EGFP) with a BD FACSAria-II cell sorter (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Total RNA was extracted from EGFP negative (non-transfected) and EGFP positive (transfected) cells and was used to analyze gene expression by qRT-PCR.

### Quantitative real-time PCR

Total cellular RNA was extracted from cell lines using NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II assay (Macherey-Nagel, France) according to the manufacturer's procedure. RNA concentrations and purity were quantified measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm (GeneQuant pro, GE Healthcare, France). The reverse transcription was performed from 400 ng or 1 µg RNA using RT Omniscript assay (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA were diluted into 13 µL and denatured at 65°C during 5 minutes. A 7 µL reaction mix containing 1×RT template, 0.5 mM of each dNTP, 1 µM oligo dT, 10U RNase inhibitor and 4U Omniscript Reverse Transcriptase was added and the reaction was incubated 1 h at 37°C. The reaction was stopped by heating to 93°C for 5 minutes. *N-CADHERIN*, *E-CADHERIN*, *VIMENTIN*, *SNAIL*, *TWIST1*, and *ZEI1* mRNA levels were quantified using real-time PCR with LightCycler 480 (Roche Applied Science, Meylan, France). For PCR reactions, 5 µL LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master (Roche, Molecular Diagnostics, Mannheim, Germany) and 1 µL specific primers (Table 1) (Qiagen, QuantiTect Primers, Courtaboeuf, France) were mixed with 4 µL of 1:5 cDNA dilution. Results were normalized using housekeeping gene *β-ACTIN* or *PBGD* (Porphobilinogen deaminase) (Qiagen, QuantiTect Primer). Amplification specificity was verified by analyzing melting curve and by electrophoresis migration. All experiments were realized in triplicate and repeated 3 times. Relative quantification was used to determinate fold change in expression level by the  $\Delta\Delta C_t$  method. Each value is expressed as the mean  $\Delta\Delta C_t \pm$  SEM. Results were analyzed with Student t test and *p*-value <0.05 was considered significant.

### Western Blot

Cells were lysed in buffer containing 10 mM Tris-HCl pH7, 140 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5×Igepal, 5 mM DTT, 1× phosphatase inhibitor, and 1× protease inhibitor. Protein concentration for each sample was quantified using BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's procedure. A quantity of 15 µg to 100 µg of total proteins was loaded on 7.5% SDS-PAGE. After migration and transfer to nitrocellulose membrane, membranes were saturated with PBS/0.1%Tween/2%ECL and incubated at 4°C overnight with 0.1 µg/mL mouse monoclonal anti N-cadherin (catalog no. 610920, BD Biosciences, France) or 1 µg/mL mouse

**Table 1.** List of primers used in qRT-PCR experiments.

| Genbank                  | QuantiTect reference | Hybridization temperature (°C) | Amplicon length (bp) | Amplified exons |
|--------------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------|
| <i>β-ACTIN (ACTB)</i>    | QT01680476           | 55/60                          | 104                  | NA              |
| <i>E-CADHERIN (CDH1)</i> | QT00080143           | 55                             | 84                   | 5/6             |
| <i>N-CADHERIN (CDH2)</i> | QT00063196           | 60                             | 102                  | 14/15           |
| <i>PBGD (HMBS)</i>       | QT00014462           | 55                             | 107                  | 7/8/9           |
| <i>TWIST1</i>            | QT00011956           | 55                             | 127                  | 1/2             |
| <i>SNAIL (SNAI1)</i>     | QT00010010           | 60                             | 131                  | 2/3             |
| <i>VIMENTIN</i>          | QT00095795           | 60                             | 94                   | 2/3             |
| <i>ZEB1</i>              | QT01888446           | 58                             | 105                  | 2/3/4           |

doi:10.1371/journal.pone.0063466.t001

monoclonal anti AR (catalog no. 554225, BD Biosciences, France) antibody.  $\beta$ -actin (0.2  $\mu$ g/mL) (catalog no. sc-47778, Tebu-bio, France) was used as internal control. After washes, immunocomplexes were detected with 0.2  $\mu$ g/mL HRP-conjugated goat anti mouse (catalog no. sc-2005, Tebu-bio, France), or 0.5  $\mu$ g/mL rat anti mouse IgG2a secondary antibodies (catalog no. 553391, BD Biosciences, France), and finally revealed by chemiluminescence (Immobilon<sup>TM</sup> Western, Millipore, Molsheim, France).

### Immunofluorescence Staining

Lab-Tek II chamber slides (2 wells) were coated with LNCaP medium for two hours and  $1 \times 10^5$  LNCaP cells/well were seeded. LNCaP cells were transfected with 2  $\mu$ g of pEGFP-WT, pEGFP-ARQ640X or pEGFP-ARQ670X 3 days later and incubated for 4 days. LNCaP cells were rinsed in PBS and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were blocked and permeabilized by 0.1% Triton/1% Bovine Serum Albumin (BSA)/PBS for 30 min at room temperature. Cultures were incubated with 2.5  $\mu$ g/mL anti N-cadherin mouse monoclonal antibody (catalog no. 610920, BD Biosciences, France) or isotypic antibody (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 4°C overnight. After washing in PBS, LNCaP cells were incubated with 2  $\mu$ g/mL Alexa Fluor 568-conjugated goat anti mouse (Invitrogen, Fisher Scientific, France) for 1 h and nuclei were stained with 0.1  $\mu$ g/mL DAPI solution for 20 min at 30°C. Images were captured with the Leica LAS AF6000 fluorescence microscope using LAS AF software (Leica).

## Results

### Constitutively active androgen receptor variants upregulate N-cadherin expression in prostate cancer cells

Constitutively active AR variants have been associated with CRPC. Moreover, some studies showed that CRPC is also associated with an upregulation of N-cadherin expression [22,23]. We investigated whether constitutively active AR variants upregulate N-cadherin expression in PCa cells. *N-CADHERIN* mRNA level was determined by qRT-PCR in LNCaP cells overexpressing the constitutively active AR Q640X or AR-V7, or the AR-WT as control (Figure 1). *N-CADHERIN* expression remained unchanged in LNCaP cells overexpressing AR-WT compared with controls. Interestingly, *N-CADHERIN* expression was increased by a 8,000-fold in the presence of ARQ640X and AR-V7 (Figure 1A-B). These data were confirmed in C4-2B cells (Figure S1) and at the protein level in LNCaP cells (Figure 1C). In addition, a time course experiment revealed that N-cadherin

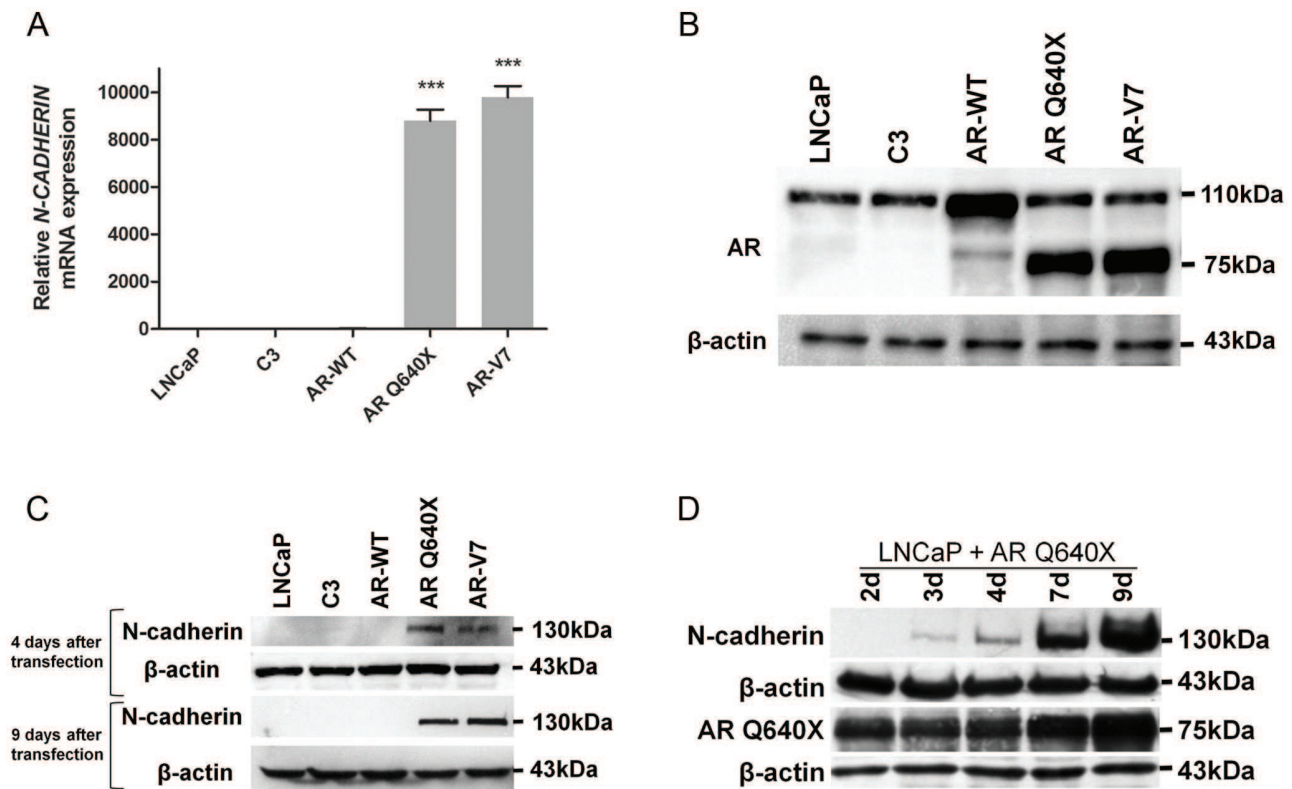
protein levels were consistently increased from day-3 after LNCaP cells transfection with ARQ640X (Figure 1D).

To confirm these data from transient transfection, a cell-sorting analysis was performed after LNCaP transfection to demonstrate that N-cadherin expression was restricted to cells expressing a constitutively active AR. *N-CADHERIN* expression was analyzed in EGFP negative (non-transfected cells) or EGFP positive (transfected cells) fractions by qRT-PCR. Consistent with above results, *N-CADHERIN* expression was undetectable in both EGFP-negative and positive fractions following LNCaP transfection with pEGFP-ARWT. However, upon transfection with pEGFP-ARQ640X, *N-CADHERIN* expression was increased in EGFP positive cells overexpressing the constitutively active AR, but not in the EGFP negative fraction (Figures 2A–B). These results were further confirmed by immunofluorescence analysis showing an N-cadherin labeling exclusively in EGFP positive cells expressing a constitutively active AR variant (Figure 2C).

Taken together, these data strongly suggest that constitutively active AR variants upregulate N-cadherin expression in PCa cells.

### Androgens negatively regulate N-cadherin expression induced by constitutively active androgen receptor variants

A recent study reported that constitutively active AR variants might require a full-length AR (AR-FL) to activate endogenous target genes. To explore the effect of the endogenous AR-FL present in LNCaP cells on the ability of constitutively active AR variants to induce N-cadherin expression, LNCaP cells overexpressing AR-WT or a constitutively androgen variant were incubated in the presence of 100 nM DHT or vehicle, and N-cadherin expression was analyzed by qRT-PCR. In accordance with our previous results, no N-cadherin expression was observed in cells overexpressing AR-WT. Interestingly, a 1.4-fold decrease in N-cadherin expression level was observed when cells overexpressing AR Q640X or AR-V7 were cultured in the presence of 100 nM DHT compared to vehicle (Figure 3A). In addition, this androgen-mediated N-cadherin repression was dose-dependent (Figure 3B). These results suggest that constitutively active androgen receptor variants do not require AR-FL to up-regulate N-cadherin expression. However, DHT-activated AR-FL seems to antagonize effects of constitutively active androgen receptor variants on N-cadherin expression (Figure 3C). To verify this hypothesis, the novel anti-androgen MDV3100 was used to inhibit DHT-activated AR-FL in transfected LNCaP cells. As expected, a further significant increase of N-cadherin expression was observed in LNCaP cells overexpressing AR variants in the presence of



**Figure 1. N-cadherin expression is upregulated in the presence of constitutively active androgen receptor variants.** A). N-cadherin expression was assessed by qRT-PCR in LNCaP cells overexpressing the constitutively active AR Q640X or AR-V7, or the AR-WT and in cells transfected with the empty plasmid (C3). Cells were grown in complete medium for 9 days after transfection. Parental LNCaP cells were used as control. y-Axis represents the relative fold change compared with control (parental LNCaP cells).  $\beta$ -ACTIN was used as the endogenous normalization control. Relative expression is presented as the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. Each sample is compared one by one by two tail unpaired t test. NS: Not significant \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ . B). Western Blot showing AR expression in transfected and non transfected LNCaP cells. C). Immunoblot analysis of N-cadherin expression in transfected LNCaP cells 4 and 9 days after transfection. D). Kinetic analysis of N-cadherin expression by Western Blot in LNCaP cells overexpressing AR Q640X from 2 to 9 days after transfection.  $\beta$ -actin was used as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0063466.g001

100 nM MDV3100 (Figure 3D). These results were also confirmed in castration-resistant 22Rv1 cells, known to express both AR-FL and constitutively active AR variants. A 2-fold increase in N-cadherin mRNA level was observed when 22Rv1 cells were cultured for 4 days in the presence 100 nM and 1  $\mu$ M of the anti-androgen MDV3100 (Figure S2).

All together, these data suggest that DHT-activated AR-FL could compete with constitutively active androgen receptor for regulating N-cadherin expression.

#### Constitutively active androgen receptor variants are associated with the expression of mesenchymal markers

It is widely known that in tumor cells, the expression of mesenchymal markers is associated with a down-regulation of epithelial markers. We hypothesized that the upregulation of N-cadherin expression observed in the presence of constitutively active AR variants is accompanied by a decreased expression of E-cadherin. To test this hypothesis, we analyzed E-cadherin expression in LNCaP transfected with ARQ640X, AR-V7 or the wild type AR expression plasmid, or the empty plasmid as control. *E-CADHERIN* mRNA levels in LNCaP cells upon transfection with ARQ640X or AR-V7 expression plasmid did not show any significant difference compared with controls (Figure 4A). These results were further confirmed by Western

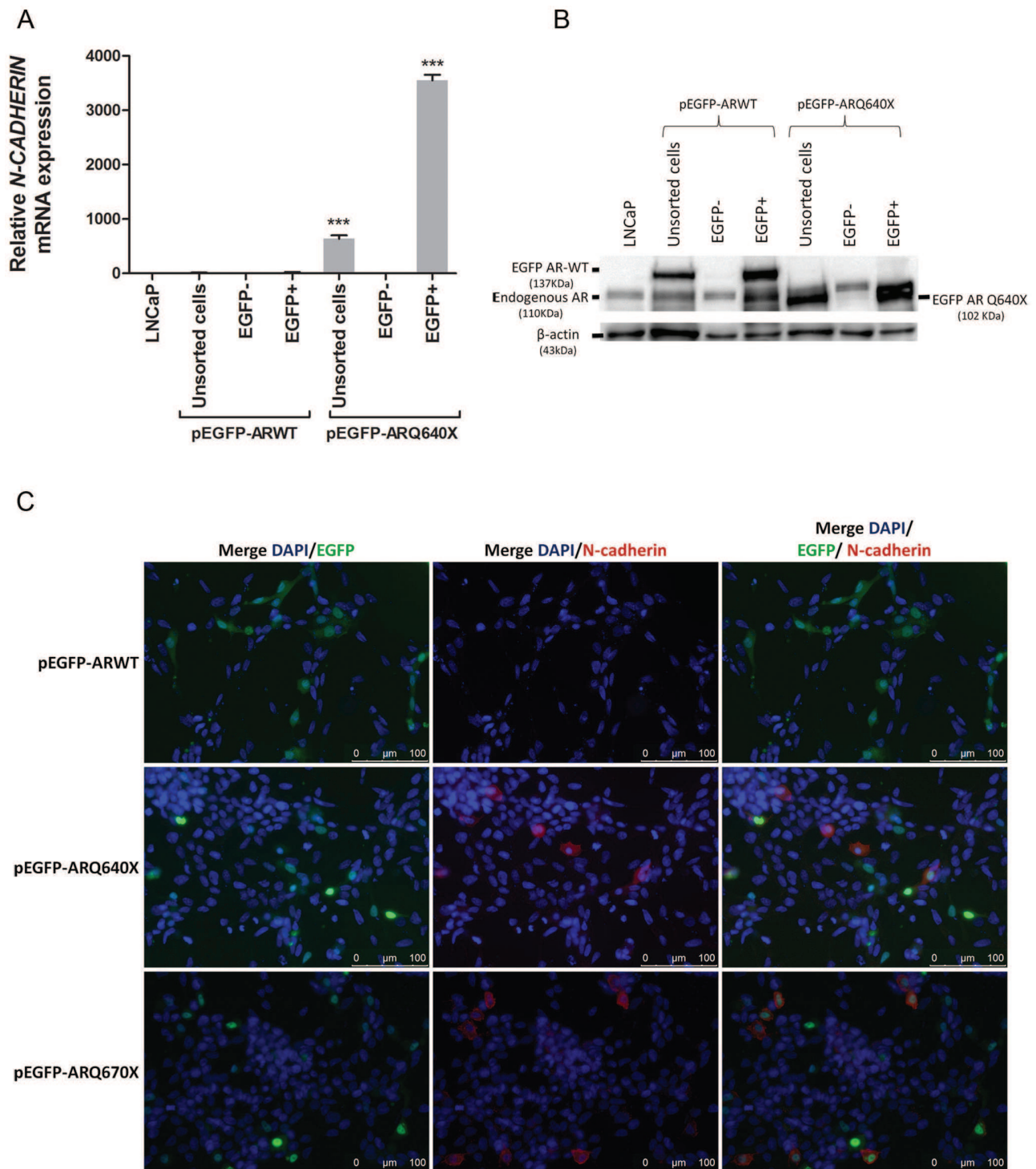
blot analysis (data not shown), suggesting that the expression of constitutively active AR variants in PCa is associated with a marked increase in N-cadherin expression, but is not correlated with a down-regulation of E-cadherin.

We also investigated whether constitutively active AR expression in PCa cells is associated with other mesenchymal markers. Expression levels of *VIMENTIN* and transcription factors *TWIST1*, *ZEB1* and *SNAIL* were determined by qRT-PCR at day-9 after LNCaP cells transfection with ARQ640X or AR-V7 expression plasmid, the wild type AR plasmid or the empty vector as controls (Figure 4B–E). *VIMENTIN* expression was increased by a 2.5 and 1.5-fold in LNCaP cells overexpressing ARQ640X and AR-V7 when compared with controls respectively (Figure 4B).

Although Twist1 is known to induce *N-CADHERIN* expression in PCa, no significant difference in the mRNA levels of *TWIST1* was observed (Figure 4C). However, constitutively active AR variants led to a statistically significant increase of *SNAIL* and *ZEB1* mRNA levels (Figure 4D, E). *ZEB1* upregulation was also confirmed at the protein level (Figure 4F).

#### Discussion

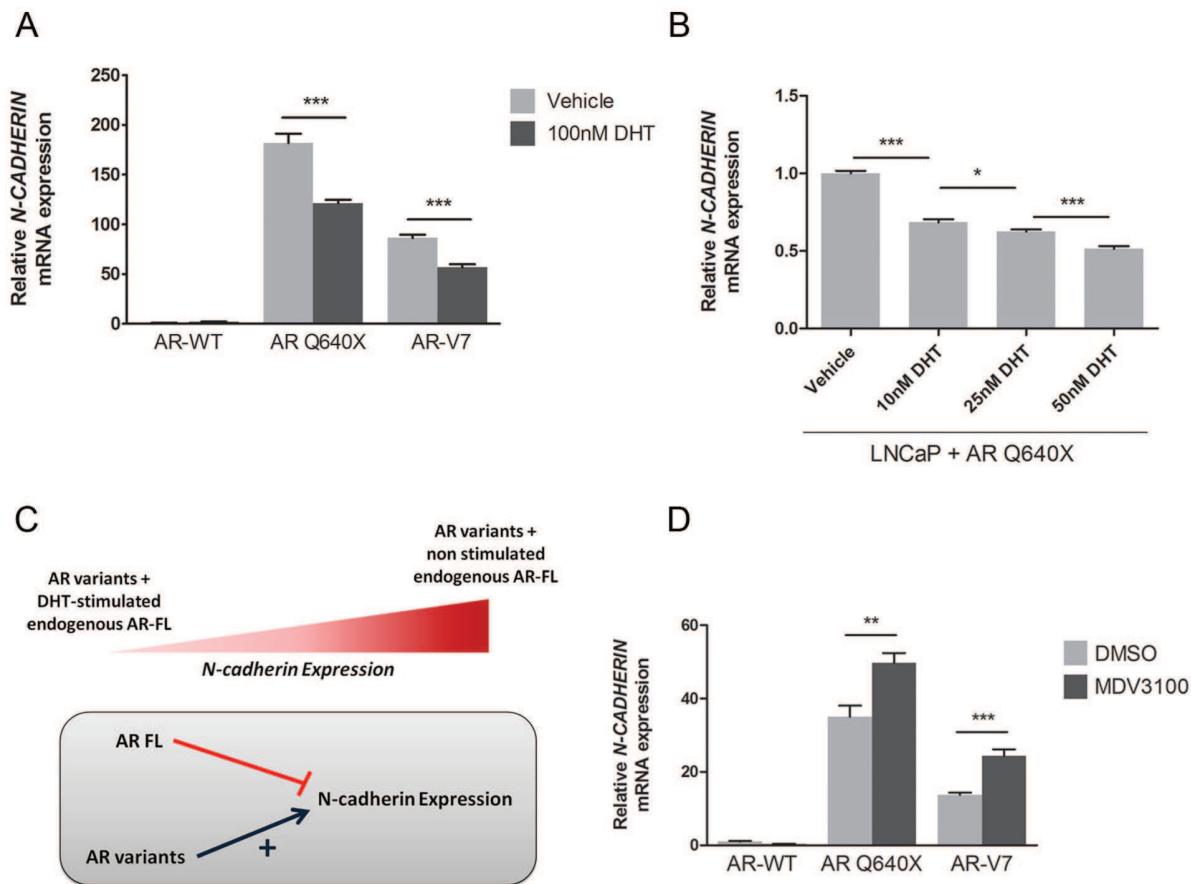
The AR signaling is very important for proliferation and survival of prostate cancer cells. The AR pathway remains activated during the progression of PCa towards a castration-



**Figure 2. N-cadherin upregulation was restricted to LNCaP cells expressing constitutively active androgen receptor variants.** LNCaP cells were transiently transfected with pEGFP-ARWT or pEGFP-ARQ640X plasmid and were sorted 4 days after. A). *N-CADHERIN* expression was analyzed by qRT-PCR in EGFP positive (transfected) and EGFP negative (non-transfected) fractions. B). Androgen receptor (AR) level was analyzed by Western Blot to verify the purity of each fraction after cell sorting. C). Immunofluorescence analysis of N-cadherin (red fluorescence) expression in LNCaP cells transfected with EGFP-tagged (green fluorescence) AR-WT, AR Q640X or AR Q670X expression plasmid. Magnification:  $\times 20$ . doi:10.1371/journal.pone.0063466.g002

resistant disease and the emergence of constitutively active AR variants lacking the ligand-binding domain is now considered as a major event in CRPC. In spite of some studies suggest that

constitutively active AR variants have an impact on tumor progression, their function remains so far unresolved.



**Figure 3. Androgens abrogate N-cadherin upregulation induced by constitutively active androgen receptor variants in LNCaP cells.**

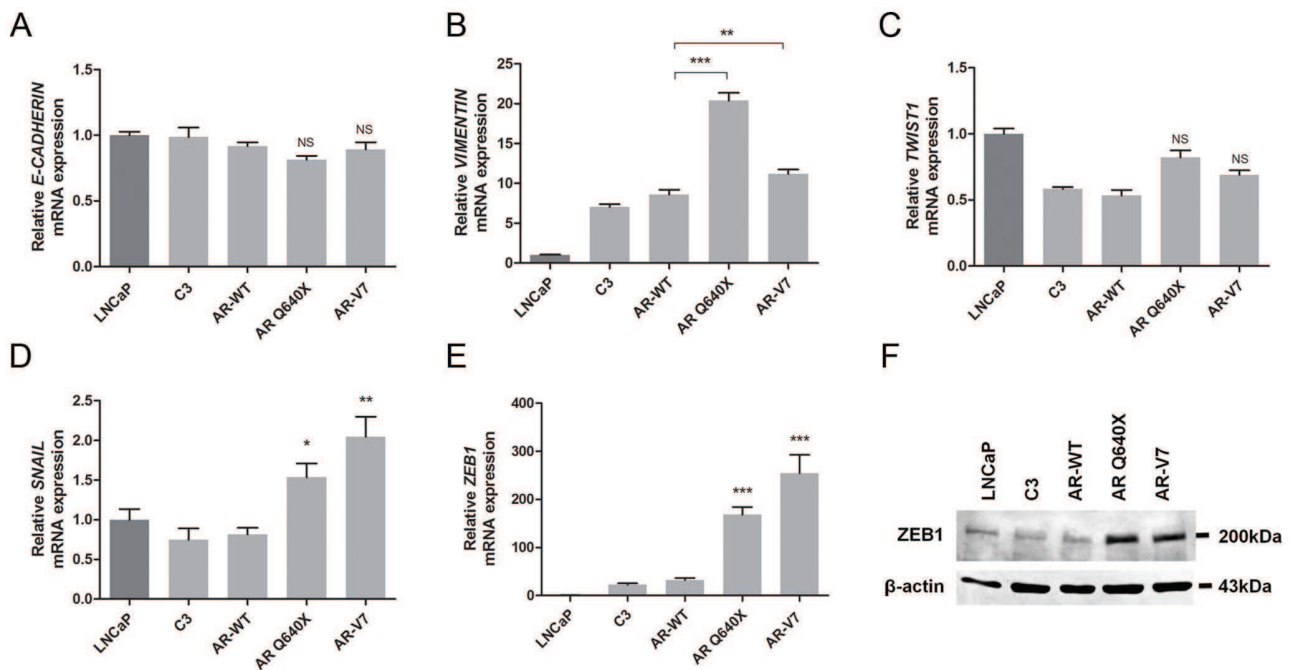
A). LNCaP cells were grown in RPMI-1640 containing 5% DCC-FCS and 100 nM of DHT or vehicle (EtOH). N-cadherin expression was analyzed by qRT-PCR in LNCaP cells 4 days after transfection with AR-WT or the constitutively active AR Q640X or AR-V7 expression plasmid. B). N-cadherin expression level in LNCaP cells was investigated by qRT-PCR 4 days after transfection with AR Q640X expression plasmid in the presence of different DHT concentrations (10 nM, 25 nM and 50 nM) or vehicle. C). N-cadherin expression induced by constitutively active AR variants (AR variants) was negatively regulated when LNCaP cells were grown in the presence of DHT. We hypothesize that endogenous AR-FL present in LNCaP cells and AR variants could act differently. In this model, DHT-stimulated endogenous AR-FL represses N-cadherin expression whereas AR variants upregulate its expression. D). LNCaP cells overexpressing AR-WT, AR Q640X and AR-V7 were cultured in DCC-FCS medium supplemented with 100 nM of DHT and in the presence of 100 nM of MDV3100 or DMSO as control during 3 days. N-cadherin expression was analyzed by qRT-PCR 4 days after transfection, and was normalized to  $\beta$ -ACTIN. The  $\Delta\Delta$ Ct method was used to calculate relative expression and each value was reported as the mean of  $\Delta\Delta$ Ct  $\pm$  SEM. NS: Not Significant \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ . doi:10.1371/journal.pone.0063466.g003

In this study, we have shown that N-cadherin is upregulated in LNCaP cells expressing constitutively active AR variants, but not in LNCaP cells overexpressing a full-length AR. These data suggest for the first time that constitutively active AR variants can induce N-cadherin expression. This finding should be connected to recent studies reporting a correlation between CRPC and N-cadherin upregulation [22,23,24]. Consistent with these studies, our data suggest that constitutively active AR variants signaling could be a mechanism leading to N-cadherin expression in CRPC.

These findings again highlight the link between AR signaling pathway and N-cadherin expression. Recent studies suggest that AR negatively regulates N-cadherin expression [22,23]. Indeed, N-cadherin upregulation is associated with a decreased expression of AR in castration-resistant PCa xenografts [23]. Furthermore, the upregulation of N-cadherin observed in the castration-resistant LNCaP-19 cells can be reversed in the presence of androgens [22,26,27]. In accordance with these data, we have shown that androgens were associated with a decreased N-cadherin expression in our model overexpressing a constitutively active androgen

receptor variant. These results suggest that AR-FL and constitutively active AR variants could act differently (Figure 3C). For example, DHT-stimulated AR-FL might recruit co-repressors and, in turn, represses N-cadherin expression. Besides, constitutively active AR variants lacking of carboxy-terminal region might behave differently and induce N-cadherin expression. Furthermore, AR-FL and constitutively active AR variants could compete with each other for regulating N-cadherin expression. Consistent with this hypothesis, N-cadherin gene contains a cluster of androgen response elements (ARE) repeats in intron 1 [28].

However, constitutively active AR variants could also indirectly control N-cadherin expression. For example, in prostate cancer, N-cadherin expression was associated with a nuclear translocation of Twist1 [29]. Although our data showed no significant difference in TWIST1 mRNA levels, constitutively active AR variants might enhance nuclear translocation of Twist1, which could in turn induce N-cadherin expression after binding to the E-box within the first intron of N-cadherin.



**Figure 4. Upregulation of mesenchymal markers by constitutively active androgen variants in prostate cancer cells.** LNCaP cells were transfected with the ARWT, ARQ640X or AR-V7 expression plasmid or the empty plasmid (C3). A). *E-CADHERIN*, B). *VIMENTIN*, C). *TWIST1*, D). *SNAIL* and E). *ZEB1* expression levels were analyzed by qRT-PCR at day-9 after transfection. For each sample, expression levels were normalized to *PBGD* or  $\beta$ -*ACTIN* and reported as relative value to LNCaP parental cell line. Values are presented as the mean of  $\Delta\Delta Ct \pm SEM$ . NS: Not Significant \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ . F). Western Blot showing evolution of *ZEB1* expression in LNCaP cells overexpressing constitutively active AR variants. Immunoblot from 100  $\mu$ g of total protein extracts.  $\beta$ -actin was used as loading control. doi:10.1371/journal.pone.0063466.g004

These hypotheses deserve to be studied in further studies to understand how constitutively active AR variants regulate *N-CADHERIN* expression.

In this study, we have also shown that constitutively active AR variants were associated with an increased expression of mesenchymal markers as *VIMENTIN*, *SNAIL* and *ZEB1*. These results are consistent with a recent study, which showed an increase of mesenchymal markers in tumors from patients treated with androgen deprivation therapy [24]. Taken together, our findings suggest that constitutively active AR variants could be associated with EMT process. However, these markers are not consistently associated with EMT. For example, *SNAIL* confers resistance to apoptosis to tumor cells exposed to ionizing radiations and genotoxic drugs, and enables breast cells to become tumor-initiating cells [30,31,32,33,34].

The expression of mesenchymal markers reported here in the presence of constitutively active AR variants was not associated with a downregulation of E-cadherin in our model. The inverse correlation between N-cadherin upregulation and E-cadherin downregulation is still debated. Indeed, McKeithen and colleagues, and more recently Tiwari and colleagues report a co-expression of both E- and N-cadherins in tumor cells [35,36]. In these studies E-cadherin protein displays a different subcellular localization. Moreover, the reported N-cadherin upregulation after castration in LNCaP-19 cells is not accompanied by a decrease of E-cadherin expression in *in vitro* cell culture [22]. Nevertheless, the expected E-cadherin downregulation in this model is only observed in orthotopic tumors after castration, but not in subcutaneous LNCaP-19 tumors, suggesting an important role of the surrounding prostatic environment for E-cadherin downregulation [22]. Besides, an inverse correlation between

castration-induced N-cadherin expression and E-cadherin down-regulation has been documented in LAPC9 and LuCaP35 subcutaneous xenografts models [23,24]. However, this cadherins switch has not been reported in two studies focusing on human clinical prostate tumors, from patients with or without androgen deprivation therapy [22,24].

Further studies are warranted to understand functional consequences of N-cadherin and other mesenchymal markers upregulation in the presence of constitutively active AR variants. N-cadherin expression is widely associated with tumor progression notably owing to its role in migration and invasion. Indeed, N-cadherin favors the migration of cancer cells via cytoskeleton reorganization and lamellipodia formation [14]. It also promotes the migration of cancer cells establishing homophilic interactions with neighboring tissues such as the stromal tissue or endothelium [37,38]. N-cadherin expression is also associated with survival in prostate cancer cells and melanoma cells. Indeed, N-cadherin expression can activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT pathway to inactivate pro-apoptotic proteins and to induce an increase of anti-apoptotic proteins as Bcl-2 [39,40]. Finally, a recent study showed that N-cadherin could mediate angiogenesis by inducing monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression via the PI3K/AKT pathway [41].

There is presently great interest in the mode of action of constitutively active AR variants in CRPC. In this study, we have shown for the first time that constitutively active AR variants induce N-cadherin expression and other mesenchymal markers in PCa. These findings support the hypothesis that these constitutively active AR variants could contribute to systemic dissemination of PCa cells, and reinforce the importance to target these AR variants in PCa.

## Supporting Information

**Figure S1 N-cadherin expression was upregulated in C4-2B cells in the presence of constitutively active AR variants.** N-cadherin expression was assessed by qRT-PCR in C4-2B cells overexpressing AR Q640X variant or transfected with empty plasmid (C3) 4 days after transfection. Parental C4-2B cells were used as control. *N-CADHERIN* expression was normalized to  $\beta$ -ACTIN and calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Results are presented as the mean of  $\Delta\Delta C_t \pm$  SEM from three independent experiments. *NS: Not Significant \* P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001.* (TIF)

**Figure S2 DHT activated AR-FL repressed N-cadherin expression induced by constitutively active AR variants.** 22Rv1 cells were cultured in complete medium supplemented with 100 nM and 1  $\mu$ M of MDV3100 or DMSO. N-cadherin

expression was analyzed by qRT-PCR four days after and was normalized to *PBGD*. The fold change was expressed as relative values to parental cell line 22Rv1 under normal condition. *NS: Not Significant \* P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001.* (TIF)

## Acknowledgments

We would like to thank Claudine Ebel (IGBMC, Illkirch, France) for her technical assistance for cell sorting, and Pr. Etienne Weiss (ESBS, Illkirch, France) for cell imaging.

## Author Contributions

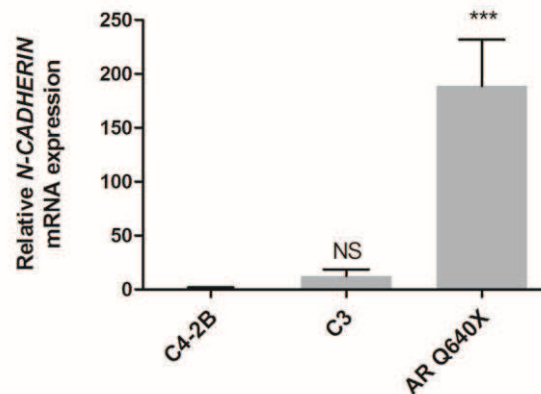
Conceived and designed the experiments: JC FC. Performed the experiments: FC IA EE. Analyzed the data: FC JC. Contributed reagents/materials/analysis tools: JEK JPB. Wrote the paper: FC JC.

## References

- Cunha GR, Riche W, Thomson A, Marker PC, Risbridger G, et al. (2004) Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 221–236.
- Ceraline J, Cruchant MD, Erdmann E, Erbs P, Kurtz JE, et al. (2004) Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer* 108: 152–157.
- Lapouge G, Erdmann E, Marcias G, Jagla M, Monge A, 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.
- Marcias G, Erdmann E, Lapouge G, Siebert C, Barthelemy P, et al. (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.
- Bergerat JP, Ceraline J (2009) Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat* 30: 145–157.
- Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ (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.
- Guo Z, Yang X, Sun F, Jiang R, Linn DE, 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.
- Hornberg E, Ylitalo EB, Crnalic S, Antti H, Stattin P, et al. (2011) Expression of Androgen Receptor Splice Variants in Prostate Cancer Bone Metastases is Associated with Castration-Resistance and Short Survival. *PLoS One* 6: e19059.
- Hu R, Dunn TA, Wei S, Isharwal S, Veltri RW, et al. (2009) Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 69: 16–22.
- Watson PA, Chen YF, Balbas MD, Wongvipat J, Socci ND, et al. (2010) Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16759–16765.
- Li Y, Chan SC, Brand LJ, Hwang TH, Silverstein KA, et al. (2013) Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 73: 483–489.
- Mostaghel EA, Marck BT, Plymate SR, Vessella RL, Balk S, et al. (2011) Resistance to CYP17A1 inhibition by abiraterone in castration-resistant prostate cancer: induction of steroidogenesis and androgen receptor splice variants. *Clin Cancer Res* 17: 5913–5925.
- Lapouge G, Marcias G, Erdmann E, Kessler P, Cruchant M, et al. (2008) Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 617: 529–534.
- Derycke LD, Bracke ME (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* 48: 463–476.
- Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 622–634.
- Kalluri R (2009) EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 119: 1417–1419.
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265–273.
- Voulgari A, Pintzas A (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 1796: 75–90.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, Ruijter ET, Jansen CF, et al. (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res* 60: 3650–3654.
- Clarke NW, Hart CA, Brown MD (2009) Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Asian J Androl* 11: 57–67.
- Jin JK, Dayyani F, Gallick GE (2011) Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer* 128: 2545–2561.
- Jennbacken K, Tesan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, et al. (2010) N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 17: 469–479.
- Tanaka H, Kono E, Tran CP, Miyazaki H, Yamashiro J, et al. (2010) Monoclonal antibody targeting of N-cadherin inhibits prostate cancer growth, metastasis and castration resistance. *Nat Med* 16: 1414–1420.
- Sun Y, Wang BE, Leong KG, Yue P, Li L, et al. (2012) Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res* 72: 527–536.
- Guyader C, Ceraline J, Gravier E, Morin A, Michel S, et al. (2012) Risk of hormone escape in a human prostate cancer model depends on therapy modalities and can be reduced by tyrosine kinase inhibitors. *PLoS One* 7: e42252.
- Gustavsson H, Welen K, Damber JE (2005) Transition of an androgen-dependent human prostate cancer cell line into an androgen-independent subline is associated with increased angiogenesis. *Prostate* 62: 364–373.
- Jennbacken K, Gustavsson H, Welen K, Vallbo C, Damber JE (2006) Prostate cancer progression into androgen independence is associated with alterations in cell adhesion and invasivity. *Prostate* 66: 1631–1640.
- Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, 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.
- Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, et al. (2006) N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res* 66: 3365–3369.
- de Herreros AG, Peiro S, Nassour M, Savagner P (2010) Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 135–147.
- Escriva M, Peiro S, Herranz N, Villagrasa P, Dave N, et al. (2008) Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 28: 1528–1540.
- Kajita M, McClintic KN, Wade PA (2004) Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 24: 7559–7566.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715.
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, et al. (2008) Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3: e2888.
- McKeithen D, Graham T, Chung LW, Otero-Marsh V (2010) Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate* 70: 982–992.
- Tiwari N, Meyer-Schaller N, Arnold P, Antoniadis H, Pachkov M, et al. (2013) Klf4 Is a Transcriptional Regulator of Genes Critical for EMT, Including Jnk1 (Mapk8). *PLoS One* 8: e57329.
- Berx G, van Roy F (2009) Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: a003129.

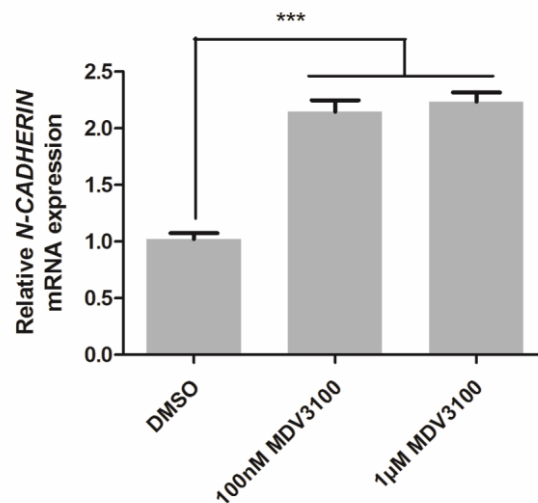
38. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148: 779–790.
39. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M (2001) N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 61: 3819–3825.
40. Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, Heimark RL (2002) Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 277: 32905–32914.
41. Nalla AK, Estes N, Patel J, Rao JS (2011) N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 317: 2512–2521.

## Supporting Information



**Figure S1.** *N-cadherin expression was upregulated in C4-2B cells in the presence of constitutively active AR variants.* N-cadherin expression was assessed by qRT-PCR in C4-2B cells overexpressing AR Q640X variant or transfected with empty plasmid (C3) 4 days after transfection. Parental C4-2B cells were used as control. *N-CADHERIN* expression was normalized to  $\beta$ -ACTIN and calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Results are presented as the mean of  $\Delta\Delta C_t \pm$  SEM from three independent experiments. NS: Not Significant \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0063466.s001



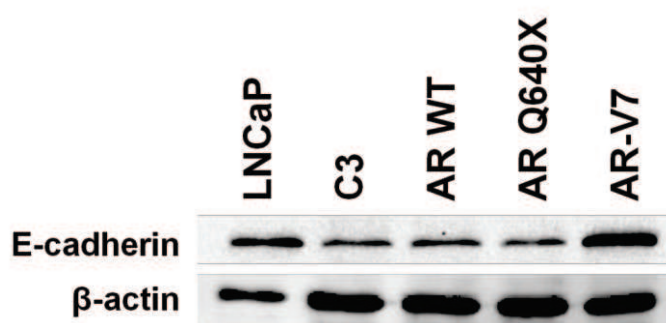
**Figure S2.** *DHT activated AR-FL repressed N-cadherin expression induced by constitutively active AR variants.* 22Rv1 cells were cultured in complete medium supplemented with 100 nM and 1  $\mu$ M of MDV3100 or DMSO. N-cadherin expression was analyzed by qRT-PCR four days after and was normalized to *PBGD*. The fold change was expressed as relative values to parental cell line 22Rv1 under normal condition. NS: Not Significant \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0063466.s002

## **Résultats complémentaires à l'article 1**

**La E-cadhérine et N-cadhérine sont co-localisées au niveau membranaire en présence des variants constitutivement actifs du RA.**

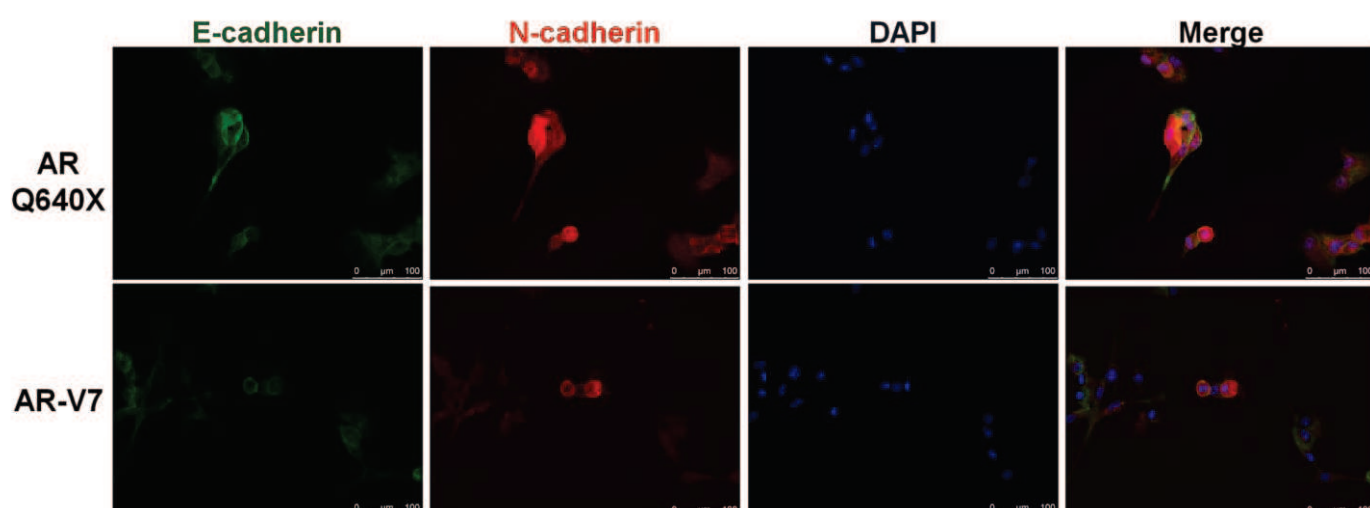
Les résultats présentés dans l'article montrent que les variants constitutivement actifs du RA ne sont pas associés à une diminution du niveau d'expression de la E-cadhérine au niveau transcriptionnel et protéique (Figure 4A de l'article et Figure 41).



**Figure 41 :** *Expression protéique de la E-cadhérine en présence des variants constitutifs du RA.*

Les cellules LNCaP ont été transfectées soit avec un plasmide d'expression du récepteur sauvage AR WT ou d'un variant constitutif du RA (AR Q640X et AR-V7) et 9 jours après transfection, le niveau d'expression de la E-cadhérine a été analysé par Western Blot. Les cellules LNCaP parentales ou transfectées avec un plasmide vide (C3) sont utilisées en contrôle.

Toutefois lors de l'EMT, l'expression de la E-cadhérine n'est pas nécessairement diminuée, mais peut être délocalisée au niveau du cytoplasme (McKeithen et al., 2010; Tiwari et al., 2013). Afin d'analyser la localisation subcellulaire de la E-cadhérine dans notre modèle, nous avons réalisé un double marquage de la E-cadhérine et de la N-cadhérine par immunofluorescence dans les cellules LNCaP exprimant les variants AR Q640X et AR-V7 (Figure 42). Comme attendu, une expression de la E-cadhérine et de la N-cadhérine est observée en présence des variants AR Q640X et AR-V7. Cependant, contrairement aux données de la littérature, dans notre modèle, ces deux cadhérines sont co-localisées au niveau membranaire.



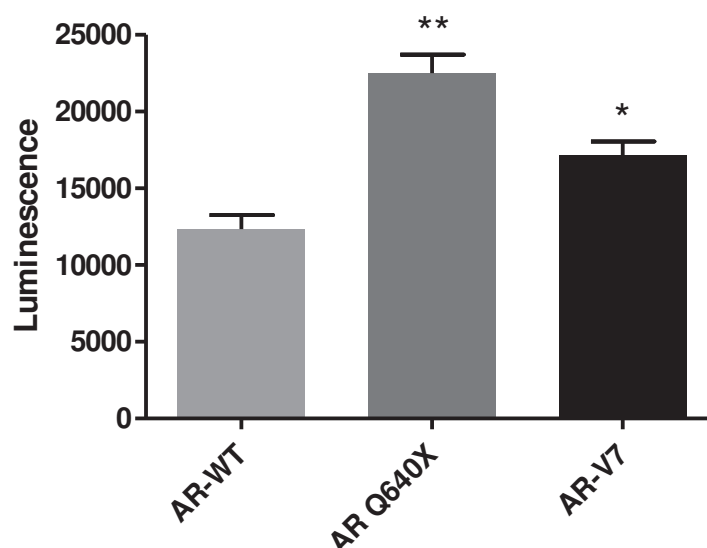
**Figure 42 :** Co-localisation de la E-cadhérine et N-cadhérine au niveau membranaire.

Les cellules LNCaP ont été transfectées avec un plasmide d'expression codant pour le variant constitutif AR Q640X ou AR-V7 et la localisation de la E-cadhérine et la N-cadhérine a été analysée par immunofluorescence 9 jours après transfection. La E-cadhérine et la N-cadhérine sont respectivement visualisées à l'aide d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (vert) et d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 568 (rouge).

Ainsi, l'ensemble de mes résultats montre que les variants du RA sont associés à une co-expression de marqueurs épithéliaux et de marqueurs mésenchymateux suggérant qu'ils pourraient induire une EMT partielle.

### **Les variants constitutivement actifs du RA sont associés à une augmentation de la migration des cellules LNCaP.**

Lors de l'EMT, les cellules acquièrent un phénotype particulier leur conférant des propriétés d'invasion et de migration (Polyak and Weinberg, 2009). Ainsi, il nous a semblé intéressant d'étudier l'impact des variants constitutifs du RA sur la migration cellulaire. Des cellules LNCaP exprimant soit le RA sauvage (AR-WT), ou les variants constitutivement actifs du RA (AR Q640X et AR-V7) ont été déposées au fond d'un insert non coâté dans du milieu sans sérum. Après 24h, le nombre de cellules ayant traversé la membrane poreuse a été quantifié par luminescence. Ces expériences, réalisées par Eva Erdmann au laboratoire, ont montré que les cellules LNCaP surexprimant les variants constitutivement actifs du RA sont associées à une capacité de migration augmentée comparée à des cellules LNCaP surexprimant un récepteur sauvage (Figure 43).



**Figure 43 : Augmentation de la migration en présence des variants constitutifs du RA.**

Les cellules LNCaP ont été transduites à l'aide de particules lentivirales conduisant soit à l'expression du récepteur sauvage (AR-WT), ou des variants constitutifs du RA (AR Q640X ou AR-V7). Après 11 jours d'infection,  $2 \times 10^5$  cellules LNCaP ont été déposées au fond d'un insert avec une membrane poreuse non coatée dans du milieu sans sérum de veau foetal (SVF). Un milieu contenant 10% de SVF est ajouté dans la chambre inférieure afin de favoriser la migration des cellules à travers la membrane. Après 24h d'incubation, le nombre de cellules ayant traversé la membrane est quantifié par luminescence à l'aide du kit CellTiter-Glo® (Promega). Les résultats sont présentés comme la moyenne de la luminescence de 4 séries d'expériences indépendantes. Pour chaque expérience indépendante, la luminescence a été mesurée dans 4 réplicats. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les différentes conditions sont comparées deux à deux à l'aide d'un test de Student.

\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## **Conclusion de l'article 1**

En conclusion, cette étude nous a permis de mettre en évidence que les variants constitutifs du RA sont associés à une expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, vimentine, SNAIL et ZEB1. Cependant, dans notre modèle, l'expression et la localisation de la E-cadhérine restent inchangées. Ainsi, les variants constitutivement actifs du RA sont associés à une co-expression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP. L'augmentation de la N-cadhérine en présence des variants constitutifs du RA a été également confirmée dans les cellules cancéreuses prostatiques C4-2B. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les variants du RA pourraient induire un programme d'EMT partielle.

De plus, les cellules LNCaP exprimant les variants constitutifs du RA présentent une capacité de migration plus importante que des cellules LNCaP exprimant un récepteur sauvage.

Aussi, nous avons mis en évidence que les androgènes conduisent à une diminution de l'expression de la N-cadhérine dans notre modèle suggérant que le récepteur AR-FL endogène activé par la DHT réprimerait l'expression de la N-cadhérine. Ainsi, ces résultats nous mènent à penser que l'AR-FL et les variants constitutifs du RA auraient un mode d'action différent et qu'ils pourraient entrer en compétition pour réguler l'expression de la N-cadhérine.

En conclusion, ces observations sont en faveur d'un impact des variants constitutifs du RA dans la dissémination métastatique et renforce l'importance de trouver de nouvelles thérapeutiques qui ciblent les variants constitutifs du RA.

## Article 2

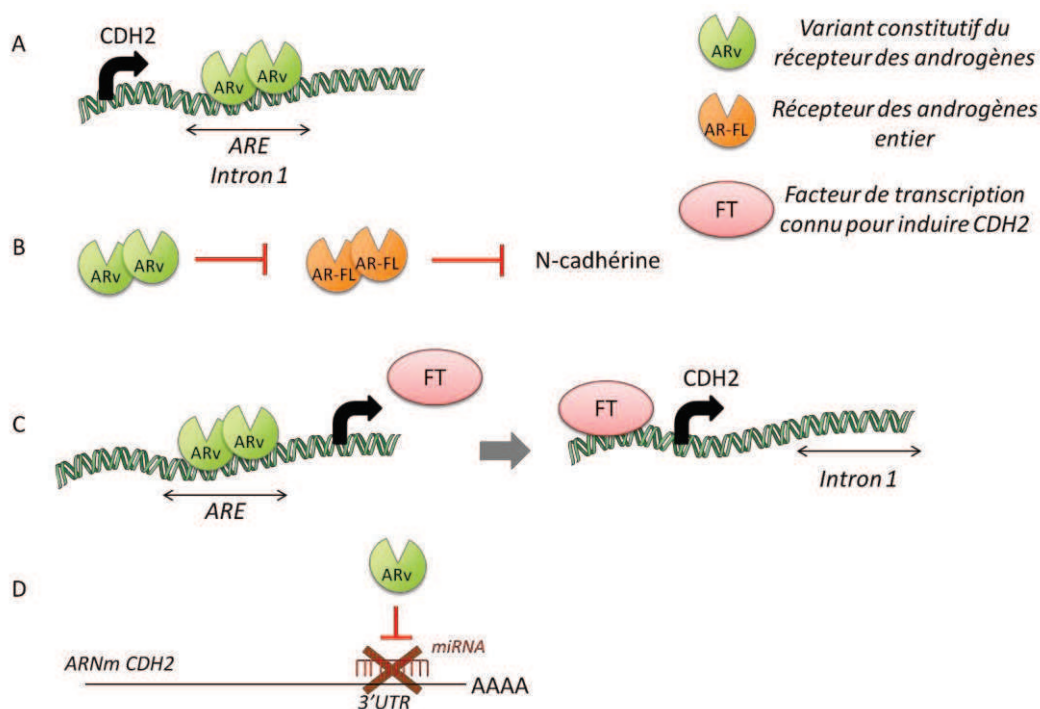
### Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer

**Félicie Cottard**, Pauline Berthélémy, Eva Erdmann, Irène Asmane, Frédérique Schaff-Wendling, Céline Keime, Tao Ye, Jean-Emmanuel Kurtz et Jocelyn Céraline

Article soumis.

Les travaux précédents ont mis en évidence que les variants constitutifs du RA sont associés à une induction des marqueurs de la progression tumorale. Ainsi, il nous a paru intéressant d'explorer les mécanismes conduisant à l'expression de ces marqueurs dans notre modèle en nous focalisant sur la N-cadhérine.

Nous avons d'abord montré à l'aide d'un variant incapable de se fixer à l'ADN que les variants constitutifs du RA nécessitent de lier l'ADN pour induire l'expression de la N-cadhérine. A partir de ces résultats, nous avons défini quatre mécanismes qui pourraient conduire à l'expression de la N-cadhérine en présence des variants du RA (Figure 44).



**Figure 44 :** Hypothèses de travail concernant la régulation de la N-cadhérine par les variants constitutifs du RA

CDH2 : N-cadhérine

Dans un premier temps, comme 13 AREs ont été mis en évidence dans l'intron 1 de la N-cadhérine (Takayama et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse que les variants constitutifs du RA pourraient directement lier ces motifs et induire l'expression de la N-cadhérine (A). Afin de répondre à cette question, des études d'immunoprécipitation de la chromatine au niveau de l'intron 1 de la N-cadhérine ont été réalisées. Dans un second temps, à la lumière des résultats de l'article précédent, nous avons envisagé que les variants constitutifs du RA pourraient diminuer l'expression de l'AR-FL et ainsi lever l'inhibition exercée par celui-ci sur l'expression de la N-cadhérine (B). Dans un troisième temps, nous avons recherché à l'aide d'une analyse de RNA-seq si les variants constitutifs du RA pourraient moduler l'expression de facteurs de transcription capables de réguler l'expression de la N-cadhérine (C). Enfin, comme l'EMT a été associée à un profil d'expression particulier de miRNA, nous avons envisagé que les variants constitutifs du RA pourraient réprimer l'expression de certains d'entre eux, ce qui, en retour, conduirait à une expression augmentée de la N-cadhérine (D). Une comparaison du profil d'expression des miRNA par miRNA-seq a donc été effectuée dans des cellules LNCaP surexprimant un récepteur sauvage ou un variant constitutif du RA.

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

Félicie Cottard<sup>1</sup>, Pauline Berthélémy<sup>1</sup>, Eva Erdmann<sup>1</sup>, Irène Asmane<sup>1</sup>, Frédérique Schaff-Wendling<sup>1,3</sup>, Céline Keime<sup>2</sup>, Tao Ye<sup>2</sup>, Jean-Emmanuel Kurtz<sup>1,3</sup> and Jocelyn Céraline<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> INSERM, UMR\_S1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, Strasbourg, 67000, France

<sup>2</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, INSERM, U596, CNRS, UMR-7104, Université de Strasbourg, Illkirch–Graffenstaden, 67404, France

<sup>3</sup> Service d'Onco-Hématologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, 67000, Strasbourg

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: + 33 3 6885 5452 ; Fax: + 33 3 6885 5452 ; Email: [ceraline@unistra.fr](mailto:ceraline@unistra.fr)

## ABSTRACT

Constitutively active AR variants appear to be critical for the development of castration resistant prostate cancer (CRPC). In addition to their role in CRPC, AR variants have been involved in epithelial mesenchymal transition (EMT). Indeed, a higher expression of EMT markers such as N-cadherin, vimentin and SNAIL has been associated with AR variants. However, the precise mode of action of AR variants in prostate cancer cells has never been investigated deeply. ChIP analysis, miRNA-seq and RNA-seq approaches have enabled us to decipher how AR variants could upregulate N-cadherin in CRPC cells. Our data reveal that the DNA binding capacity of constitutively active AR variants was fundamental. While wild type AR and AR variants can interact with the Androgen Response Elements present in intron 1 of the N-cadherin gene, a higher histone H4 acetylation of this region was observed in the presence of AR variants. Also, remarkably, the expression of AR variants in LNCaP results in a time-dependent decrease of the endogenous AR full-length (AR-FL) levels, known to act as a repressor of N-cadherin expression. Our data disclose unexpected mechanisms for N-cadherin and highlight the difference in the mode of action of AR variants and AR-FL in CRPC.

## INTRODUCTION

The androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor superfamily, is a ligand-dependent transcription factor controlling the development and the normal function of the prostate gland (1). The AR is also involved in the development of prostate cancer and current treatments for metastatic disease are based on the inhibition of androgen signalling pathway (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 prostate cancer (CRPC). To date, it is clearly accepted that the reactivation of the androgen/androgen receptor-signalling 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 androgen receptor (AR) variants (5–8).

Constitutively active AR variants are truncated proteins lacking the c-terminal region containing the ligand binding domain (LBD) and the activation function 2 (AF-2). These variants come from either nonsense mutations in exon 4 (e.g. AR Q640X) (7, 9–11) or alternative splicing with retention of a cryptic exonic sequence (e.g. AR-V7) (11–18) leading to a premature stop codon.

Recently, the expression of these AR variants in CRPC was also associated with the resistance to novel therapies such as enzalutamide and abiraterone acetate (19–22). Constitutively active AR variants play a key role in resistance to castration owing to their exclusive nuclear location and their ligand independent activity. Moreover, they support prostate cancer cells growth *in vitro* and *in vivo* in an androgen-depleted environment (15).

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, more and more studies suggest that constitutively AR variants are involved in tumor progression. In the first place, AR<sup>v567es</sup> induces autonomously prostate tumorigenesis and furthermore leads to invasive adenocarcinoma after castration (23). Moreover, our previous data show that AR variants are associated with a partial Epithelial Mesenchymal Transition (also termed as EMT *like*) as evidenced by the co-expression of epithelial and mesenchymal markers in prostate cancer 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 favouring tumor migration and invasion and increasing evidences have demonstrated a role of AR variants in prostate cancer 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 supporting that the full-length AR (AR-FL) and AR variants induce distinct transcriptional programs (27, 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.

In the present study, we explored the mechanisms leading to N-cadherin expression in the presence of constitutively active AR variants. As mentioned above, we have shown that AR variants induce N-cadherin expression (24). N-cadherin is involved in cell adhesion and promotes tumor progression owing to its role in cell migration, invasion and survival (31). Interestingly, as opposed to AR variants, ligand-activated AR-FL represses N-cadherin, suggesting that AR-FL and AR variants act differently to regulate N-cadherin expression (24). AR modulates gene transcription through two different modes of action. On the one hand, AR activates or represses the transcription of target genes by direct interaction with Androgen Response Elements (ARE). On the other hand, AR affects transcriptional activities of transcription factors such as SMAD3 or STAT3 without binding DNA through protein/protein interactions (32, 33). Here, we show that in our model, AR variants DNA binding is

mandatory for N-cadherin expression. We hypothesized that at least four mechanisms may be involved in N-cadherin upregulation in the presence of AR variants. In the first place, 13 AREs have been described in intron 1 of the N-cadherin *CDH2* gene (34). Hence, AR variants may directly regulate N-cadherin expression by interacting with these AREs. Secondly, AR variants may downregulate AR-FL in prostate cancer cells to relieve the inhibition of N-cadherin expression. Thirdly, AR variants may induce the expression of a transcription factor known to regulate N-cadherin expression. Finally, as AR-FL induces or represses miRNAs, AR variants may differentially modulate these miRNAs, potentially resulting in N-cadherin upregulation. 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 direct 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.

## MATERIAL AND METHODS

### Cell culture

LNCaP cells, clone FGC (ECACC) 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  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) and 1 mM pyruvate (Invitrogen). 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  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). PC3 cells were cultured in F12K medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich).

### 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'GCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACTATGGAGCTCTCACATATGGAAGCTCAA3' (NM\_000044.3; nucleotides 2784-2853) as the forward primer and a BamHI site-linked primer 5'CAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCCTTTCTTCAGGGTCTGGTCATTTTGAGATGCTTGCAATTGC3' (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 (11), 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 (34) 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'TATTATGGTACCACGGAGCCGCGGCGGGAGAGACCGC3' and the reverse primer incorporating Hind III restriction site 5'TATTATAAGCTTGGAGGCGGAGAGGGGCGGAGCGAAGA3' for *CDH2* promoter; the forward primer with BamHI restriction site 5'TATTATGGATCCTATAA GCGTGTTGCAGTCTCTGCTG3' and the reverse primer with Sall restriction site 5'TATTACGTCGACGGACAAAAATCTGGGTCAAAATCTGGG3' for ARE sequence. The amplicons were cloned by ligation into pGL4.14 vector between KpnI/HindIII and BamHI/Sall for *CDH2* promoter and ARE sequence respectively.

For lentiviral infection, the wild type androgen receptor (AR-WT), the constitutively active variants AR Q640X and AR-V7, or the variant AR-V7 C576Y were excised from previously described pEGFP-AR (10, 11) 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).

### Transient transfection

LNCaP cells were transfected as described previously according to the manufacturer's protocol (24). Briefly,  $2.5 \times 10^5$  LNCaP cells were seeded in 6-wells plates and transfected three days later with 3  $\mu$ g of pE-AR-V7 or pE-AR-V7-C576Y plasmid using 6  $\mu$ L 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).

For immunofluorescence assay, Lab-Tek II chamber slides (2 wells) were coated with FBS for 1 h and  $1.5 \times 10^5$  LNCaP cells/well were seeded. Three days later, LNCaP cells were transfected with 1  $\mu$ g of pEGFP-AR-V7 or pEGFP-AR-V7-C576Y using 4  $\mu$ L of lipofectamine 2000 (Invitrogen).

### Lentiviral transduction

Lentivirus expressing GFP, AR-WT, AR Q640X, AR-V7 and AR-V7 C576Y were prepared by co-transfecting  $6 \times 10^6$  HEK 293T with 9  $\mu$ g of packaging plasmids (pLP1, pLP2, and pLP/VSVG, ratio 1:1:1) and 3  $\mu$ g of pLenti-PGK-AR or 1  $\mu$ g pLenti-PGK-GFP as control using respectively 36  $\mu$ L or 30  $\mu$ 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 supernatant were filtered through a Millex-HV 0.45  $\mu$ 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 of DHT and 6  $\mu$ g/mL of polybrene (Sigma Aldrich) for 72 h.

## Luciferase assay

LNCaP cells ( $1,5 \times 10^4$ /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  $\mu$ L 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 or ethanol as vehicle. Firefly and renilla luciferase activities were measured 72 h after transfection using Dual-Glo Luciferase Assay according to the manufacturer's protocol (Promega).

## Immunofluorescence

Lab-Tek II chamber slides were transfected as described above and 24 h after transfection, cells were fixed with 2% paraformaldehyde. Nuclei were stained with 0,1  $\mu$ g/mL of DAPI solution for 20 min at 30°C. Slides were mounted with Dako fluorescence mounting medium (Dako) and were observed with LEICA DM5500B fluorescence microscope (Leica).

## 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 S1, 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.

For miRNA expression analysis, total RNA was extracted using TriPure Reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription of miRNA into cDNA was performed with miScript® II RT Kit (Qiagen). Briefly, a quantity of 2  $\mu$ g of total RNA was diluted in 12  $\mu$ L of water, mixed with 4  $\mu$ L of 5x miScript HiSpec Buffer, 2  $\mu$ L of 10x miScript Nucleics Mix and 2  $\mu$ L of miScript Reverse Transcriptase Mix and incubated 60 min at 37°C and 5 min at 95°C. The expression level of miR-26b-5p and miR-221-3p was determined using miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). For each reaction, 12,5  $\mu$ L of 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master mix, 2,5  $\mu$ L of 10x Universal Primer and 2,5  $\mu$ L of specific miScript Primer Assay (list of primers in Supplementary Table S1) were mixed with 2,5  $\mu$ L of 1:50 diluted cDNA. PCR reactions were run using LightCycler 480 (Roche Applied Sciences) following the program: 15 min at 95°C for activation of DNA polymerase followed by 40 cycles at 94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec and 70°C for 30 sec. For relative quantification, the quantity of target and endogenous reference *RNU6-2* in each sample was calculated generating a standard dilution curve for LNCaP cDNAs. Results were normalized dividing the amount of target by the amount of reference.

## 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 Sox9 (1:2000, catalog no. #AB5535, 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),  $\beta$ -actin (1:2000, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) or  $\beta$ -tubulin (1:4800, T2200, Sigma) 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) 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 analyse 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, 72 h after infection, LNCaP overexpressing AR-WT, AR variants or GFP 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. Then, 30  $\mu$ g of chromatin was immunoprecipitated with 5  $\mu$ g 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 analyse histone H4 acetylation in *CDH2* gene, 22,5  $\mu$ g of chromatin was incubated overnight with 10  $\mu$ g of Histone H4ac (pan-acetyl) antibody (n° 39925, Active Motif) or rabbit IgG isotype control (# 3900, Cell Signaling Technology).

ChIP DNA was analysed by real-time PCR using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). The primers used for DNA amplification are listed in Supplementary Table S2. 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 infected with lentivirus expressing AR-WT and AR-V7 in complete medium containing 10 nM of DHT. Three days after infection, total RNA was extracted using TriPure Reagent (Roche) according to the manufacturer's protocol. For RNA-seq analysis, three samples per condition were analysed. 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 (35) and the bowtie2 v2.1.0 aligner (36). Quantification of gene expression was performed using HTSeq v0.5.4p3 (37) using gene annotations from Ensemble release 75. The normalization of read counts across libraries was performed with the method proposed by Anders and Huber (38). For statistical analysis, comparison of samples was performed using the method proposed by Love et al. (39) 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 (40) (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](http://www.ingenuity.com), Qiagen).

## miRNA-seq analysis

RNA samples used for RNA-seq were also analysed 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/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). Only trimmed reads with a length between 15nt and 40nt were kept for the further analysis. Data analysis was performed according to published pipeline ncPRO-seq (41). Briefly, reads were mapped onto the Hg19 genome assembly with Bowtie v0.12.8 (42). The annotations were done with miRBase release 20 for the microRNAs, with Repbase for the repeats and with Rfam for the other small non-coding RNAs. The normalization and differential expression analyses were done with DESeq2 R package v1.0.12 (38) (GEO dataset GSE71335).

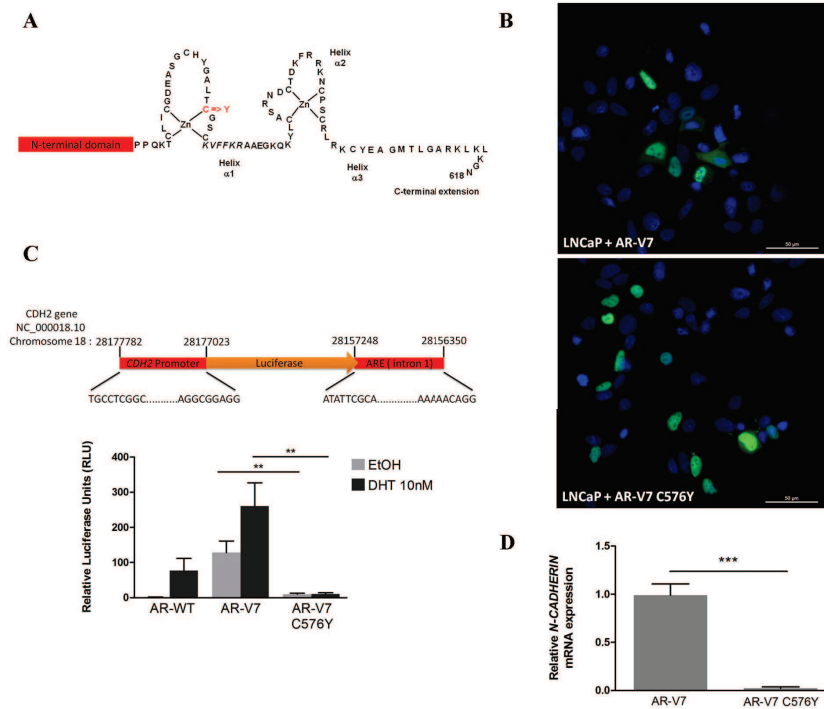
## Integrative Analysis

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 pvalue  $\leq$  0,05 and for the list of DEM, we have selected all the miRNA differentially expressed with adjusted pvalue  $\leq$  0,05. These two lists were separately uploaded in Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software ([www.ingenuity.com](http://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 analysis, only pairs of mRNA-miRNA with anticorrelated expression were selected.

## RESULTS

### N-cadherin upregulation requires AR variants DNA binding.

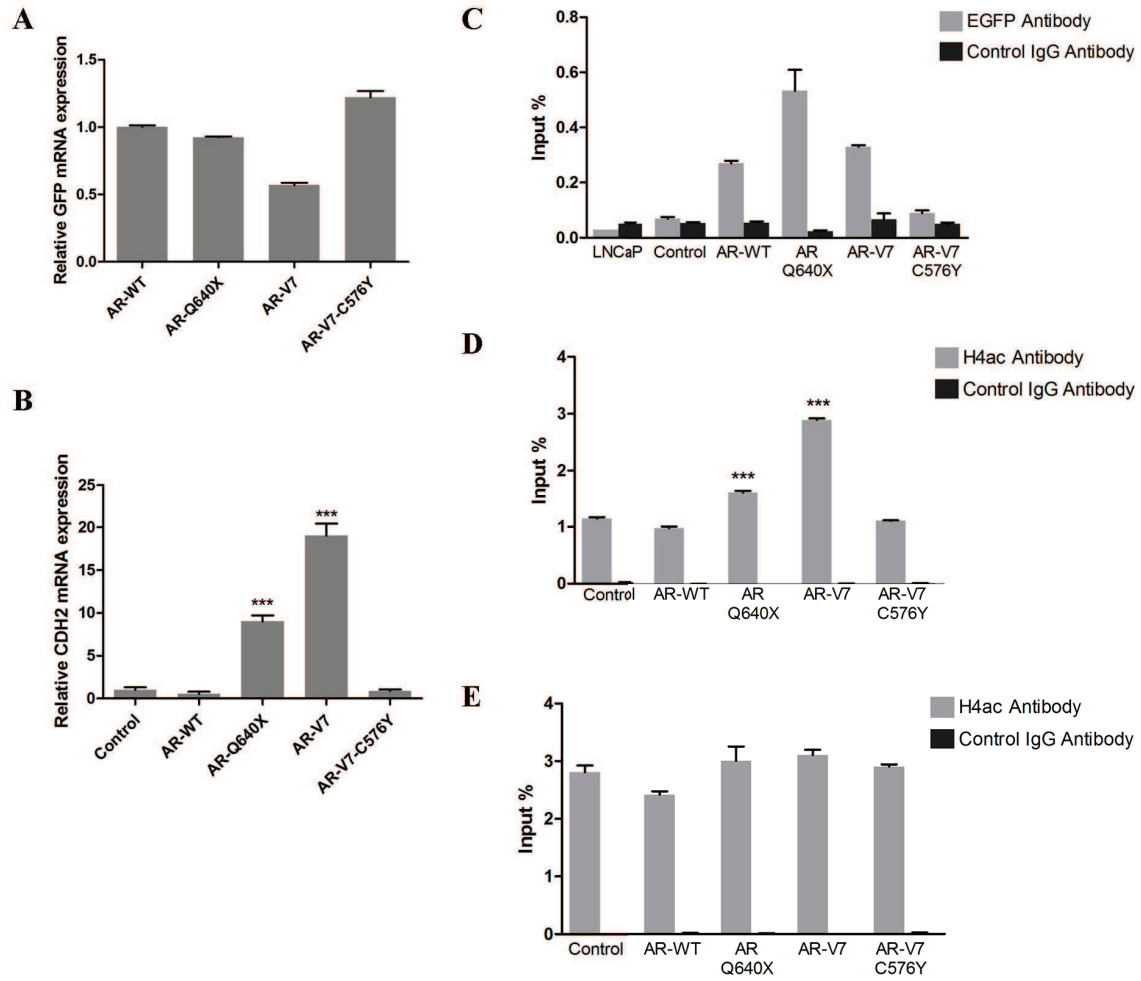
In order to analyse if AR variants need to bind DNA to induce N-cadherin expression, we constructed a variant unable to bind DNA. Indeed, we introduced a mutation in the DNA binding domain (DBD) substituting the cysteine at position 576 for a tyrosine (C576Y mutation) in AR-V7 sequence (Figure 1A). As previous studies showed that AR variants are constitutively located in the nucleus (9, 11–14, 18), we performed an immunofluorescence analysis in order to determine the subcellular distribution of the AR-V7 C576Y variant. In transfected 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 (Figure 1B). We further assessed the inability of AR-V7 C576Y mutant to bind DNA using the luciferase reporter pARE\_CDH2luc (Figure 1C). As expected, we observed a luciferase activity in LNCaP cells overexpressing AR-WT in the presence of dihydrotestosterone (DHT) but not in the presence of vehicle. Moreover, due to its ligand independent activity, AR-V7 variant was able to induce luciferase activity with or without DHT. By contrast, the variant AR-V7 C576Y was unable to induce a luciferase activity in both conditions confirming its inability to bind DNA (Figure 1C). Finally, we analysed N-cadherin expression in LNCaP cells overexpressing AR-V7 or AR-V7 C576Y by qRT-PCR. Interestingly, when LNCaP cells were transfected with the mutant AR-V7 C576Y, N-cadherin expression was totally abrogated (Figure 1D). Taken together, these results reveal that N-cadherin induction by AR variants requires their binding to DNA.



**Figure 1.** N-cadherin upregulation requires AR variants DNA binding. (A) Position of the C576Y mutation in the androgen receptor DNA binding domain. (B) Subcellular location of EGFP-AR-V7 or EGFP-AR-V7 C576Y assessed by fluorescence microscopy 24h after transient transfection of LNCaP cells. (C) LNCaP cells were cotransfected with pE-AR-WT, pE-AR-V7 or pE-AR-V7 C576Y and pARE\_CDH2luc plasmid (upper panel) and cultured in the presence of 10nM DHT or ETOH as vehicle. Luciferase activities were measured 72h after transfection (lower panel). The luciferase activity was normalized to the Renilla luciferase activity, and the results are presented as means  $\pm$  SEM. \*\* $P$  < 0.01. (D) N-cadherin (*CDH2*) expression was analysed by qRT-PCR in LNCaP cells expressing AR-V7 or AR-V7 C576Y. *CDH2* mRNA expression level was normalized to *PBGD* and reported as relative value to LNCaP expressing AR-V7. Relative expression is presented as means  $\pm$  SEM from three independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001.

### **AR variants bind Androgen Response Elements in intron 1 of *CDH2* to induce its expression.**

As there are 13 ARE repeats in intron 1 of *CDH2* (34), we hypothesized that AR variants could bind to these AR binding sites to induce N-cadherin expression. To answer to this question, we used lentiviral vector mediated AR overexpression in LNCaP cells. Indeed, LNCaP cells were transduced with lentivirus encoding for AR-WT, AR Q640X, AR-V7 and AR-V7 C576Y linked to EGFP. Parental cell line LNCaP and LNCaP overexpressing EGFP were used as control. Seventy-two hours after transduction, the mRNA level of EGFP-AR and N-cadherin was analysed by qRT-PCR (Figure 2A and B). As expected, after transduction, we observed an overexpression of EGFP mRNA level showing the overexpression of AR-WT, AR Q640X, AR-V7 and AR-V7 C576Y in transduced LNCaP cells (Figure 2A). Moreover, no expression of N-cadherin was observed in LNCaP cells overexpressing EGFP alone, AR-WT or AR-V7 C576Y. In accordance with our previous study, N-cadherin expression was increased by a 9-fold and 19-fold in the presence of AR Q640X and AR-V7 respectively compared to control (Figure 2B). In order to analyse if AR variants bind AREs in intron 1 of *CDH2*, we performed a ChIP analysis 72 hours after transduction using an EGFP antibody followed by real-time PCR. First, we verified by Western Blot the presence of AR transgene in the chromatin extracted from each condition (Supplementary Figure S1). Then, ARE enrichment in ChIP DNA was analysed by qPCR using specific primers. As expected, after normalization, the signal obtained in LNCaP overexpressing EGFP alone was comparable to the one obtained for control IgG antibody, demonstrating the specificity of the reaction. Moreover, both AR-WT and AR variants were recruited to AREs in intron 1. Interestingly, there was no recruitment of AR-V7 C576Y to AREs in intron 1 of *CDH2*. The signal obtained was close to controls (Figure 2C). These results reveal that both AR-WT and AR variants bind ARE repeats in intron 1 of N-cadherin. Hence, it seems that additional mechanisms are required to explain why only AR variants are associated with N-cadherin upregulation. So, to go further, we analysed histone H4 acetylation level, a mark of active chromatin, in AREs in intron 1 performing another ChIP experiment using an antibody targeting histone H4ac. As shown in figure 2D, histone H4 acetylation level at AREs in intron 1 was comparable in LNCaP cells overexpressing EGFP or AR-WT. Interestingly, the overexpression of AR Q640X and AR-V7 in LNCaP cells led to a 1.4 and 2.5 fold increase of H4 acetylation at AREs in intron 1 of *CDH2* compared to control. When it came to AR-V7 C576Y, the H4 acetylation level was comparable to the controls as expected. No significant variation of histone H4 acetylation at  $\beta$ -GLOBULIN promoter was detected suggesting that observed modifications were restricted to AR specific targets (Figure 2E). In conclusion, although AR-WT binds AREs in intron 1 of *CDH2*, this one was associated with an acetylation of histone H4 less important than AR variants. So, the binding of AR variants to AREs in intron 1 and the acetylation of histone H4 in this region are likely to induce N-cadherin in our model.

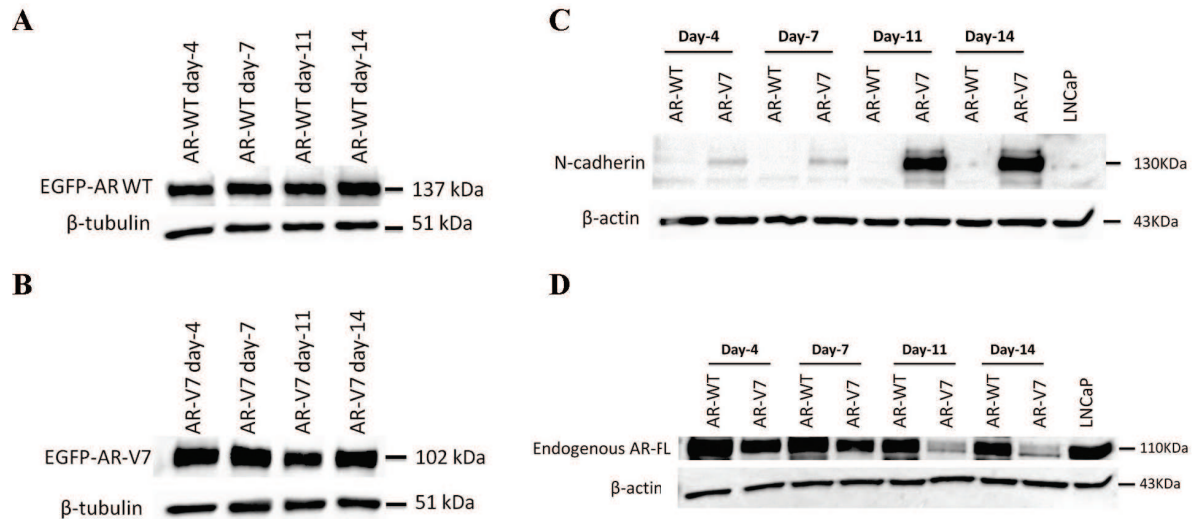


**Figure 2.** AR variants bind to ARE in intron 1 of *CDH2* and are associated with increased histone H4 acetylation. LNCaP cells were transduced with lentivirus expressing AR-WT, AR variants (AR Q640X; AR-V7 or AR-V7-C576Y) or EGFP (Control). After 72h, qRT-PCR was performed to verify the expression 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) Binding of AR-WT and AR variants to *CDH2* ARE was conducted by ChIP experiment using anti-EGFP antibody and analysed by real-time PCR. Acetylation level of *CDH2* ARE (D) and  $\beta$ -*GLOBULIN* promoter (E) was assessed by ChIP experiment using anti-Acetyl H4 (H4ac) antibody and examined by qRT-PCR with specific primers. Histone H4 acetylation level to the *CDH2* ARE and  $\beta$ -*GLOBULIN* promoter was normalized by input. Control IgG antibody was used to determine the specificity of the reaction. LNCaP cells and LNCaP overexpressing EGFP (Control) were used as control. All results represent at least three independent experiments. \*\*\* $P < 0.001$ .

### The loss of AR-FL in the presence of AR variants could boost N-cadherin upregulation.

According to previous results both AR-FL and AR variants bind AREs in intron 1 of *CDH2* but they seem to have a different mode of action for regulating N-cadherin expression. Moreover, our previous work showed that endogenous DHT-activated AR-FL in LNCaP cells and AR variants antagonize each other's activities in the control of N-cadherin (24). Therefore, we investigated how AR variants could overcome the effect of AR-FL on N-cadherin expression in our model. Using Western Blot, we evaluated the kinetics expression of N-cadherin and endogenous AR-FL in LNCaP cells in the presence of AR-WT and AR-V7 (Figure 3A-B). As expected, in the presence of AR-V7, N-cadherin expression was increased from day-4 after transduction (Figure 3C). Interestingly, N-cadherin

upregulation was concomitant with gradual loss of endogenous AR expression. The decrease of endogenous AR expression was only observed in LNCaP overexpressing AR-V7 but not in the presence of AR-WT (Figure 3D). So, all together, these results suggest that the loss of endogenous AR-FL in LNCaP cells overexpressing AR variants could contribute to the observed N-cadherin upregulation.



**Figure 3.** The expression of AR variants is associated with a loss of endogenous AR-FL. A time course experiment was performed in LNCaP cells expressing AR-WT and AR-V7 in fusion with EGFP from 4 to 14 days after transduction. Immunoblot analysis showing transduction efficiency with AR-WT (A) and AR-V7 (B). The bands corresponding to EGFP-AR-WT and EGFP-AR-V7 were respectively detected at 137 kDa and 102 kDa. N-cadherin (C) and endogenous AR-FL (D) protein expression were assessed by immunoblot analysis. Endogenous AR-FL was detected using a specific antibody targeting the C-terminal extremity of AR (AR-C19 antibody). β-tubulin and β-actin were used as a loading control.

### AR variants regulate transcription factors known to control N-cadherin expression.

We next investigated whether AR variants could directly deregulate N-cadherin transcriptional regulators. As few transcription factors are described to regulate N-cadherin expression, we performed an RNA-seq experiment in LNCaP cells overexpressing AR-WT or AR-V7 followed by IPA analysis to identify potential regulators of N-cadherin. 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 a p-value adjusted 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 S2). 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 transcription factors with known binding sites in *CDH2* gene and with a differential expression in the presence of AR-V7 compared to AR-WT. The list of these differentially expressed transcription factors is shown in Figure 4A. Then, we analysed

our data with IPA software and identified a network in which ETV5 was a direct regulator of N-cadherin in our model (Figure 4B). As SOX9 and ETV5 are described in literature as N-cadherin regulators, we focused on these genes for further experiments. According to RNA-seq quantification, a 3.6-fold and 4.7-fold increase of SOX9 and ETV5 respectively were observed in the presence of AR-V7 compared to AR-WT. Thereafter, we used a doxycycline system approach to verify the expression level of SOX9 and ETV5 in LNCaP cells overexpressing AR-WT and the AR variants (Supplementary Methods and Supplementary Figure S3). Using qRT-PCR, an increase in ETV5 expression was observed in the presence of AR variants compared to AR-WT. However, this expression was weak compared to PC-3 cells known to express ETV5 (Figure 4C). Moreover, ETV5 was not detected in immunoblots from LNCaP cells overexpressing AR variants compared to PC3 cells (data not shown). SOX9 mRNA level was increased following doxycycline induction but this upregulation was less important for AR variants compared to AR-WT and PC3 cells (Figure 4D). The previously described basal expression of SOX9 was noticeable in LNCaP in the absence of doxycycline (Figure 4E) (43). Upon doxycycline induction, SOX9 protein level increased only with AR variants (Figure 4E). This increase of SOX9 expression matched CDH2 upregulation (Figure 4F). However, further analyses are required to clearly demonstrate the potential link between SOX9 and CDH2 in our model as reported in chondrocytic CFK2 cells (44). Meanwhile, although SOX9 was expressed in the presence of AR-WT, it was not associated with CDH2 upregulation, suggesting that other mechanisms are involved in N-cadherin regulation by AR variants.

#### **MiR-221-3p and miR-26b-5p are not involved in N-cadherin upregulation in our model.**

MicroRNA deregulation could be one mechanism that link AR variants to N-cadherin expression. Indeed, microRNA 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 to identify deregulated microRNA in the presence of AR variants. This analysis highlighted 12 downregulated microRNA and 24 upregulated microRNA in the presence of AR-V7 compared to AR-WT with an adjusted pvalue  $\leq 0.05$  (Figure 5A-B).

First, we checked if microRNA known to directly regulate N-cadherin were modulated by the presence of AR. To date, few microRNAs are described as direct regulator of N-cadherin expression. For example, miR-218 is one of them and regulates directly N-cadherin expression in aggressive lung adenocarcinoma (45). miR-369-3p, miR-496 and miR-543 are also direct regulator of N-cadherin during neurogenesis and neuronal migration (46). However, according to our miRNA-seq, the expression of miR-218, miR-369-3p, miR-496 and miR-543 is not affected by the overexpression of AR variants in LNCaP cancer cells.

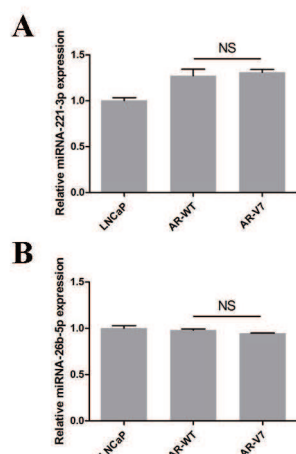


To go further in our analysis, we performed an integrative analysis between the RNA-seq and miRNA-seq using "micro RNA target filter" in IPA software to search for potential targets of microRNA and suggest a list of mRNA-microRNA pairs. Because microRNAs negatively regulate the expression of mRNA, we have selected only pairs with an anticorrelated expression pattern. Finally, we have obtained 75 potential pairs for upregulated microRNA and 279 pairs for downregulated microRNA (Figure 5A-B).

In particular, the miRNA-seq analysis revealed that miR-221-3p and miR-26b-5p could regulate N-cadherin expression. However, the expression of miR-221-3p and miR-26b-5p is 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. Indeed, no difference of miR-221-3p and miR-26b-5p was observed in the presence of AR variants compared to AR-WT (Figure 6A-B). Taken together, these results reveal that neither miR-221-3p nor miR-26b-5p is involved in N-cadherin upregulation in our model.

| A                 |                                            |                                                                                  | B                   |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Upregulated miRNA | Number of anti correlated pairs mRNA-miRNA | Name of targets                                                                  | Downregulated 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-100-5p      | 8                                          | FKBP5, GPR26, GRHL1, IGF1R, PCSK9, PNLRP3, PTTPRN2, SCNN1G                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| hsa-miR-129-5p    | 2                                          | CAMK2N1, MAN1A1                                                                  | hsa-miR-1247-3p     | NA                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-455-5p    | 5                                          | CD274, EXPH5, MAN1A1, PLCXD3, PLD1                                               | hsa-miR-10a-5p      | 15                                         | ANKRD1, B3GNT5, CASK, CECR6, CHST3, DCAF4L1, GPR26, IGDC4, ITGB2, NR5A2, NYAP1, RNF112, SLC6A19, SSX2IP, TMEM132B                                                                                                                                                                                                                                   |
| hsa-miR-7705      | NA                                         |                                                                                  | hsa-miR-767-5p      | 19                                         | ACSM5, AHNK, ANXA2, COL2A1, KLF6, LOX, MUC7, NECAB2, OPRL1, PAPLN, PLCL1, PXYLP1, TM4SF18, TMEM56, TPBG, TPM1, TRANK1, TTL6, UVRAG                                                                                                                                                                                                                  |
| 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                                          | LRRC31, PLCXD3, SFRP1, SRGAP3, SYT4                                              | hsa-miR-221-3p      | 24                                         | AJAP1, ANXA1, APOLD1, BEAN1, CACNB4, CASR, CBWD1, CDH2, CDKN1C, CHST3, CTSE, FOS, IGDC4, KDR, KIF16B, MYOD1, PMEP1, SLC40A1, SPOCK1, TIPARP, TMEM132B, TMEM132C, TPBG, TRPC3                                                                                                                                                                        |
| hsa-miR-4510      | 6                                          | FAM131B, IL1RN, KRT75, NKAIN1, PLCXD3, PTGES                                     | hsa-miR-125a-5p     | 39                                         | ABLM3, ASB11, ATOH8, C6orf223, CDKN2B, CXCL13, DCAF4L1, DUOX1, FAM129B, FLG, GP2, GPR153, GRHL1, HMGB3, ID1, ID2, KCN1, KIAA1644, KRT19, LIFR, LRRC8A, MAF, MMP25, PSAPL1, RET, RP1, SCN5A, SFRP5, SLA2, SLC37A2, SLC02A1, SNX33, SP6, SPSB1, THY1, TMEM37, USP2, UVRAG, ZNF80                                                                      |
| hsa-miR-210-3p    | 1                                          | ANTXR1                                                                           |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-5690      | NA                                         |                                                                                  |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-30b-3p    | 4                                          | CECR1, OR51E1, PTGES, TMEM178A                                                   | hsa-miR-30e-5p      | 49                                         | ADRA2B, AHNK, AP3S1, ATRNL1, B3GNT5, BEAN1, C1orf168, CD80, CECR6, CELF3, CTGF, DLL4, ELL2, ELMO1, 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, TRPC50S, USP2 |
| hsa-miR-744-3p    | 1                                          | IL36RN                                                                           | 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, PXYLP1, RASD1, RUNX1, SLC40A1, SLC41A1, SMOC1, SSX2IP, STOM, TENM1, TGM2, TLE4, TTR, UBE2QL1, VCL, VLDLR                                                                                                |
| hsa-miR-30d-3p    | 1                                          | AQP4                                                                             |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-1180-3p   | 1                                          | C6orf222                                                                         | hsa-miR-30a-5p      | 49                                         | ADRA2B, AHNK, AP3S1, ATRNL1, B3GNT5, BEAN1, C1orf168, CD80, CECR6, CELF3, CTGF, DLL4, ELL2, ELMO1, 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, TRPC50S, USP2 |
| hsa-miR-21-3p     | 2                                          | NKAIN1, PEG3                                                                     | hsa-miR-191-5p      | 9                                          | AJAP1, CASK, CBFA2T3, DNABJ3, F5, LRRC8A, PCSK9, PLXNA4, SLA                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| hsa-miR-30d-5p    | 11                                         | BEST4, CAMK2N1, CHST2, CNGB3, FAM131B, NAV3, PLCXD3, SLC30A4, SRGAP3, SYT4, TLL1 | hsa-miR-26b-5p      | 32                                         | ACSL3, ATP1A2, B3GNT5, BHLHE40, CACNB4, CDH2, CDKN1C, CHST3, CTGF, FMO5, FRMD4B, GPR146, HS6ST1, INSR, KIF16B, LIFR, MAP1A, NAMPT, NID1, NTN4, PLAG1, PLCL1, PLOD2, PPM1B, PXYLP1, SCN5A, SLC2A3, SSX2IP, TM4SF18, TMEM56, TRPC3, UBE2QL1                                                                                                           |
| hsa-miR-30b-5p    | 11                                         | BEST4, CAMK2N1, CHST2, CNGB3, FAM131B, NAV3, PLCXD3, SLC30A4, SRGAP3, SYT4, TLL1 | hsa-miR-125b-2-3p   | NA                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-324-3p    | 7                                          | C1orf95, FAM131B, FAM221B, NKAIN1, PLD1, SH2D3C, SRGAP3                          | Total               | 279                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-23b-3p    | 5                                          | LRRC31, PLCXD3, SFRP1, SRGAP3, SYT4                                              |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-941       | 2                                          | GLP1R, SFRP1                                                                     |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| hsa-miR-1307-3p   | 1                                          | MAN1A1                                                                           |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Total             | 75                                         |                                                                                  |                     |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

**Figure 5.** 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 micro-RNA. Targets of upregulated (A) and downregulated (B) micro-RNA are listed in the following table.



**Figure 6.** Expression of miR-221-3p and miR-26b-5p was not changed in the presence of AR variants. Expression level of miR-221-3p (A) and miR-26b-5p (B) was analysed in LNCaP cells overexpressing AR-WT and AR-V7. LNCaP parental cell line was used as control. Amounts of miR-221-3p, miR-26b-5p and internal control RNU6-2 were determined with a standard curve generated from LNCaP cDNA. The quantity of miR-221-3p and miR-26b-5p was normalized to the quantity of internal control RNU6-2. The results are representative of three independent experiments. NS: Not Significant.

## 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 (9–16, 18). Moreover, during these last years several data suggest 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 vitro* and *in vivo* models (23–25). Furthermore, RNA-seq data reveal that AR variants regulate a subset of genes preferentially involved in cell cycle (30, 47). However, the mechanisms associated with this distinct expression profile are poorly studied. So, in the present study, we have explored by which mechanisms AR variants induce this distinct subset of gene by focusing our research on N-cadherin expression.

In the first place we showed that the DNA binding capacity of the AR variants was a pre-requisite for N-cadherin upregulation. From this observation we hypothesized that AR variants could directly regulate CDH2 gene expression or act indirectly by deregulating the expression of N-cadherin regulators including transcriptional factors and/or miRNAs.

Several AREs have been described in intron 1 of the *CDH2* gene (34). Our data from ChIP experiments evidenced that both AR-WT and AR variants were able to bind to these regulatory elements. This observation confirms the ChIP-seq analysis performed in 22rv1 CRPC cells showing an enrichment of AR variants in this region. However, in this study, binding sites of AR-FL were not defined (48). In accordance with our data, another ChIP-seq analysis supports the concept that the genome-wide binding preference of AR variant ARv567es is the same that androgen-activated AR-FL (49). However, our ChIP experiment data allow us to highlight a remarkably difference between AR-FL and AR variants following their binding to AREs. In our LNCaP cells model, 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 about the mode of action of AR variants in prostate cancer cells. Both AR-FL and AR variants could bind to the same regulatory region, but the signal triggered could be different. In the context of *CDH2* gene, AR variants binding is a positive signal for gene transcription, while alone, AR-FL would repress *CDH2* gene expression. Indeed, AR variants could be involved in a transcriptional activation complex by the recruitment of histone acetyltransferase (HAT) to induce N-cadherin expression. By contrast, AR-FL could belong to a transcriptional repressor complex. 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 (50). Consistent with this hypothesis, the recruitment of co-activator GRIP-1 was impaired in the presence of AR variant Q640X (51).

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 (24). However, we have shown here that AR variants were associated with a decrease of endogenous AR-FL in our LNCaP cells model. This decrease was also reported in a prior

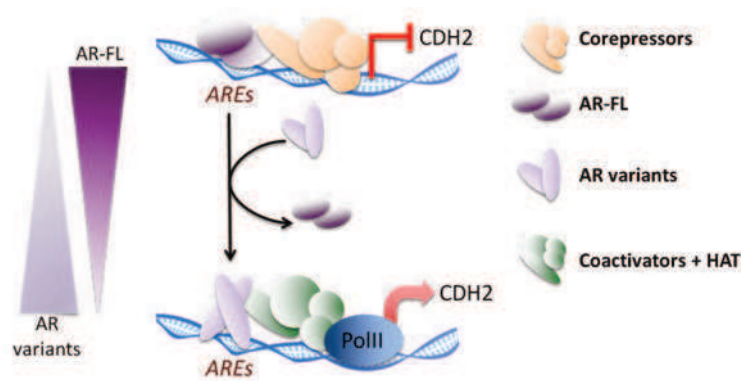
study showing a decrease of AR-FL in function of the quantity of AR variants in LNCaP cells (27). Moreover, the AR-FL loss in our model was concomitant with the upregulation of N-cadherin. So, the decrease of AR-FL induced by AR variants could also contribute to N-cadherin upregulation in our model. Taken together, our results led us to propose the following model (Figure 7). The loss of AR-FL induced by AR variants could be additive to the competition for AREs binding in intron 1 of *CDH2*. Further analyses need to be performed to validate this model and to understand how AR variants could induce a decrease of endogenous AR-FL prostate cancer cells.

Using RNA-seq analysis, we identified ETV5 and SOX9 as potential regulator 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 (52). Moreover, SOX9 could regulate N-cadherin by interacting with *CDH2* promoter (44). Also, there are 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. Besides a faint immunological band was retrieved in the ETV5 positive prostate cancer PC3 cells (data not shown). So, we conclude that ETV5 could not be the leading transcription factor induced by AR variants to upregulate N-cadherin expression. On the contrary, SOX9 protein expression level was increased in the presence of AR variants, suggesting that SOX9 could potentially upregulate N-cadherin in an AR variants-dependent manner. Nevertheless, further analyses need to be performed to demonstrate the potential link between N-cadherin and SOX9. Moreover, SOX9 is expressed in parental LNCaP cells or LNCaP transduced with AR-WT alluding to a supplementary mechanism is required to explain the upregulation of N-cadherin in the presence of AR variants. SOX9 regulates transcription of target genes by forming complexes with other transcription factors, and depending on the target sites or partner factors, SOX9 is associated with either transcriptional activation or repression (53). So, it is possible that partners interacting with SOX9 are different in LNCaP cells overexpressing AR-WT and AR-V7, and our data do not exclude that possibility. 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 reveals an upregulation of ETV5, but not SOX9 (30). In the contrast, ETV5 and SOX9 were not affected by AR-V7 knockdown in CWR-R1 and 22Rv1 cancer cells (15). Likewise, the overexpression of a truncated AR variant in LNCaP cells was not associated with an overexpression of these transcription factors (27).

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 miRNA-seq analysis was not confirmed by qRT-PCR. The link between these two

microRNA 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 study. Nevertheless, in hepatocellular cancer cells, miR-26b-5p could regulate Epithelial Mesenchymal Transition. Indeed, its overexpression is associated with an increase of E-cadherin expression and a decrease of vimentin expression. However, the authors don't analyse N-cadherin expression in the presence of miR-26b-5p (54). In contrast, miR-221-3p is rather overexpressed in cancer and its expression is associated with a more proliferative and invasive phenotype (55, 56). In the presence of AR variants, only miR-100-5p and miR-1247-3p were downregulated (> 1.5-fold). However, their impact on N-cadherin expression is unknown. In conclusion, our findings are not in favour of N-cadherin regulation by microRNA in our model.

In summary, in this study we bring evidence that N-cadherin upregulation in prostate cancer cells appears to result from the direct 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.



**Figure 7.** 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* and represses N-cadherin expression by recruiting a transcriptional repressor complex. In contrast, AR variants binds also ARES, but 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 relieve the

inhibitory effects of AR-FL and thus, potentiate the effects of AR variants on N-cadherin expression.

## ACKNOWLEDGEMENT

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 Martianov at the IGBMC for their support for ChIP experiments.

## 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,G.R., Ricke,W., Thomson,A., Marker,P.C., Risbridger,G., Hayward,S.W., Wang,Y.Z., Donjacour,A. a and Kurita,T. (2004) Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **92**, 221–36.
2. Perlmutter,M.A. and Lepor,H. (2007) Androgen Deprivation Therapy in the Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Rev. Urol.*, **9**, S3 – S8.
3. 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**, 981–91.
4. Sharifi,N., Gulley,J.L. and Dahut,W.L. (2005) Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA*, **294**, 238–44.
5. Feldman,B.J. and Feldman,D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 34–45.
6. Karantanos,T., Evans,C.P., Tombal,B., Thompson,T.C., Montironi,R. and Isaacs,W.B. (2015) Understanding the Mechanisms of Androgen Deprivation Resistance in Prostate Cancer at the Molecular Level. *Eur. Urol.*, **67**, 470–479.
7. Bergerat,J.P. and Céraline,J. (2009) Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum. Mutat.*, **30**, 145–157.
8. Devlin,H.L. and Mudryj,M. (2009) Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.*, **274**, 177–186.
9. 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**, 152–7.
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**, 1238–44.
11. Marcias,G., Erdmann,E., Lapouge,G., Siebert,C., Barthélémy,P., Duclos,B., Bergerat,J.-P., Céraline,J. 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.
12. Watson,P. a, Chen,Y.F., Balbas,M.D., Wongvipat,J., Socci,N.D., Viale,A., Kim,K. and Sawyers,C.L. (2010) Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 16759–16765.
13. Sun,S., Sprenger,C.C.T., Vessella,R.L., Haugk,K., Soriano,K., Mostaghel,E.A., Page,S.T., Coleman,I.M., Nguyen,H.M., Sun,H., *et al.* (2010) Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J. Clin. Invest.*, **120**, 2715–2730.
14. Hu,R., Dunn,T. a, Wei,S., Isharwal,S., Veltri,R.W., Humphreys,E., Han,M., Partin,A.W., Vessella,R.L., Isaacs,W.B., *et al.* (2009) Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.*, **69**, 16–22.

15. 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.
16. 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**, 5469–77.
17. 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**, e19059.
18. Hu,R., Isaacs,W.B. and Luo,J. (2011) A Snapshot of the Expression Signature of Androgen Receptor Splicing Variants and Their Distinctive Transcriptional Activities. *Prostate*, **71**, 1656–1667.
19. 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.
20. Nadiminty,N., Tummala,R., Liu,C., Yang,J., Lou,W., Evans,C.P. and Gao, a C. (2013) NF-kappaB2/p52 induces resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer: Role of androgen receptor and its variants. *Mol. Cancer Ther.*, **12**, 1629–1637.
21. Li,Y., Chan,S.C., Brand,L.J., Hwang,T.H., Silverstein,K. a T. and Dehm,S.M. (2013) Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.*, **73**, 483–9.
22. 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.
23. Liu,G., Sprenger,C., Sun,S., Epilepsia,K.S., Haugk,K., Zhang,X., Coleman,I., Nelson,P.S. and Plymate,S. (2013) AR variant ARv567es induces carcinogenesis in a novel transgenic mouse model of prostate cancer. *Neoplasia*, **15**, 1009–1017.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Tsai,H.C., Boucher,D.L., Martinez,A., Tepper,C.G. and Kung,H.J. (2012) Modeling Truncated AR Expression in a Natural Androgen Responsive Environment and Identification of RHOB as a Direct Transcriptional Target. *PLoS One*, **7**, e49887.
28. Kalluri,R. and Weinberg,R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.*, **119**, 1420–1428.

29. Voulgari,A. and Pintzas,A. (2009) Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim. Biophys. Acta*, **1796**, 75–90.
30. 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.
31. Derycke,L.D.M. and Bracke,M.E. (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.*, **48**, 463–76.
32. 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.
33. 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- $\beta$  signaling through interaction with Smad3. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1240–1248.
34. 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**, 4453–63.
35. 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. *Genome Biol.*, **14**, R36.
36. Langmead,B. and Salzberg,S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, **9**, 357–359.
37. Anders,S., Pyl,P.T. and Huber,W. (2014) HTSeq A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**, 166–169.
38. Anders,S. and Huber,W. (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.*, **11**, R106.
39. 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**.
40. Benjamini,Y. and Hochberg,Y. (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289–300.
41. Chen,C.J., Servant,N., Toedling,J., Sarazin,A., Marchais,A., Duvernois-Berthet,E., Cognat,V., Colot,V., Voinnet,O., Heard,E., *et al.* (2012) NcPRO-seq: A tool for annotation and profiling of ncRNAs in sRNA-seq data. *Bioinformatics*, **28**, 3147–3149.
42. 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**, R25.
43. Wang,H., McKnight,N.C., Zhang,T., Lu,M.L., Balk,S.P. and Yuan,X. (2007) SOX9 is expressed in normal prostate basal cells and regulates androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **67**, 528–536.

44. Panda,D.K., Miao,D., Lefebvre,V., Hendy,G.N. and Goltzman,D. (2001) The Transcription Factor SOX9 Regulates Cell Cycle and Differentiation Genes in Chondrocytic CFK2 Cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41229–41236.
45. Sher,Y.P., Wang,L.J., Chuang,L.L., Tsai,M.H., Kuo,T.T., Huang,C.C., Chuang,E.Y. and Lai,L.C. (2014) ADAM9 up-regulates N-cadherin via miR-218 suppression in lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*, **9**.
46. Rago,L., Beattie,R., Taylor,V. and Winter,J. (2014) MiR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J.*, **33**, 906–920.
47. 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**, e19059.
48. Lu,J., Lonergan,P.E., Nacusi,L.P., Wang,L., Schmidt,L.J., Sun,Z., Van der Steen,T., Boorjian,S. a., Kosari,F., Vasmatazis,G., *et al.* (2015) The Cistrome and Gene Signature of Androgen Receptor Splice Variants in Castration Resistant Prostate Cancer Cells. *J. Urol.*, **193**, 690–698.
49. Chan,S.C., Selth,L. a., Li,Y., Nyquist,M.D., Miao,L., Bradner,J.E., Raj,G. V., Tilley,W.D. and Dehm,S.M. (2015) Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5880–5897.
50. 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**, 813–27.
51. 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**, 529–34.
52. Colas,E., Muinelo-Romay,L., Alonso-Alconada,L., Llaurodo,M., Monge,M., Barbazan,J., Gonzalez,M., Schoumacher,M., Pedrola,N., Ertekin,T., *et al.* (2012) ETV5 cooperates with LPP as a sensor of extracellular signals and promotes EMT in endometrial carcinomas. *Oncogene*, **31**, 4778–4788.
53. Jo,A., Denduluri,S., Zhang,B., Wang,Z., Yin,L., Yan,Z., Kang,R., Shi,L.L., Mok,J., Lee,M.J., *et al.* (2014) The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.*, **1**, 149–161.
54. Shen,G., Lin,Y., Yang,X., Zhang,J., Xu,Z. and Jia,H. (2014) MicroRNA-26b inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting USP9X. *BMC Cancer*, **14**.
55. Song,C., Chen,H., Wang,T., Zhang,W., Ru,G. and Lang,J. (2015) Expression profile analysis of microRNAs in prostate cancer by next-generation sequencing. *Prostate*, **75**, 500–516.
56. Yang,X., Yang,Y., Gan,R., Zhao,L., Li,W., Zhou,H., Wang,X., Lu,J. and Meng,Q.H. (2014) 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*, **9**, e98833.

## **SUPPLEMENTARY DATA**

### **Supplementary Methods**

#### **Lentiviral inducible system**

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 S3). Each cDNA amplicon was cloned in pLVX-TRE3G vector between BamHI/MluI using the In fusion® HD Cloning Kit (Clontech). To establish Tet-3G-expressing stable LNCaP clones, Tet-3G lentiviral particles produced in HEK 293T cells were used to transduce LNCaP cells. Stable clones were selected with 400 µg/mL geneticin (Life Technologies). For an inducible expression of AR variants, Tet-3G stable LNCaP cells were transduced with pLVX-TRE3G-EGFP-AR-WT, pLVX-TRE3G-EGFP-AR-Q640X and pLVX-TRE3G-EGFP-AR-V7 lentiviral particles, and were selected with 300 µg/mL geneticin and 400 ng/mL puromycin (Life Technologies). AR expression was induced using 20 ng/mL doxycycline (Life Technologies) and 4 days later, RNA and protein extractions were performed.

## Supplementary Tables

**Supplementary Table S1: List of primers used for qRT-PCR**

| Genbank                  | QuantiTect Reference | Amplicon length (bp) | Amplified exons |
|--------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| <i>β-ACTIN (ACTB)</i>    | QT01680476           | 104                  | NA              |
| <i>EGFP</i>              | QT01171611           | NA                   | NA              |
| <i>ETV5</i>              | QT00009485           | 89                   | 7/8             |
| <i>N-CADHERIN (CDH2)</i> | QT00063196           | 102                  | 14/15           |
| <i>PBGD (HMBS)</i>       | QT00014462           | 107                  | 7/8/9           |
| <i>SOX9</i>              | QT00001498           | 111                  | 1/2             |
| <i>MIR26B</i>            | MS00003234           |                      |                 |
| <i>MIR221</i>            | MS00003857           |                      |                 |
| <i>RNU6-2</i>            | MS00033740           |                      |                 |

**Supplementary Table S2: 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' CAGGAACCTGCAAAGTGTGA 3'  | NC_000018.10     | 28156282-28156302 |                      |
| Promoter of <i>β-GLOBULIN</i> forward | 5' AGGACAGGTACGGCTGTCATC 3' | NC_000011.10     | 5227207-5227187   | 90pb                 |
| Promoter of <i>β-GLOBULIN</i> reverse | 5'TTTATGCCAGCCCTGGCTC 3'    | NC_000011.10     | 52277098-5227117  |                      |

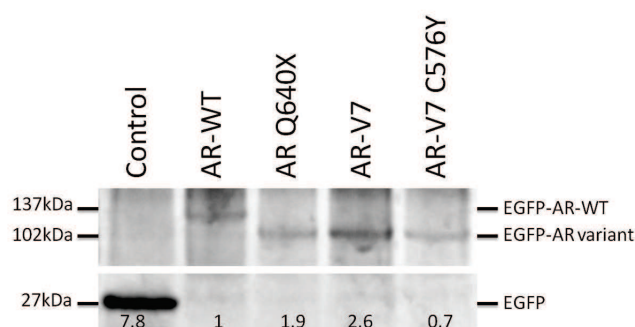
**Supplementary Table S3: Sequence of primers used for cloning of pLVX-TRE3G-AR.**

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

| Name          | Sequence                                                      | Position Information                                                                               |
|---------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FOR-LVXTRE3G  | 5' <i>TCTTATACTT</i> <u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT 3' | pLVX-TRE3G: nucleotides 2576-2561 in italics; EGFP sequence in bold caractere                      |
| REV-LVX_WT    | 5' <i>ATTCCATATG</i> <u>ACGCGT</u> TCACTGGGTGTGGAATAGA 3'     | pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; NM_000044.3: nucleotides 3859-3879 in bold caractere |
| REV-LVX_Q640X | 5' <i>ATTCCATATG</i> <u>ACGCGT</u> CTATAGTTTCAGATTACCA 3'     | pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; NM_000044.3: nucleotides 3020-3038 in bold caractere |
| REV-LVX_V7    | 5' <i>ATTCCATATG</i> <u>ACGCGT</u> TCAGGGTCTGGTCATTTTGA 3'    | pLVX-TRE3G: nucleotides 2582-2597 in italics; FJ235916.1: nucleotides 2246-2266 in bold caractere  |

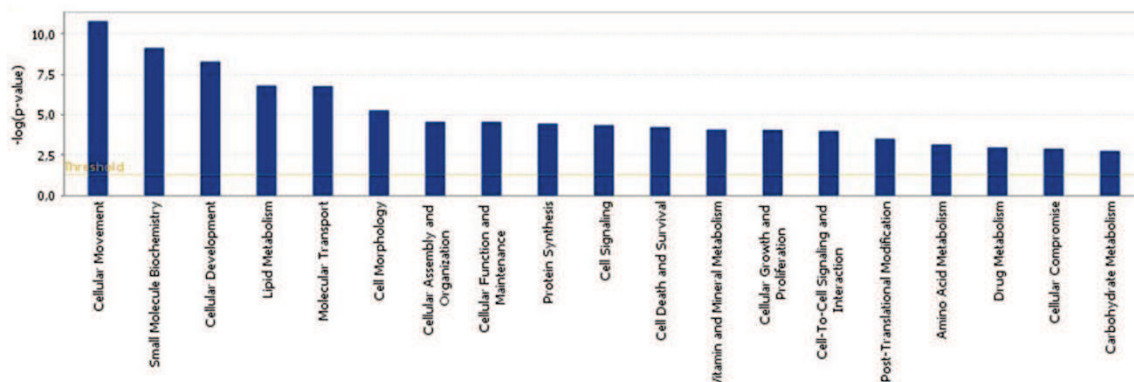
## Supplementary Figures

**Supplementary Figure S1**



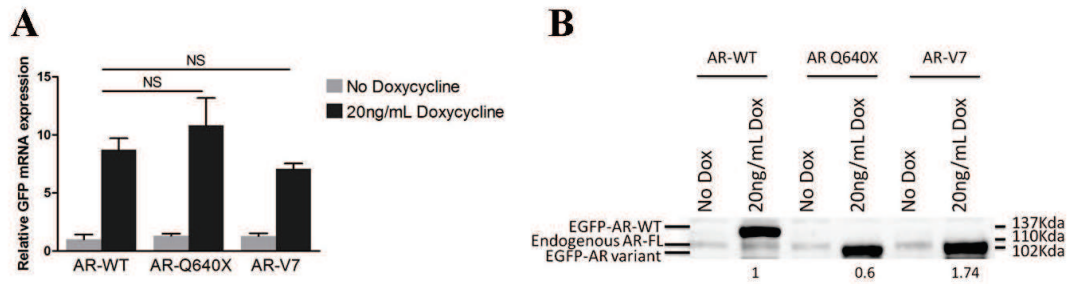
**Presence of AR in chromatin extracts.** LNCaP cells overexpressing EGFP (Control), AR-WT or AR variants were crosslinked with 1,1% of paraformaldehyde and fixation buffer. After sonication, a Western Blot was performed from chromatin extracts using an EGFP antibody to verify the integrity of AR protein. A band at 137KDa and 102KDa was respectively detected in lane 2 (AR-WT) and lane 3, 4, 5 (AR variants) attesting the absence of degradation of AR. 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.

**Supplementary Figure S2**



**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 ( $\log_2\text{Fold-Change} > 1$  and a p-value adjusted for multiple testing  $< 0.5$ ). The list of deregulated genes was uploaded in IPA software to check altered function in the presence of AR-V7. Interestingly, the expression of AR-V7 affects functions involved in cellular movement or cell morphology.

### Supplementary Figure S3



**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 20ng/mL of doxycycline. **(A)** After 4 days of induction by doxycycline, EGFP RNA level was analysed by qRT-PCR. **(B)** A Western Blot was performed to assess AR protein levels. NS : Not statistically significant.

## **Conclusion de l'article 2**

Dans cette étude, nous avons montré que l'AR-FL et les variants constitutifs du RA ont un mode d'action différent concernant la régulation de la N-cadhérine. En effet, ils sont tous les deux capables d'interagir avec les AREs présents dans l'intron 1 du gène de la N-cadhérine. Toutefois, l'expression des variants constitutivement actifs du RA est associée à une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H4 dans cette région par rapport à un récepteur AR-FL. De plus, une diminution de l'expression de l'AR-FL endogène a été observée en présence des variants constitutifs du RA dans les cellules LNCaP. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un modèle où les variants constitutivement actifs du RA interagissent avec les AREs situés dans l'intron 1 de la N-cadhérine. Ceux-ci recruteraient alors un complexe de coactivateurs dont des histones acétyltransférases conduisant à une augmentation de niveau d'acétylation du gène de la N-cadhérine. Au contraire, l'AR-FL pourrait recruter un complexe de corépresseurs, qui, en conséquence, inhiberait l'expression de la N-cadhérine. La répression de l'AR-FL observée en présence des variants constitutivement actifs du RA pourrait ainsi potentialiser leur impact sur l'expression de la N-cadhérine.

L'analyse du profil d'expression des miRNA n'a pas permis de mettre en évidence une diminution significative de miRNA connus pour réguler la N-cadhérine. Par ailleurs, grâce à l'analyse du profil transcriptionnel par RNA-seq et des études de RT-qPCR et Western Blot, nous avons mis en évidence que le facteur de transcription SOX9 pourrait éventuellement être un régulateur potentiel de la N-cadhérine. Toutefois, celui-ci est exprimé à un niveau basal dans les cellules LNCaP suggérant que SOX9 ne peut pas à lui seul expliquer l'augmentation de la N-cadhérine en présence des variants. Ainsi, le lien entre SOX9 et la N-cadhérine dans notre modèle nécessite à être approfondi.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

La compréhension des mécanismes à l'origine des CRPC est essentielle afin de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les variants constitutivement actifs du RA contribuent à la résistance à la castration de part leur activité ligand indépendante et leur capacité à soutenir la prolifération des cellules cancéreuses en absence d'androgènes (Céraline et al., 2004; Dehm et al., 2008; Guo et al., 2009; Hörnberg et al., 2011; Hu et al., 2009, 2011; Lapouge et al., 2007; Marcias et al., 2010; Sun et al., 2010; Watson et al., 2010). Toutefois, au début de mon projet de thèse, les mécanismes d'activation et le mode d'action des variants constitutifs du RA à l'échelle moléculaire et cellulaire n'étaient pas clairement déterminés. Ainsi, mon projet de thèse a consisté en l'étude du mode d'action des variants constitutivement actifs du RA, en émettant l'hypothèse qu'ils pourraient être impliqués dans la progression du cancer de la prostate.

## **I. Les variants constitutifs du RA et progression tumorale**

Dans une première partie de ma thèse, j'ai montré que les variants constitutivement actifs du RA sont associés à une induction d'une EMT partielle comme en témoigne la co-expression entre marqueurs épithéliaux et marqueurs mésenchymateux. L'implication des variants constitutifs du RA dans l'EMT a été par la suite rapportée dans d'autres modèles cellulaires et dans modèles de souris transgéniques (Kong et al., 2015; Liu et al., 2013; Sun et al., 2014). Par exemple, un lien entre ZEB1 et les variants du RA a été mis en évidence dans les cellules cancéreuses prostatiques 22RV1 (Kong et al., 2015). Des souris transgéniques exprimant le récepteur constitutivement actif ARv567<sup>es</sup> dans la prostate développent spontanément des tumeurs prostatiques. De manière intéressante, la castration de ces souris conduit au développement d'un carcinome invasif caractérisé par une diminution de l'expression de la E-cadhérine et une augmentation du facteur de transcription TWIST et de la vimentine (Liu et al., 2013). Au cours de ma thèse, j'ai également analysé les gènes différentiellement exprimés dans les cellules LNCaP exprimant un récepteur sauvage ou un variant constitutif du RA. Grâce à une analyse approfondie à l'aide du logiciel IPA, il apparaît que la première fonction des gènes affectés par l'expression des variants constitutifs du RA concerne des gènes impliqués dans le mouvement cellulaire. En plus de la N-cadhérine, CXCL13 (C-X-C motif chemokine 13), FBLN5 (fibiline 5), ou TGM2 (transglutaminase 2) font partie des gènes les plus surexprimés en présence des variants constitutifs du RA retrouvés dans ce cluster. La chimiokine CXCL13 est fortement exprimée dans le sérum de patients avec un cancer de la prostate, et sa liaison au récepteur CCR5 (C-C chemokine

receptor type five) favorise l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques PC3 (Singh et al., 2009). De plus, la stimulation des cellules cancéreuses mammaires par CXCL13 est associée à une induction de l'EMT et à une augmentation de la migration de ces cellules (Biswas et al., 2014). La fibuline 5 est une protéine de la matrice extracellulaire contenant un motif RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) capable de lier les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  et  $\alpha_9\beta_1$ , et d'activer des voies de signalisation en aval de ces intégrines. Le rôle de la fibuline 5 dans la progression tumorale est très controversé et semble être dépendant du contexte cellulaire (Albig and Schiemann, 2005). La fibuline 5, en liant les intégrines, conduit à une diminution de la phosphorylation de ERK, ce qui, en retour, diminue l'expression de MMP7 et l'invasion des cellules cancéreuses de poumons (Yue et al., 2009). Toutefois, dans des cellules normales et cancéreuses de sein, la fibuline 5 potentialise l'habilité du TGF- $\beta$  à induire une EMT (Lee et al., 2008). Le rôle de la fibuline 5 dans le cancer de la prostate n'a pas encore été étudié. L'expression de TGM2 est augmentée dans de nombreux cancers et est associée à l'EMT, à la migration et l'invasion des cellules tumorales (Cao et al., 2012; Kumar and Mehta, 2013). En particulier, TGM2 régule l'expression de la N-cadhérine via l'activation de JNK (Park et al., 2013). Ainsi, les variants constitutifs du RA sont associés à l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la progression tumorale. A ce stade, il est important d'étudier si les variants du RA sont associés à des propriétés fonctionnelles telles que la migration et l'invasion tumorale. Au laboratoire, nous avons montré que ces variants constitutifs du RA sont associés à une augmentation de la migration comparée à un récepteur sauvage. Des analyses plus poussées sont actuellement en cours d'étude afin de d'étudier si l'expression de la N-cadhérine induite par les variants constitutifs du RA pourrait être responsable de la migration augmentée. Toutefois, il a été montré que les variants constitutivement actifs du RA induisent l'expression de RHOB (Ras Homolog Family Member B), une petite GTPase, qui, en retour, conduit à la migration des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP (Tsai et al., 2012).

Comme je l'ai mentionné dans la dernière partie de l'introduction, l'EMT est associée à l'acquisition de marqueurs de cellules souches (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Ainsi, nous pouvons nous demander si l'EMT induite par les variants constitutifs du RA pourrait aussi être associée à l'expression de marqueurs de cellules souches. Récemment, une étude a montré que l'expression du variant AR-V7 est associée à une augmentation des marqueurs de cellules souches Nanog et de lin28B (lin-28 homolog B) respectivement dans les cellules

cancéreuses prostatiques LNCaP et DU-145. De plus, l'expression du variant AR-V7 augmente la capacité des cellules PC3 et DU-145 à former des sphéroïdes, témoignant donc de l'association entre variants constitutifs du RA et caractéristiques de cellules souches. Nos données de RNA-seq confirment les résultats obtenus dans les cellules LNCaP puisque l'expression de Nanog est augmentée de 1,7 fois en présence du variant AR-V7 comparée à un récepteur sauvage. Des motifs de liaison pour le RA ont été décrits dans le promoteur de Nanog, suggérant que les variants constitutifs du RA pourraient conduire directement à son expression (Kregel et al., 2014). Aucune différence d'expression de lin28B n'était observée dans nos analyses de RNA-seq. Kong et ses collaborateurs ont rapporté une expression de lin28B dans les cellules DU-145 suggérant que l'expression de ce marqueur pourrait dépendre du contexte cellulaire. Aussi, il est envisageable que notre analyse ait été réalisée trop précocement pour observer l'augmentation de ce marqueur dans notre modèle. La surexpression du variant AR-V7 dans la prostate de souris transgéniques conduit à une expression augmentée des marqueurs de cellules souches Sca-1, aldéhyde déshydrogénase et Trop-2. De plus, dans ce modèle, une augmentation d'une sous-population ayant des caractéristiques de progéniteurs de cellules prostatiques a été mise en évidence (Sun et al., 2014). L'ensemble de ces données démontre bien l'impact des variants constitutifs du RA dans l'acquisition de propriétés de cellules souches. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de Nanog dans les cellules LNCaP conduit à une résistance à la castration (Jeter et al., 2011). Ainsi, l'induction de marqueurs de cellules souches par les variants constitutivement actifs du RA pourrait être un autre mécanisme par lequel ils conduisent à la résistance à la castration.

L'expression de tels marqueurs liés à la progression tumorale par les variants constitutifs du RA a été jusqu'à présent décrite dans des lignées cancéreuses prostatiques ou dans des modèles de souris transgéniques. Ainsi, une corrélation entre ces marqueurs et l'expression des variants constitutivement actifs du RA à partir d'échantillons de patients serait intéressante. Cependant, de part la diversité des variants du RA exprimés au sein des tumeurs, il semble assez difficile d'établir une telle corrélation. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe pas de possibilité de détecter simultanément l'ensemble des variants constitutifs du RA. Une telle étude demande donc de nous focaliser sur un variant constitutif du RA particulier. Comme le récepteur AR-V7 est très fréquemment exprimé au sein des tumeurs prostatiques, une bonne alternative serait donc d'établir une corrélation entre ce récepteur et les marqueurs de la progression tumorale. Grâce à son extrémité terminale, il est possible de

construire des amorces spécifiques amplifiant l'AR-V7 et ainsi d'établir une corrélation à l'aide d'ARN extraits à partir d'échantillons tumoraux humains. Par ailleurs, un anticorps reconnaissant le récepteur AR-V7 est actuellement disponible sur le marché, une autre option serait de mettre en évidence une co-expression des marqueurs tumoraux comme la N-cadhérine et le variant AR-V7 à partir de tissus de cancer de la prostate par immunohistochimie.

Toutefois, nous pouvons d'ores et déjà conclure que les variants constitutifs du RA induisent un programme d'expression différentielle contribuant à la progression du cancer de la prostate.

## **II. Mécanismes de régulation des marqueurs de la progression tumorale par les variants constitutivement actifs du RA**

A la lumière de ces résultats, il nous a paru intéressant de comprendre par quels mécanismes les variants constitutifs du RA induisent l'expression de ces marqueurs de la progression tumorale. Au cours de ma thèse, je me suis focalisée plus particulièrement à l'induction de la N-cadhérine par les variants constitutifs du RA. Comme je l'ai décrit dans l'introduction, le RA peut affecter l'expression de gènes par deux mécanismes. Soit, le RA se lie aux éléments de réponse AREs et module directement l'expression des gènes cibles, soit, sans lier l'ADN, il interagit avec d'autres facteurs de transcription, comme SMAD3, et affecte ainsi leur activité transcriptionnelle. A l'aide d'un variant constitutif incapable de se lier à l'ADN, j'ai montré que l'expression de la N-cadhérine nécessite la liaison des variants du RA aux AREs. De plus, j'ai montré que ces variants constitutifs du RA interagissent avec les éléments de réponse situés dans l'intron 1 de la N-cadhérine et sont associés avec une acétylation de l'histone H4 plus importante comparée à un récepteur sauvage. Ces résultats sont donc en faveur d'un mode de régulation direct de la N-cadhérine.

Bien que ces résultats soient très intéressants, nous ne pouvons pas exclure que les variants constitutifs du RA induisent l'expression de la N-cadhérine par un mode de régulation indirect. Dans mon deuxième article, j'ai montré que SOX9 pouvait éventuellement être un régulateur de la N-cadhérine. En effet, le gène de la N-cadhérine possède un élément de réponse pour SOX9 au niveau du promoteur, et deux au niveau de l'intron 1 (Panda et al., 2001). De plus, l'expression protéique de SOX9 est légèrement augmentée en présence des variants constitutifs du RA. Des études plus approfondies devront être réalisées afin de

conclure de l'impact de SOX9 sur l'expression de la N-cadhérine dans notre modèle. Ainsi, la localisation nucléaire de SOX9 en présence des variants constitutifs du RA devra être étudiée par immunofluorescence. De plus, les conséquences de l'inhibition de SOX9 à l'aide de siRNA sur l'expression de la N-cadhérine devront être recherchées. Toutefois, SOX9 doit interagir avec d'autres facteurs de transcription pour induire ou réprimer la transcription de ses gènes cibles (Jo et al., 2014). Ainsi, il serait envisageable de rechercher un partenaire de SOX9 dont l'expression serait augmentée ou qui serait activé en présence des variants constitutivement actifs du RA.

Bien que nous proposons dans cette étude un mécanisme direct de régulation de la N-cadhérine par les variants constitutifs du RA, beaucoup d'analyses restent à faire afin de comprendre comment ces variants constitutifs sont capables d'induire un programme d'EMT partielle. L'analyse de nos données de RNA-seq nous révèle que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait être activée en présence des variants constitutifs du RA. Bien que l'expression de la  $\beta$ -caténine reste inchangée, un certain nombre d'effecteurs ou de gènes cibles de cette voie sont affectés par la présence des variants constitutifs du RA comme CTGF (Connective Tissue growth factor), MSX2 (Msh Homeobox 2) ou encore SFRP1 (Secreted frizzled-related protein 1). Les gènes CTGF et MSX2 ont une expression augmentée respectivement de 4,9 et 2,2 fois en présence des variants du RA comparée à un récepteur sauvage. Au contraire, SFRP1 est diminué de plus de 2 fois dans notre modèle. La cytokine CTGF, en phosphorylant GSK3 $\beta$ , conduit à une accumulation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau favorisant ainsi la transcription de ses gènes cibles, comme MSX2 (Rooney et al., 2011; Zhai et al., 2011). En accord avec nos résultats, la protéine SFRP1 est souvent sous-exprimée dans de nombreux cancers et agit comme un antagoniste de la voie Wnt en interagissant avec les ligands WNT (Wingless-Type MMTV Integration Site Family) et les empêchant ainsi de se lier à leur récepteur. Aussi, SFRP1 interagit avec le récepteur Frizzled et inhibe l'activation de la voie Wnt (Kawano and Kypta, 2003). Une diminution de SFRP1 dans des cellules immortalisées mammaires conduit à une EMT partielle et à une augmentation des propriétés motiles et invasives (Gauger et al., 2009).

De plus, nos données de RNA-seq montrent une augmentation du TGF $\beta$ 2 et de son récepteur TGF $\beta$ R2, témoignant d'une implication possible de la voie du TGF- $\beta$  dans l'induction des marqueurs de la progression tumorale dans notre modèle. Une activation de cette voie de signalisation a été également mise en évidence dans un modèle de souris

transgénique exprimant le récepteur AR-V7 dans la prostate (Sun et al., 2014). Bien qu'une augmentation des marqueurs de l'EMT ait été décrite dans ce modèle, le lien direct entre la voie du TGF- $\beta$  et ces marqueurs n'a pas été analysé.

Au vu de ces données, il semble donc important d'étudier plus en détail l'impact de ces voies de signalisation sur l'expression des marqueurs de la progression tumorale induits par les variants constitutifs du RA.

### **III. Différence de mode d'action entre l'AR-FL et les variants constitutivement actifs du RA**

Dans ce travail, j'ai également mis en évidence que l'augmentation de la N-cadhérine induite par les variants constitutifs du RA est atténuée par les androgènes. Ces résultats suggèrent donc que le RA endogène (AR-FL) des cellules LNCaP activé par les androgènes pourrait réprimer l'expression de la N-cadhérine. De plus, au même titre que les variants constitutifs du RA, l'AR-FL est capable de fixer les AREs présents dans l'intron 1 de la N-cadhérine. Toutefois, la liaison de l'AR-FL à l'ADN n'est pas associée à une augmentation du niveau d'acétylation de histone H4. Dans notre modèle, il y aurait donc une compétition entre l'AR-FL et les variants constitutivement actifs du RA pour réguler l'expression de la N-cadhérine.

En accord avec nos résultats, il a été montré que le variant constitutif ARv567<sup>es</sup> interagit avec les mêmes motifs que l'AR-FL. Dans cette étude, les auteurs ont analysé un panel de gènes connus pour être spécifiquement régulés par les variants constitutifs du RA dont le gène UBE2C et ont montré que, pour la plupart, il n'y avait pas de différence de recrutement de l'AR-FL ou des variants constitutifs du RA au niveau de l'ADN (Chan et al., 2015).

De plus, notre modèle de compétition pourrait être étendu à d'autres gènes que la N-cadhérine. Par exemple, d'après notre analyse de RNA-seq, l'expression de Wnt11 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 11) est augmentée de plus de 7 fois en présence des variants constitutivement actifs du RA comparée à un récepteur sauvage. Wnt11 est un ligand capable d'activer la voie Wnt indépendante de la  $\beta$ -caténine (voie non canonique) et régule la polarité cellulaire et la migration (Anastas and Moon, 2012). De manière intéressante, l'expression de Wnt11 est régulée négativement par les androgènes (Zhu et al., 2004). Comme, l'AR-FL régule indirectement Wnt11, il est possible que l'effecteur

secondaire conduisant à la transcription de Wnt11 soit réprimé par l'AR-FL mais induit par les variants constitutifs du RA.

Dans mon premier article, j'ai montré que l'expression de ZEB1 est augmentée en présence des variants constitutivement actifs du RA. De plus, ZEB1 est négativement régulé par l'AR-FL (Sun et al., 2012). Toutefois, il est important de noter que la répression de ZEB1 par l'AR-FL semble être dépendante du contexte cellulaire et de la dose d'androgènes utilisée. De plus, deux AREs ont été décrits au niveau du gène de ZEB1 (Anose and Sanders, 2011; Mooney et al., 2015). Ainsi, nous pouvons envisager que ZEB1 est régulé suivant le même modèle que celui décrit pour la N-cadhérine.

Cependant, ce modèle de compétition n'est pas applicable à tous les gènes. En effet, l'AR-FL et les variants constitutifs du RA peuvent réguler l'expression de gènes dans la même direction. Par exemple, ils régulent tous les deux positivement le gène du PSA.

Ce modèle de compétition nous mène à nous demander comment les variants du RA parviennent à s'imposer sur l'AR-FL pour induire l'expression de la N-cadhérine. De manière très intéressante, j'ai montré que l'expression des variants constitutifs du RA est associée à une diminution de l'expression de l'AR-FL dans les cellules LNCaP. Ainsi, en diminuant l'expression de l'AR-FL, les variants constitutifs du RA pourraient lever l'inhibition induite par l'AR-FL sur la N-cadhérine et potentialiser leurs effets en interagissant avec les AREs de l'intron 1 de la N-cadhérine.

Le mécanisme conduisant à la diminution de l'AR-FL en présence des variants reste à être élucidé. Le RA peut être régulé négativement au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription comme par exemple NF-KB (McEwan, 2004). Au laboratoire, nous avons montré que l'activité de NF-KB est augmentée en présence des variants constitutifs, ce qui pourrait éventuellement expliquer la diminution de l'AR-FL dans notre modèle (Lapouge et al., 2008). De plus, les variants du RA pourraient réguler directement l'expression de l'AR-FL. En effet, au niveau du gène du RA se trouvent des AREs permettant une autorégulation positive ou négative du RA (Cai et al., 2011; Hay et al., 2014).

La maturation des variants du RA pourrait provenir d'un défaut d'épissage résultant de la surexpression ou de la modification du recrutement de facteurs d'épissage comme hRNPA1, U2AF65 et ASF/SF2 (Liu et al., 2014b; Nadiminty et al., 2015). Ainsi, une modification de l'épissage qui privilégierait la génération de transcrits codant pour les variants constitutifs du RA pourrait expliquer la diminution de l'AR-FL dans notre modèle.

L'AR-FL pourrait être aussi régulé au niveau post-traductionnel, ce qui aurait pour conséquence d'affecter sa stabilité. Il a été montré que PMEPA1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1) interagit avec le RA et recrute l'ubiquitine ligase E3 NEDD4 (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4, E3 Ubiquitin Protein Ligase) conduisant alors à la poly-ubiquitinylation et à la dégradation du RA par le protéasome (Li et al., 2008). De manière intéressante, PMEPA1 est environ deux fois plus exprimé en présence des variants constitutifs du RA par rapport à un récepteur sauvage, d'après nos données de RNA-seq. Ainsi, les variants constitutifs du RA pourraient induire l'expression de PMEPA1 aboutissant alors à la dégradation de l'AR-FL. Les sites d'ubiquitinylation se trouvant au niveau du LBD, les variants constitutivement actifs du RA pourraient être protégés de la dégradation par le complexe PMEPA1/NEDD4.

Mes résultats m'ont donc permis de proposer un mode d'action différent entre l'AR-FL et les variants constitutivement actifs du RA. Ces données doivent être approfondies afin de comprendre pourquoi l'AR-FL et les variants constitutifs du RA agissent de manière opposée dans la régulation de la transcription de certains gènes. Comme je l'ai expliqué dans l'introduction, plusieurs cofacteurs se lient au niveau du domaine de liaison du ligand du RA. Ainsi, de part la perte de sa partie C-terminale, les variants constitutivement actifs du RA pourraient avoir perdu la capacité de lier certains cofacteurs. En accord avec cette hypothèse, le variant AR Q640X n'est plus capable de recruter le coactivateur SRC-2 (Lapouge et al., 2008). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'AR-FL peut être associé à un complexe de corépresseurs qui ne pourrait pas être recruté par les variants constitutifs du RA. Au contraire, les variants constitutivement actifs du RA pourraient recruter un complexe de coactivateurs et conduire à une expression différentielle (Figure 7, article 2).

Un autre mécanisme pourrait impliquer FOXA1, qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction, est un important régulateur de l'activité transcriptionnelle du RA. En effet, FOXA1 favorise le recrutement du RA au niveau des AREs de certains gènes, ou au contraire peut avoir un effet négatif en empêchant l'accessibilité du RA au niveau de ces motifs (Jin et al., 2014; Sahu et al., 2011). Comme FOXA1 interagit avec le RA via une séquence en aval du DBD, cette interaction est perdue avec les variants constitutifs du RA (Gao et al., 2003; Wang et al., 2011). De plus, il a été montré que les variants constitutivement actifs du RA sont capables de contourner l'effet inhibiteur de FOXA1 et de stimuler la transcription de gènes normalement non induit par l'AR-FL (Krause et al., 2014; Wang et al., 2011). Enfin,

FOXA1 est important dans le maintien du phénotype épithélial et sa perte est associée à une induction de gènes clés de l'EMT dans un modèle de cancer prostatique et pancréatique (Jin et al., 2013b; Song et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que, dans notre modèle, FOXA1 pourrait prévenir l'induction de gènes impliqués dans la progression tumorale en masquant certains AREs. Cet effet pourrait être contourné par les variants constitutifs du RA, qui conduiraient alors à l'induction d'un programme d'EMT contrairement à l'AR-FL.

#### **IV. Conclusion générale et retombées cliniques**

Au cours de ma thèse, j'ai donc mis en évidence que les variants constitutivement actifs du RA sont impliqués dans la progression du cancer de la prostate en induisant notamment l'expression de gènes clés de l'EMT. De plus, j'ai montré que, dans mon modèle, l'AR-FL et les variants constitutifs du RA sont en compétition pour réguler l'expression de la N-cadhérine. En effet, les deux interagissent avec les AREs présents dans l'intron 1 de la N-cadhérine. Toutefois, l'AR-FL réprime l'expression de la N-cadhérine alors que les variants constitutivement actifs du RA sont associés à une acétylation de l'histone H4 au niveau du gène de la N-cadhérine et induisent son expression. Des études plus approfondies devront être réalisées afin de comprendre pourquoi l'AR-FL et les variants constitutifs du RA ont un mode d'action différent.

L'ensemble des études réalisées sur les variants constitutivement actifs du RA montre qu'ils pourraient contribuer à l'agressivité tumorale. Il y a donc un besoin urgent de développer de nouvelles thérapies ciblant ces variants ou leur mode d'action.

La molécule EPI-001 pourrait être une molécule prometteuse. En effet, elle serait capable d'inhiber toutes les formes du RA retrouvées dans le cancer de la prostate comme elle interagit avec la partie N-terminale du récepteur (Myung et al., 2013; Sadar, 2011). Cette molécule est actuellement en cours de développement pour des études chez l'homme.

Par ailleurs, Tanaka et ses collaborateurs ont développé un anticorps monoclonal dirigé contre la N-cadhérine capable d'inhiber la croissance de tumeurs résistantes à la castration (Tanaka et al., 2010). Un tel anticorps pourrait être efficace pour bloquer la croissance de tumeurs prostatiques exprimant des variants constitutifs du RA.

Afin de trouver d'autres cibles thérapeutiques, il pourrait être judicieux d'établir une signature d'expression génique des variants constitutivement actifs du RA. Ainsi, la

comparaison de l'ensemble des analyses transcriptionnelles disponibles à ce jour dans les différents modèles pourrait nous permettre d'établir cette signature.

De plus, cette signature pourrait être recherchée au sein de cellules tumorales circulantes afin d'identifier les patients ayant des tumeurs qui expriment des variants constitutifs du RA. L'identification de ce sous-groupe de patients est importante pour une optimisation thérapeutique car nous savons que l'administration de molécules ciblant la voie de biosynthèse des androgènes ou le domaine de liaison du ligand du RA restera peu bénéfique à long terme chez ces patients.

En conclusion, mes données de thèse apportent des notions supplémentaires sur le mode d'action des variants constitutifs du RA dans les cancers de la prostate résistants à la castration ce qui permettra à terme de trouver de meilleures stratégies thérapeutiques pour une prise en charge personnalisée des patients.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abate-Shen, C., and Shen, M.M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* *14*, 2410–2434.
- Agarwal, N., Di Lorenzo, G., Sonpavde, G., and Bellmunt, J. (2014). New agents for prostate cancer. *Ann. Oncol.* *25*, 1700–1709.
- Albig, A.R., and Schiemann, W.P. (2005). Fibulin-5 function during tumorigenesis. *Future Oncol.* *1*, 23–35.
- Alexander, N.R., Tran, N.L., Rekapally, H., Summers, C.E., Glackin, C., and Heimark, R.L. (2006). N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1. *Cancer Res.* *66*, 3365–3369.
- 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.
- Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2012). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 11–26.
- Andersen, R.J., Mawji, N.R., Wang, J., Wang, G., Haile, S., Myung, J.-K., Watt, K., Tam, T., Yang, Y.C., Bañuelos, C. a, et al. (2010). Regression of castrate-recurrent prostate cancer by a small-molecule inhibitor of the amino-terminus domain of the androgen receptor. *Cancer Cell* *17*, 535–546.
- Andrieu, C., Taieb, D., Baylot, V., Ettinger, S., Soubeyran, P., De-Thonel, a, Nelson, C., Garrido, C., So, a, Fazli, L., et al. (2010). Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene* *29*, 1883–1896.
- Ang, J.E., Olmos, D., and de Bono, J.S. (2009). CYP17 blockade by abiraterone: further evidence for frequent continued hormone-dependence in castration-resistant prostate cancer. *Br. J. Cancer* *100*, 671–675.
- Anose, B.M., and Sanders, M.M. (2011). Androgen Receptor Regulates Transcription of the ZEB1 Transcription Factor. *Int. J. Endocrinol.* *2011*.
- Antonarakis, E.S., Lu, C., Wang, H., Lubber, 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.
- Ao, M., Williams, K., Bhowmick, N. a., and Hayward, S.W. (2006). Transforming growth factor- $\beta$  promotes invasion in tumorigenic but not in nontumorigenic human prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* *66*, 8007–8016.
- Arora, V.K., Schenkein, E., Murali, R., Subudhi, S.K., Wongvipat, J., Balbas, M.D., Shah, N., Cai, L., Efsthathiou, E., Logothetis, C., et al. (2013). Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell* *155*, 1309–1322.
- Barbolina, M. V, Burkhalter, R.J., and Stack, M.S. (2011). Diverse mechanisms for activation of Wnt signalling in the ovarian tumour microenvironment. *Biochem. J.* *437*, 1–12.
- Bartsch, G., Horninger, W., Klocker, H., Pelzer, A., Bektic, J., Oberaigner, W., Schennach, H., Schäfer, G., Frauscher, F., Boniol, M., et al. (2008). Tyrol Prostate Cancer Demonstration Project: early detection, treatment, outcome, incidence and mortality. *BJU Int.* *101*, 809–816.
- 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.
- 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.

- Bergerat, J.P., and Céraline, J. (2009). Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum. Mutat.* *30*, 145–157.
- Bernard, D., and Pourtier-Manzanedo, a (2003). Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J. Clin. Invest.* *112*, 1724–1731.
- Bernardo, G.M., and Keri, R. a. (2012). FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biosci. Rep.* *32*, 113–130.
- Berrevoets, C. a, Umar, A., Trapman, J., and Brinkmann, A.O. (2004). Differential modulation of androgen receptor transcriptional activity by the nuclear receptor co-repressor (N-CoR). *Biochem. J.* *379*, 731–738.
- 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.
- Bertrand, F.E., McCubrey, J. a, Angus, C.W., Nutter, J.M., and Sigounas, G. (2014). NOTCH and PTEN in prostate cancer. *Adv. Biol. Regul.* *56*, 1–15.
- Berx, G., and van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a003129.
- Bevan, C.L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D.M., and Parker, M.G. (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8383–8392.
- Billis, A., and Magna, L. a. (2003). Inflammatory atrophy of the prostate: Prevalence and significance. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *127*, 840–844.
- Biswas, S., Sengupta, S., Roy Chowdhury, S., Jana, S., Mandal, G., Mandal, P.K., Saha, N., Malhotra, V., Gupta, A., Kuprash, D. V., et al. (2014). CXCL13-CXCR5 co-expression regulates epithelial to mesenchymal transition of breast cancer cells during lymph node metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* *143*, 265–276.
- Bonkhoff, H. (1998). Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: Morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate* *36*, 18–22.
- Bostwick, D.G., Pacelli, a, and Lopez-Beltran, a (1996). Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* *29*, 117–134.
- Boye, K., and Maeldandsmo, G.M. (2010). S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am. J. Pathol.* *176*, 528–535.
- Brabletz, T. (2012). To differentiate or not — routes towards metastasis. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 425–436.
- Brabletz, S., and Brabletz, T. (2010). The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* *11*, 670–677.
- Bradford, T.J., Tomlins, S. a., Wang, X., and Chinnaiyan, A.M. (2006). Molecular markers of prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* *24*, 538–551.
- Brasch, J., Harrison, O.J., Honig, B., and Shapiro, L. (2012). Thinking outside the cell: How cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol.* *22*, 299–310.
- Bratt, O., Damber, J.-E., Emanuelsson, M., and Grönberg, H. (2002). Hereditary prostate cancer: clinical characteristics and survival. *J. Urol.* *167*, 2423–2426.
- Brierley, J. (2006). The evolving TNM cancer staging system : an essential component of cancer care. *CMAJ* *174*, 155–156.

- Brown, T.R. (2003). Androgen action. In *Contemporary Endocrinology: Androgens in Health and Disease*, pp. 23–44.
- Bubendorf, L., Schöpfer, a, Wagner, U., Sauter, G., Moch, H., Willi, N., Gasser, T.C., and Mihatsch, M.J. (2000). Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Hum. Pathol.* *31*, 578–583.
- Burger, P.E., Xiong, X., Coetzee, S., Salm, S.N., Moscatelli, D., Goto, K., and Wilson, E.L. (2005). Sca-1 expression identifies stem cells in the proximal region of prostatic ducts with high capacity to reconstitute prostatic tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7180–7185.
- Cai, C., He, H.H., Chen, S., Coleman, I., Wang, H., Fang, Z., Chen, S., Nelson, P.S., Liu, X.S., Brown, M., et al. (2011). Androgen Receptor Gene Expression in Prostate Cancer Is Directly Suppressed by the Androgen Receptor Through Recruitment of Lysine-Specific Demethylase 1. *Cancer Cell* *20*, 457–471.
- Callewaert, L., Van Tilborgh, N., and Claessens, F. (2006). Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res.* *66*, 543–553.
- Cao, L., Shao, M., Schilder, J., Guise, T., Mohammad, K.S., and Matei, D. (2012). Tissue transglutaminase links TGF- $\beta$ , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* *31*, 2521–2534.
- 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*, 1748–1759.
- Centenera, M.M., Harris, J.M., Tilley, W.D., and Butler, L.M. (2008). The contribution of different androgen receptor domains to receptor dimerization and signaling. *Mol. Endocrinol.* *22*, 2373–2382.
- 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.
- Chan, S.C., and Dehm, S.M. (2014). Constitutive activity of the androgen receptor.
- Chan, S.C., Selth, L. a., Li, Y., Nyquist, M.D., Miao, L., Bradner, J.E., Raj, G. V., Tilley, W.D., and Dehm, S.M. (2015). Targeting chromatin binding regulation of constitutively active AR variants to overcome prostate cancer resistance to endocrine-based therapies. *Nucleic Acids Res.* *43*, 5880–5897.
- Chang, S.S., and Amin, M.B. (2008). Utilizing the tumor-node-metastasis staging for prostate cancer: the sixth edition, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* *58*, 54–59.
- 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 Joint Effect of HSD3B1 and HSD3B2 Genes Is Associated with Hereditary and Sporadic Prostate Cancer Susceptibility 1. *Cancer Res.* *62*, 1784–1789.
- Chang, C.-J., Chao, C.-H., Xia, W., Yang, J.-Y., Xiong, Y., Li, C.-W., Yu, W.-H., Rehman, S.K., Hsu, J.L., Lee, H.-H., et al. (2011a). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat. Cell Biol.* *13*, 317–323.
- Chang, K.-H., Li, R., Papari-Zareei, M., Watumull, L., Zhao, Y.D., Auchus, R.J., and Sharifi, N. (2011b). Dihydrotestosterone synthesis bypasses testosterone to drive castration-resistant prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13728–13733.
- Chen, C.D., Welsbie, D.S., Tran, C., Baek, S.H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M.G., and Sawyers, C.L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat. Med.* *10*, 33–39.

- 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, 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- $\beta$  signaling through interaction with Smad3. *J. Biol. Chem.* 277, 1240–1248.
- Claessens, F., Verrijdt, G., Schoenmakers, E., Haelens, a, Peeters, B., Verhoeven, G., and Rombauts, W. (2001). Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation. *J. Steroid Biochem.* 76, 23–30.
- 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.
- Collins, A.T., and Maitland, N.J. (2006). Prostate cancer stem cells. *Eur. J. Cancer* 42, 1213–1218.
- Collins, a T., Habib, F.K., Maitland, N.J., and Neal, D.E. (2001). Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on  $\alpha(2)\beta(1)$ -integrin expression. *J. Cell Sci.* 114, 3865–3872.
- Cunha, G.R., Cooke, P.S., and Kurita, T. (2004a). Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 417–434.
- Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Donjacour, A. a, and Kurita, T. (2004b). Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 92, 221–236.
- Cussenot, O., and Cancel-Tassin, G. (2004). Facteurs de risque génétiques pour le cancer de la prostate. *Médecine/Sciences* 20, 562–568.
- Czyż, J. strokeaw, Szpak, K., and Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat. Rev. Urol.* 9, 274–282.
- Dadoune, Hadjiisky, and Si (2000). Histologie.
- 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.
- 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.
- Delmas, V., Brémond-Gignac, D., Douard, R., Dupont, S., Latrémouille, C., Le Minor, J.M., Pirro, N., Sèbe, P., Vacher, C., and Yiou, R. (2008). Anatomie Générale.

- Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2002). History of prostate cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 2, 389–396.
- Derycke, L.D.M., and Bracke, M.E. (2004). N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 463–476.
- Derycke, L., Morbidelli, L., Ziche, M., De Wever, O., Bracke, M., and Van Aken, E. (2006). Soluble N-cadherin fragment promotes angiogenesis. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 187–201.
- Devlin, H.L., and Mudryj, M. (2009). Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.* 274, 177–186.
- Dittmer, A., Hohlfeld, K., Lützkendorf, J., Müller, L.P., and Dittmer, J. (2009). Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3053–3065.
- Drachenberg, D.E., Elgamal, a a, Rowbotham, R., Peterson, M., and Murphy, G.P. (1999). Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 41, 127–133.
- Dufour, P., Schraub, S., and Bergerat, J.-P. (2009). *Cancérologie*.
- Edlind, M.P., and Hsieh, A.C. (2014). PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J. Androl.* 16, 378–386.
- Edwards, J., Krishna, N.S., Grigor, K.M., and Bartlett, J.M.S. (2003a). Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* 89, 552–556.
- Edwards, S.M., Kote-Jarai, Z., Meitz, J., Hamoudi, R., Hope, Q., Osin, P., Jackson, R., Southgate, C., Singh, R., Falconer, A., et al. (2003b). Two percent of men with early-onset prostate cancer harbor germline mutations in the BRCA2 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1–12.
- Ewing, C.M., Ray, A.M., Lange, E.M., Zuhlke, K.A., Robbins, C.M., Tembe, W.D., Wiley, K.E., Isaacs, S.D., Johng, D., Wang, Y., et al. (2012). Germline Mutations in HOXB13 and Prostate-Cancer Risk. *N. Engl. J. Med.* 362, 141–149.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., and Handa, R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 169–181.
- Fourcade, R.-O. (1997). La prostate.
- Fournier, G., Valeri, a., Mangin, P., and Cussenot, O. (2004). Cancer de la prostate. *Épidémiologie. Facteurs de risques. Anatomopathologie. Ann. Urol. (Paris).* 38, 187–206.
- Freedman, M.L., Haiman, C. a, Patterson, N., McDonald, G.J., Tandon, A., Waliszewska, A., Penney, K., Steen, R.G., Ardlie, K., John, E.M., et al. (2006). Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14068–14073.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19.

- Gaddipati, J.P., Mcleod, D.G., Heidenberg, H.B., Gaddipati, J.P., Sesterhenn, I., Finger, M., Moul, J.W., and Srivastava, S. (1994). Frequent Detection of Codon 877 Mutation in the Androgen Receptor Gene in Advanced Prostate Cancers. *Cancer Res.* *54*, 2861–2864.
- Ganong, W. (2005). Les Gonades: Le développement et la fonction du système reproducteur. In *Physiologie Médicale*, pp. 387–428.
- Gao, J., Arnold, J.T., and Isaacs, J.T. (2001). Conversion from a paracrine to an autocrine mechanism of androgen-stimulated growth during malignant transformation of prostatic epithelial cells. *Cancer Res.* *61*, 5038–5044.
- Gao, N., Zhang, J., Rao, M. a, Case, T.C., Mirosevich, J., Wang, Y., Jin, R., Gupta, A., Rennie, P.S., and Matusik, R.J. (2003). The role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol. Endocrinol.* *17*, 1484–1507.
- Gao, W., Bohl, C.E., and Dalton, J.T. (2005). Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem. Rev.* *105*, 3352–3370.
- Gauger, K.J., Hugh, J.M., Troester, M. a, and Schneider, S.S. (2009). Down-regulation of sfrp1 in a mammary epithelial cell line promotes the development of a cd44high/cd24low population which is invasive and resistant to anoikis. *Cancer Cell Int.* *9*.
- Gaughan, L., Logan, I.R., Cook, S., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2002). Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J. Biol. Chem.* *277*, 25904–25913.
- Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Krithivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, a, Talcott, J., Hennekens, C.H., and Kantoff, P.W. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3320–3323.
- Goldstein, A.S., and Witte, O.N. (2012). A plethora of progenitors in the post-natal prostate. *EMBO Rep.* *13*, 1036–1037.
- Goldstein, A.S., Lawson, D. a, Cheng, D., Sun, W., Garraway, I.P., and Witte, O.N. (2008). Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 20882–20887.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Graft, J.R., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.K., et al. (1995). E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* *55*, 5195–5199.
- Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, F.S., and Wilson, E.M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res.* *61*, 4315–4319.
- Gumbiner, B.M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 622–634.
- 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.

Haelens, A., Tanner, T., Denayer, S., Callewaert, L., and Claessens, F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res.* *67*, 4514–4523.

Häggglöf, C., and Bergh, A. (2012). The stroma-a key regulator in prostate function and malignancy. *Cancers (Basel).* *4*, 531–548.

Hammerich, K.H., Ayala, G.E., and Wheeler, T.M. (2009). *Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer.* Cambridge Univ. Cambridge 1–10.

Handelsman, D. (2011). *Androgen Physiology, Pharmacology and Abuse.*

Hay, C.W., Watt, K., Hunter, I., Lavery, D.N., MacKenzie, A., and McEwan, I.J. (2014). Negative regulation of the androgen receptor gene through a primate-specific androgen response element present in the 5' UTR. *Horm. Cancer* *5*, 299–311.

Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L., and Aaronson, S. a (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* *148*, 779–790.

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.

De Herreros, A.G., Peiró, S., Nassour, M., and Savagner, P. (2010). Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 135–147.

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.

Hoffman, R.M., Frank, D., Eley, J.W., Linda, C., Stephenson, R. a, Stanford, L., Albertson, P.C., Hamilton, S., Hunt, W.C., and Potosky, L. (2001). Racial and Ethnic Differences in Advanced-Stage Prostate Cancer : the Prostate Cancer Outcomes Study Background : African-Americans have twice the risk of non-Hispanic whites for presenting with advanced-stage reasons for this difference , we evalu- ethni. *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 388–395.

Holter, E., Kotaja, N., Mäkelä, S., Strauss, L., Kietz, S., Jänne, O. a, Gustafsson, J.-A., Palvimo, J.J., and Treuter, E. (2002). Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol. Endocrinol.* *16*, 515–528.

Hong, C.Y., Gong, E.-Y., Kim, K., Suh, J.H., Ko, H.-M., Lee, H.J., Choi, H.-S., and Lee, K. (2005). Modulation of the expression and transactivation of androgen receptor by the basic helix-loop-helix transcription factor Pod-1 through recruitment of histone deacetylase 1. *Mol. Endocrinol.* *19*, 2245–2257.

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*, e19059.

Hsing, A.Y., Kadomatsu, K., Bonham, M.J., and Danielpour, D. (1996). Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res.* *56*, 5146–5149.

Hu, R., Dunn, T. a, Wei, S., Isharwal, S., Veltri, R.W., Humphreys, E., Han, M., Partin, A.W., Vessella, R.L., Isaacs, W.B., et al. (2009). Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* *69*, 16–22.

Hu, R., Isaacs, W.B., and Luo, J. (2011). A Snapshot of the Expression Signature of Androgen Receptor Splicing Variants and Their Distinctive Transcriptional Activities. *Prostate* *71*, 1656–1667.

- 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.
- Huang, H., and Cai, B. (2013). G84E mutation in HOXB13 is firmly associated with prostate cancer risk: a meta-analysis (Provisional abstract). *Database Abstr. Rev. Eff.* 35, 1177–1182.
- Huggins, C., and Hodges, C. V. (1941). Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate\* \*This investigation was aided by a grant from the Committee on Research in Problems of Sex, the. *Cancer Res.* 1, 293–297.
- Humphrey, P. a (2007). Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J. Clin. Pathol.* 60, 35–42.
- Hussein, S., Satturwar, S., and Van der Kwast, T. (2015). Young-age prostate cancer. *J. Clin. Pathol.* 511–515.
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 10, 415–424.
- INSERM (2008). Cancer et environnement.
- Isaacs, J.T., and Coffey, D.S. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate. Suppl.* 2, 33–50.
- Ismail A, H.R., Landry, F., Aprikian, A.G., and Chevalier, S. (2002). Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *Prostate* 51, 117–125.
- Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T.M., Xue, C., Okada, H., and Neilson, E.G. (2002). Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110, 341–350.
- 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.
- Jennbacken, K., Tesan, T., Wang, W., Gustavsson, H., Damberg, J.-E., and Welén, K. (2010). N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 469–479.
- Jeong, B.-C., Hong, C.Y., Chattopadhyay, S., Park, J.H., Gong, E.-Y., Kim, H.-J., Chun, S.-Y., and Lee, K. (2004). Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol. Endocrinol.* 18, 13–25.
- Jeter, C.R., Liu, B., Liu, X., Chen, X., Liu, C., Calhoun-Davis, T., Repass, J., Zaehres, H., Shen, J.J., and Tang, D.G. (2011). NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 30, 3833–3845.
- Jia, S., Gao, X., Lee, S.H., Maira, S.-M., Wu, X., Stack, E.C., Signoretti, S., Loda, M., Zhao, J.J., and Roberts, T.M. (2013). Opposing effects of androgen deprivation and targeted therapy on prostate cancer prevention. *Cancer Discov.* 3, 44–51.
- Jiao, J., Wang, S., Qiao, R., Vivanco, I., Watson, P. a., Sawyers, C.L., and Wu, H. (2007). Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development. *Cancer Res.* 67, 6083–6091.
- Jin, H., Kim, J., and Yu, J. (2013a). Androgen receptor genomic regulation. *Transl. Androl. Urol.* 2, 158–177.

- Jin, H., Zhao, J.C., Ogden, I., Bergan, R.C., and Yu, J. (2013b). Androgen receptor-independent function of FoxA1 in prostate cancer metastasis. *Cancer Res.* **73**, 3725–3736.
- Jin, H., Zhao, J.C., Wu, L., Kim, J., and Yu, J. (2014). Cooperativity and equilibrium with FOXA1 define the androgen receptor transcriptional program. *Nat. Commun.* **5**, 3972.
- Jo, A., Denduluri, S., Zhang, B., Wang, Z., Yin, L., Yan, Z., Kang, R., Shi, L.L., Mok, J., Lee, M.J., et al. (2014). The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases. *Genes Dis.* **1**, 149–161.
- Johnson, S.K., Ramani, V.C., Hennings, L., and Haun, R.S. (2007). Kallikrein 7 enhances pancreatic cancer cell invasion by shedding E-cadherin. *Cancer* **109**, 1811–1820.
- Jongsma, J., Oomen, M.H., Noordzij, M. a, Romijn, J.C., van Der Kwast, T.H., Schröder, F.H., and van Steenbrugge, G.J. (2000). Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines. *Prostate* **42**, 34–44.
- Joseph, J.D., Lu, N., Qian, J., Sensintaffar, J., Shao, G., Brigham, D., Moon, M., Maneval, E.C., Chen, I., Darimont, B., et al. (2013). A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to second-generation antiandrogens enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov.* **3**, 1020–1029.
- Kaarbø, M., Klok, T.I., and Saatcioglu, F. (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. *BioEssays* **29**, 1227–1238.
- Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* **119**, 1417–1419.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428.
- Kaltz-Wittmer, C., Klenk, U., Glaessgen, a, Aust, D.E., Diebold, J., Löhrs, U., and Baretton, G.B. (2000). FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab. Invest.* **80**, 1455–1464.
- 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.
- 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.
- Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627–2634.
- Kheirandish, P., and Chingwundoh, F. (2011). Ethnic differences in prostate cancer. *Br. J. Cancer* **105**, 481–485.
- Kiciński, M., Vangronsveld, J., and Nawrot, T.S. (2011). An epidemiological reappraisal of the familial aggregation of prostate cancer: A meta-analysis. *PLoS One* **6**, 1–7.
- Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.-J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.-S., et al. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J. Exp. Med.* **208**, 875–883.

- Kohutek, Z. a, diPierro, C.G., Redpath, G.T., and Hussaini, I.M. (2009). ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J. Neurosci.* *29*, 4605–4615.
- Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., Ahmad, A., Kim, H.R.C., and Sarkar, F.H. (2009). miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells. *Stem Cells* *27*, 1712–1721.
- Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Li, Y., Wang, Z., Sethi, S., and Sarkar, F.H. (2010). Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. *PLoS One* *5*.
- 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.
- Koochekpour, S. (2010). Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J. Androl.* *12*, 639–657.
- Korpai, M., Korn, J.M., Gao, X., Rakiec, D.P., Ruddy, D. a., Doshi, S., Yuan, J., Kovats, S.G., Kim, S., Cooke, V.G., et al. (2013). An F876I mutation in androgen receptor confers genetic and phenotypic resistance to MDV3100 (Enzalutamide). *Cancer Discov.* *3*, 1030–1043.
- Koryakina, Y., Ta, H.Q., and Gioeli, D. (2014). Androgen receptor phosphorylation: Biological context and functional consequences. *Endocr. Relat. Cancer* *21*, T131–T145.
- Krause, W.C., Shafi, A. a., Nakka, M., and Weigel, N.L. (2014). 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.
- Kregel, S., Szmulewitz, R.Z., and Griend, D.J. Vander (2014). The pluripotency factor Nanog is directly upregulated by the Androgen Receptor in prostate cancer cells. *Prostate* *74*, 1530–1543.
- Kroiss, a, Vincent, S., Decaussin-Petrucci, M., Meugnier, E., Viallet, J., Ruffion, A., Chalmel, F., Samarut, J., and Allioli, N. (2014). Androgen-regulated microRNA-135a decreases prostate cancer cell migration and invasion through downregulating ROCK1 and ROCK2. *Oncogene* *34*, 2846–2855.
- Kumar, S., and Mehta, K. (2013). Tissue transglutaminase, inflammation, and cancer: How intimate is the relationship? *Amino Acids* *44*, 81–88.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.
- 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.
- Lawrence, M.G., Veveris-Lowe, T.L., Whitbread, A.K., Nicol, D.L., and Clements, J. a. (2007). Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer and the potential role of kallikrein serine proteases. *Cells Tissues Organs* *185*, 111–115.

Lawson, D.A., and Witte, O.N. (2007). Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *J. Clin. Invest.* *117*, 2044–2050.

Lee, Y.H., Albig, A.R., Regner, M., Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2008). Fibulin-5 initiates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF- $\beta$  in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* *29*, 2243–2251.

Van Leenders, G., Dijkman, H., Hulsbergen-van de Kaa, C., Ruiter, D., and Schalken, J. (2000). Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab. Invest.* *80*, 1251–1258.

Leong, K.G., Wang, B.-E., Johnson, L., and Gao, W.-Q. (2008). Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature* *456*, 804–808.

Leongamornlert, D., Mahmud, N., Tymrakiewicz, M., Saunders, E., Dadaev, T., Castro, E., Goh, C., Govindasami, K., Guy, M., O'Brien, L., et al. (2012). Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br. J. Cancer* *106*, 1697–1701.

Li, J., and Al-Azzawi, F. (2009). Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* *63*, 142–148.

Li, G., Satyamoorthy, K., and Herlyn, M. (2001). N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of. 3819–3825.

Li, H., Xu, L.L., Masuda, K., Raymundo, E., McLeod, D.G., Dobi, A., and Srivastava, S. (2008). A feedback loop between the androgen receptor and a NEDD4-binding protein, PMEPA1, in prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 28988–28995.

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, P., Yang, R., and Gao, W.-Q. (2014). Contributions of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells to the development of castration resistance of prostate cancer. *Mol. Cancer* *13*, 55.

Li, Y., Alsagabi, M., Fan, D., Bova, G.S., Tewfik, A.H., and Dehm, S.M. (2011). Intragenic rearrangement and altered RNA splicing of the androgen receptor in a cell-based model of prostate cancer progression. *Cancer Res.* *71*, 2108–2117.

Li, Y., Hwang, T.H., Oseth, L. a, Hauge, a, Vessella, R.L., Schmechel, S.C., Hirsch, B., Beckman, K.B., Silverstein, K. a, and Dehm, S.M. (2012). AR intragenic deletions linked to androgen receptor splice variant expression and activity in models of prostate cancer progression. *Oncogene* *4759–4767*.

Li, Y., Chan, S.C., Brand, L.J., Hwang, T.H., Silverstein, K. a T., and Dehm, S.M. (2013). Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* *73*, 483–489.

Liao, G., Chen, L.-Y., Zhang, A., Godavarthy, A., Xia, F., Ghosh, J.C., Li, H., and Chen, J.D. (2003). Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J. Biol. Chem.* *278*, 5052–5061.

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.

Libusova, L., Stemmler, M.P., Hierholzer, A., Schwarz, H., and Kemler, R. (2010). N-cadherin can structurally substitute for E-cadherin during intestinal development but leads to polyp formation. *Development* *137*, 2297–2305.

- Lin, H.K., Wang, L., Hu, Y.C., Altuwaijri, S., and Chang, C. (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* *21*, 4037–4048.
- Litvinov, I. V, De Marzo, A.M., and Isaacs, J.T. (2003). Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *88*, 2972–2982.
- Liu, G., Sprenger, C., Sun, S., Epilepsia, K.S., Haugk, K., Zhang, X., Coleman, I., Nelson, P.S., and Plymate, S. (2013). AR variant ARv567es induces carcinogenesis in a novel transgenic mouse model of prostate cancer. *Neoplasia* *15*, 1009–1017.
- Liu, G., Sprenger, C., Wu, P., Sun, S., Uo, T., Haugk, K., Epilepsia, K.S., and Plymate, S. (2014a). MED1 mediates androgen receptor splice variant induced gene expression in the absence of ligand. *Oncotarget* *6*, 288–304.
- Liu, L.L., Xie, N., Sun, S., Plymate, S., Mostaghel, E., and Dong, X. (2014b). Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. *Oncogene* *33*, 3140–3150.
- Long, J., Robert, G., and Wallerand, H. (2011). Prostate.
- Long, R.M., 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. (Lond.)* *108*, 1–11.
- Lorente, D., Mateo, J., Zafeiriou, Z., Smith, A.D., Sandhu, S., Ferraldeschi, R., and de Bono, J.S. (2015). Switching and withdrawing hormonal agents for castration-resistant prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* *12*, 37–47.
- Lu, C., and Luo, J. (2013). Decoding the androgen receptor splice variants. *Transl. Androl. Urol.* *2*, 178–186.
- Lu, K., Liu, C., Tao, T., Zhang, X., Zhang, L., Sun, C., Wang, Y., Chen, S., Xu, B., and Chen, M. (2015). MicroRNA-19a regulates proliferation and apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells by targeting BTG1. *FEBS Lett.* *589*, 1485–1490.
- Lu, W., Luo, Y., Kan, M., and McKeehan, W.L. (1999). Fibroblast growth factor-10: A second candidate stromal to epithelial cell andromedin in prostate. *J. Biol. Chem.* *274*, 12827–12834.
- Mani, S. a, Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Marcias, G., Erdmann, E., Lapouge, G., Siebert, C., Barthélémy, P., Duclos, B., Bergerat, J.-P., Céraline, J., 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.
- 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. (2007a). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 256–269.
- De Marzo, A.M., Nakai, Y., and Nelson, W.G. (2007b). Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* *25*, 398–400.
- 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.
- 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.

- McEwan, I.J. (2004). Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: Structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocr. Relat. Cancer* 11, 281–293.
- McKeithen, D., Graham, T., Chung, L.W.K., and Otero-Marah, V. (2010). Snail transcription factor regulates neuroendocrine differentiation in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate* 70, 982–992.
- McKinley, M.P. (2014). Anatomie et physiologie.
- Mediwala, S.N., Sun, H., Szafran, A.T., Hartig, S.M., Sonpavde, G., Hayes, T.G., Thiagarajan, P., Mancini, M. a, and Marcelli, M. (2012). The activity of the androgen receptor variant AR-V7 is regulated by FOXO1 in a PTEN-PI3K-AKT-dependent way. *Prostate* 73, 267–277.
- Merckx, P., David, D.J., and Lee-Robin, S.H. (2010). Destruction par ultrasons focalisés de haute intensité par voie rectale d'un adénocarcinome localisé de la prostate.
- Mitra, a, Fisher, C., Foster, C.S., Jameson, C., Barbachanno, Y., Bartlett, J., Bancroft, E., Doherty, R., Kote-Jarai, Z., Peock, S., et al. (2008). Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. *Br. J. Cancer* 98, 502–507.
- Mo, W., Zhang, J., Li, X., Meng, D., Gao, Y., Yang, S., Wan, X., Zhou, C., Guo, F., Huang, Y., et al. (2013). Identification of Novel AR-Targeted MicroRNAs Mediating Androgen Signalling through Critical Pathways to Regulate Cell Viability in Prostate Cancer. *PLoS One* 8, e56592.
- Mohammed, A., Miller, S., Douglas-Moore, J., and Miller, M. (2014). Cryotherapy and its applications in the management of urologic malignancies: A review of its use in prostate and renal cancers. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 32, 39.e19–e39.e27.
- 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.
- Mooney, S.M., Parsana, P., Hernandez, J.R., Liu, X., Verdone, J.E., Torga, G., Harberg, C. a., and Pienta, K.J. (2015). The Presence of Androgen Receptor Elements Regulates ZEB1 Expression in the Absence of Androgen Receptor. *J. Cell. Biochem.* 116, 115–123.
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3, e2888.
- 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.
- Mudryj, M., and Tepper, C.G. (2013). On the Origins of the Androgen Receptor Low Molecular Weight Species. *Horm. Cancer* 4, 259–269.
- Myung, J.K., Banuelos, C. a., Fernandez, J.G., Mawji, N.R., Wang, J., Tien, A.H., Yang, Y.C., Tavakoli, I., Haile, S., Watt, K., et al. (2013). An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *J. Clin. Invest.* 123, 2948–2960.
- Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Yang, J., Lou, W., Evans, C.P., and Gao, a C. (2013). NF-kappaB2/p52 induces resistance to Enzalutamide in Prostate Cancer: Role of androgen receptor and its variants. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1629–1637.

- Nadiminty, N., Tummala, R., Liu, C., Lou, W., Evans, C.P., and Gao, a. C. (2015). NF-kappaB2/p52:c-Myc:hnRNPA1 pathway regulates expression of androgen receptor splice variants and enzalutamide sensitivity in prostate cancer. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 1884–1895.
- Najy, A.J., Day, K.C., and Day, M.L. (2008a). The ectodomain shedding of E-cadherin by ADAM15 supports ErbB receptor activation. *J. Biol. Chem.* *283*, 18393–18401.
- Najy, A.J., Day, K.C., and Day, M.L. (2008b). ADAM15 supports prostate cancer metastasis by modulating tumor cell-endothelial cell interaction. *Cancer Res.* *68*, 1092–1099.
- Nalla, A.K., Estes, N., Patel, J., and Rao, J.S. (2011). N-cadherin mediates angiogenesis by regulating monocyte chemoattractant protein-1 expression via PI3K/Akt signaling in prostate cancer cells. *Exp. Cell Res.* *317*, 2512–2521.
- Nelson, W.G., Marzo, A.M. De, and Isaacs, W.B. (2003). Prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* *349*, 366–381.
- Ngan, S., Stronach, E. a, Photiou, a, Waxman, J., Ali, S., and Buluwela, L. (2009). Microarray coupled to quantitative RT-PCR analysis of androgen-regulated genes in human LNCaP prostate cancer cells. *Oncogene* *28*, 2051–2063.
- Nishiyama, T., Ishizaki, F., Anraku, T., Shimura, H., and Takahashi, K. (2004). The Influence of Androgen Deprivation Therapy on Dihydrotestosterone Levels in the Prostatic Tissue of Patients with Prostate Cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 7121–7126.
- Nordin, A., Wang, W., Welén, K., and Damber, J.E. (2013). Midkine is associated with neuroendocrine differentiation in castration-resistant prostate cancer. *Prostate* *73*, 657–667.
- Nupponen, N.N., Kakkola, L., Koivisto, P., and Visakorpi, T. (1998). Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am. J. Pathol.* *153*, 141–148.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S. a, Yang, J., Lander, E.S., and Weinberg, R. a (2008). Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* *68*, 3645–3654.
- Ottman, R., Nguyen, C., Lorch, R., and Chakrabarti, R. (2014). MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance. *Mol. Cancer* *13*, 1.
- Ousset, M., Van Keymeulen, A., Bouvencourt, G., Sharma, N., Achouri, Y., Simons, B.D., and Blanpain, C. (2012). Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1131–1138.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.-R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* *307*, 1603–1609.
- Palapattu, G.S., Sutcliffe, S., Bastian, P.J., Platz, E. a., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2005). Prostate carcinogenesis and inflammation: Emerging insights. *Carcinogenesis* *26*, 1170–1181.
- Panda, D.K., Miao, D., Lefebvre, V., Hendy, G.N., and Goltzman, D. (2001). The Transcription Factor SOX9 Regulates Cell Cycle and Differentiation Genes in Chondrocytic CFK2 Cells. *J. Biol. Chem.* *276*, 41229–41236.
- Park, M.K., You, H.J., Lee, H.J., Kang, J.H., Oh, S.H., Kim, S.Y., and Lee, C.H. (2013). Transglutaminase-2 induces N-cadherin expression in TGF-β1-induced epithelial mesenchymal transition via c-Jun-N-terminal kinase activation by protein phosphatase 2A down-regulation. *Eur. J. Cancer* *49*, 1692–1705.
- Parkin, D.M., Bray, F.I., and Devesa, S.S. (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur. J. Cancer* *37*, S4–S66.

- Peacock, S.O., Fahrenholtz, C.D., and Burnstein, K.L. (2012). Vav3 Enhances Androgen Receptor Splice Variant Activity and Is Critical for Castration-Resistant Prostate Cancer Growth and Survival. *Mol. Endocrinol.* 26, 1967–1979.
- Perissi, V., and Rosenfeld, M.G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 542–554.
- Perlmutter, M.A., and Lepor, H. (2007). Androgen Deprivation Therapy in the Treatment of Advanced Prostate Cancer. *Rev. Urol.* 9, S3–S8.
- Polyak, K., and Weinberg, R. a (2009). Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.
- Poukka, H., Karvonen, U., Janne, O. a, and Palvimo, J.J. (2000). Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14145–14150.
- Prall, F. (2007). Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 50, 151–162.
- Prescott, J.L., Blok, L., and Tindall, D.J. (1998). Isolation and androgen regulation of the human homeobox cDNA, NKX3.1. *Prostate* 35, 71–80.
- Qin, J., Lee, H., Wu, S., Lin, S., Lanz, R.B., Creighton, C.J., Demayo, F.J., Tsai, S.Y., and Tsai, M. (2014). Androgen deprivation – induced NCoA2 promotes metastatic and castration-resistant prostate cancer. *J. Clin. Invest.* 124, 5013–5026.
- Rangel, M.C., Karasawa, H., Castro, N.P., Nagaoka, T., Salomon, D.S., and Bianco, C. (2012). Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am. J. Pathol.* 180, 2188–2200.
- Rathinam, R., and Alahari, S.K. (2010). Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 223–237.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271.
- Reid, J., Betney, R., Watt, K., and McEwan, I.J. (2003). The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein–protein interactions. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1042–1046.
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., and Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J.* 24, 742–752.
- Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J., and Collins, A.T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell Sci.* 117, 3539–3545.
- Ripert, T., Crouzet, S., Ploussard, G., De La Taille, A., and Robert, G. (2013). Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de CYP17A1 dans le cancer de la prostate résistant à la castration. *Progrès En Urol.* 23, S16–S22.
- Rizzo, S., Attard, G., and Hudson, D.L. (2005). Prostate epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 38, 363–374.
- 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 Heat Shock Protein 27 Increases after Androgen Ablation and Plays a Cytoprotective Role in Hormone-Refractory Prostate Cancer. *Cancer Res.* 64, 6595–6602.

- Rocchi, P., Beraldi, E., Ettinger, S., Fazli, L., Vessella, R.L., Nelson, C., and Gleave, M. (2005). Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis. *Cancer Res.* 65, 11083–11093.
- Rocha, J., Zouanat, F.Z., Zoubeydi, A., Hamel, L., Benidir, T., Scarlata, E., Brimo, F., Aprikian, A., and Chevalier, S. (2013). The Fer tyrosine kinase acts as a downstream interleukin-6 effector of androgen receptor activation in prostate cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 381, 140–149.
- Rooney, B., O'Donovan, H., Gaffney, A., Browne, M., Faherty, N., Curran, S.P., Sadlier, D., Godson, C., Brazil, D.P., and Crean, J. (2011). CTGF/CCN2 activates canonical Wnt signalling in mesangial cells through LRP6: implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. *FEBS Lett.* 585, 531–538.
- Roupret, M., and Beley, S. (2008). *Urologie*.
- Van Roy, F. (2014). Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 14, 121–134.
- 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.
- Rytinki, M., Kaikkonen, S., Sutinen, P., Paakinaho, V., Rahkama, V., and Palvimo, J.J. (2012). Dynamic SUMOylation Is Linked to the Activity Cycles of Androgen Receptor in the Cell Nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4195–4205.
- Sack, J.S., Kish, K.F., Wang, C., Attar, R.M., Kiefer, S.E., An, Y., Wu, G.Y., Scheffler, J.E., Salvati, M.E., Krystek, S.R., et al. (2001). Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4904–4909.
- Sadar, M.D. (2011). Small Molecule Inhibitors Targeting the Achilles ' Heel of Androgen Receptor Activity. *Cancer Res.* 71, 1208–1213.
- Sahu, B., Laakso, M., Ovaska, K., Mirtti, T., Lundin, J., Rannikko, A., Sankila, A., Turunen, J.-P., Lundin, M., Konsti, J., et al. (2011). Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *EMBO J.* 30, 3962–3976.
- 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.
- 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. En Urol.* 20, S217–S251.
- 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.
- Schauwaers, K., De Gendt, K., Saunders, P.T.K., Atanassova, N., Haelens, A., Callewaert, L., Moehren, U., Swinnen, J. V, Verhoeven, G., Verrijdt, G., et al. (2007). Loss of androgen receptor binding to selective androgen response elements causes a reproductive phenotype in a knockin mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4961–4966.
- Scheel, C., and Weinberg, R. a. (2011). Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *Int. J. Cancer* 129, 2310–2314.

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* 2027–2035.

Sérandour, A. a., Avner, S., Percevault, F., Demay, F., Bizot, M., Lucchetti-Miganeh, C., Barloy-Hubler, F., Brown, M., Lupien, M., Métivier, R., et al. (2011). Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res.* 21, 555–565.

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

Shen, M.M., and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev.* 24, 1967–2000.

Signoretti, S., Waltregny, D., Dilks, J., Isaac, B., Lin, D., Garraway, L., Yang, a, Montironi, R., McKeon, F., and Loda, M. (2000). P63 Is a Prostate Basal Cell Marker and Is Required for Prostate Development. *Am. J. Pathol.* 157, 1769–1775.

Singh, a, and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741–4751.

Singh, S., Singh, R., Sharma, P.K., Singh, U.P., Rai, S.N., Chung, L.W.K., Cooper, C.R., Novakovic, K.R., Grizzle, W.E., and Lillard, J.W. (2009). Serum CXCL13 positively correlates with prostatic disease, prostate-specific antigen and mediates prostate cancer cell invasion, integrin clustering and cell adhesion. *Cancer Lett.* 283, 29–35.

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* (80-. ). 274, 1371–1374.

Smith, R. a, Cokkinides, V., and Eyre, H.J. (2005). American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2006. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 31–44.

Song, Y., Washington, M.K., and Crawford, H.C. (2010). Loss of FOXA1/2 is essential for the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 70, 2115–2125.

Sood, R., Bonner, T.I., Makalowska, I., Stephan, D. a, Robbins, C.M., Connors, T.D., Morgenbesser, S.D., Su, K., Faruque, M.U., Pinkett, H., et al. (2001). Cloning and characterization of 13 novel transcripts and the human RGS8 gene from the 1q25 region encompassing the hereditary prostate cancer (HPC1) locus. *Genomics* 73, 211–222.

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.

Stein, M.N., Patel, N., Bershadskiy, A., Sokoloff, A., and Singer, E. a (2014). Androgen synthesis inhibitors in the treatment of castration-resistant prostate cancer. *Asian J. Androl.* 16, 387–400.

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.

Stevens, A., and Lowe, J. (1997). *Histologie Humaine*.

- Stokes, S.H. (2000). Comparison of biochemical disease-free survival of patients with localized carcinoma of the prostate undergoing radical prostatectomy, transperineal ultrasound-guided radioactive seed implantation, or definitive external beam irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 47, 129–136.
- Sun, F., Chen, H.G., Li, W., Yang, X., Wang, X., Jiang, R., Guo, Z., Chen, H.G., 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.
- Sun, S., Sprenger, C.C.T., Vessella, R.L., Haugk, K., Soriano, K., Mostaghel, E.A., Page, S.T., Coleman, I.M., Nguyen, H.M., Sun, H., et al. (2010). Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. *J. Clin. Invest.* 120, 2715–2730.
- Sun, Y., Wang, B.-E., Leong, K.G., Yue, P., Li, L., Jhunjhunwala, S., Chen, D., Seo, K., Modrusan, Z., Gao, W.-Q., et al. (2012). Androgen deprivation causes epithelial-mesenchymal transition in the prostate: implications for androgen-deprivation therapy. *Cancer Res.* 72, 527–536.
- Sutinen, P., Malinen, M., Heikkinen, S., and Palvimo, J.J. (2014). SUMOylation modulates the transcriptional activity of androgen receptor in a target gene and pathway selective manner. *Nucleic Acids Res.* 42, 8310–8319.
- 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.
- 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, 1414–1420.
- Tandefelt, D.G., Boormans, J., Hermans, K., and Trapman, J. (2014). ETS fusion genes in prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 21, R143–R152.
- Tanji, N., Aoki, K., and Yokoyama, M. (2001). Growth factors: roles in andrology. *Arch. Androl.* 47, 1–7.
- Taplin, M., Bubley, G.J., Ko, Y., Small, E.J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S.P. (1999). Selection for Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancers Treated with Androgen Antagonist. *Cancer Res.* 59, 2511–2515.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890.
- Thieu, W., Tilki, D., DeVere White, R.W., and Evans, C.P. (2014). The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 32, 517–523.
- Thomas, M. a, Preece, D.M., and Bentel, J.M. (2010). Androgen regulation of the prostatic tumour suppressor NKX3.1 is mediated by its 3' untranslated region. *Biochem. J.* 425, 575–583.
- Tiwari, N., Meyer-Schaller, N., Arnold, P., Antoniadis, H., Pachkov, M., van Nimwegen, E., and Christofori, G. (2013). Klf4 Is a Transcriptional Regulator of Genes Critical for EMT, Including Jnk1 (Mapk8). *PLoS One* 8, e57329.
- Tomita, K., van Bokhoven, a, van Leenders, G.J., Ruijter, E.T., Jansen, C.F., Bussemakers, M.J., and Schalken, J. a (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60, 3650–3654.
- Tran, N.L., Adams, D.G., Vaillancourt, R.R., and Heimark, R.L. (2002). Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.* 277, 32905–32914.

Tsai, H.C., Boucher, D.L., Martinez, A., Tepper, C.G., and Kung, H.J. (2012). Modeling Truncated AR Expression in a Natural Androgen Responsive Environment and Identification of RHOB as a Direct Transcriptional Target. *PLoS One* 7, e49887.

Ulfing, N., and Karmann, H. (2006). *Précis d'histologie*.

Veldscholte, J., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G., Jenster, G., Berrevoets, C., Claassen, E., van Rooij, H., Trapman, J., Brinkmann, A., 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.

Verhagen, a P., Aalders, T.W., Ramaekers, F.C., Debruyne, F.M., and Schalken, J. a (1988). Differential expression of keratins in the basal and luminal compartments of rat prostatic epithelium during degeneration and regeneration. *Prostate* 13, 25–38.

Verras, M., and Sun, Z. (2005). Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* 19, 391–398.

Verrijdt, G., Haelens, A., and Claessens, F. (2003). Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol. Genet. Metab.* 78, 175–185.

Villers, A., and Grosclaude, P. (2008). *Epidémiologie du cancer de la prostate*. *Médecine Nucléaire* 32, 2–4.

Vincent, T., Neve, E.P. a, Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 11, 943–950.

Wadhera, P. (2013). An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 10, 358–366.

Walsh, C. a., Qin, L., Tien, J.C.Y., Young, L.S., and Xu, J. (2012). The function of steroid receptor coactivator-1 in normal tissues and cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 470–485.

Wang, D., Garcia-Bassets, I., Benner, C., Li, W., Su, X., Zhou, Y., Qiu, J., Liu, W., Kaikkonen, M.U., Ohgi, K. a, et al. (2011). Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* 474, 390–394.

Wang, L., Hsu, C.L., and Chang, C. (2005). Androgen receptor corepressors: An overview. *Prostate* 63, 117–130.

Wang, S., Gao, J., Lei, Q., Rozengurt, N., Pritchard, C., Jiao, J., Thomas, G. V., Li, G., Roy-Burman, P., Nelson, P.S., et al. (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* 4, 209–221.

Wang, X.D., Wang, B.E., Soriano, R., Zha, J., Zhang, Z., Modrusan, Z., Cunha, G.R., and Gao, W.Q. (2007). Expression profiling of the mouse prostate after castration and hormone replacement: Implication of H-cadherin in prostate tumorigenesis. *Differentiation* 75, 219–234.

Wang, Y., Wu, S., Jiang, B., Yin, F., Zheng, S., and Hou, S. (2015). Role of MicroRNAs in Prostate Cancer Pathogenesis. *Clin. Genitourin. Cancer* 13, 261–270.

Watson, P. a, Chen, Y.F., Balbas, M.D., Wongvipat, J., Socci, N.D., Viale, A., Kim, K., and Sawyers, C.L. (2010). Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16759–16765.

- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1487–1495.
- De Wever, O., Derycke, L., Hendrix, A., De Meerleer, G., Godeau, F., Depypere, H., and Bracke, M. (2007). Soluble cadherins as cancer biomarkers. *Clin. Exp. Metastasis* *24*, 685–697.
- Wheater, P.R., Young, B., and Heath, J.W. (2001). *Histologie fonctionnelle*.
- Wilt, T.J., Brawer, M.K., Jones, K.M., Barry, M.J., Aronson, W.J., Fox, S., Gingrich, J.R., Wei, J.T., Gilhooly, P., Grob, B.M., et al. (2012). Radical prostatectomy versus observation for localized prostatic cancer. *N. Engl. J. Med.* *367*, 203–213.
- 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.
- Xiang, Y., Wang, Z., Murakami, J., Plummer, S., Klein, E. a, Carpten, J.D., Trent, J.M., Isaacs, W.B., Casey, G., and Silverman, R.H. (2003). Effects of RNase L Mutations Associated with Prostate Cancer on Apoptosis Induced by 2', 5'-Oligoadenylates Effects of RNase L Mutations Associated with Prostate Cancer on Apoptosis. *Cancer Res.* *63*, 6795–6801.
- Xin, L., Lawson, D. a, and Witte, O.N. (2005). The Sca-1 cell surface marker enriches for a prostate-regenerating cell subpopulation that can initiate prostate tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6942–6947.
- 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.*
- Xu, K., Shimelis, H., Linn, D.E., Jiang, R., Yang, X., Sun, F., Guo, Z., Chen, H., Li, W., Chen, H., et al. (2009). Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination. *Cancer Cell* *15*, 270–282.
- Xue, Y., Smedts, F., Debruyne, F.M.J., Rosette, J.J.M.C.H. De, and Schalken, J. a (1998). Identification of Intermediate Cell Types by Human Prostate. *Prostate* *34*, 292–301.
- Yamamichi, F., Shigemura, K., Behnsawy, H.M., Meligy, F.Y., Huang, W.-C., Li, X., Yamanaka, K., Hanioka, K., Miyake, H., Tanaka, K., et al. (2014). Sonic hedgehog and androgen signaling in tumor and stromal compartments drives epithelial–mesenchymal transition in prostate cancer. *Scand. J. Urol.* *48*, 523–532.
- Yang, Y.A., and Yu, J. (2015). Current perspectives on FOXA1 regulation of androgen receptor signaling and prostate cancer. *Genes Dis.* *2*, 144–151.
- Yang, F., Sun, L., Li, Q., Han, X., Lei, L., Zhang, H., and Shang, Y. (2011). SET8 promotes epithelial–mesenchymal transition and confers TWIST dual transcriptional activities. *EMBO J.* *31*, 110–123.
- Yang, Z., Zhang, X., Gang, H., Li, X., Li, Z., Wang, T., Han, J., Luo, T., Wen, F., and Wu, X. (2007). Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *358*, 925–930.
- Yi, L., and Hu, Q. (2014). CYP17 inhibitors—abiraterone, C17,20-lyase inhibitors and multi-targeting agents. *Nat. Rev. Urol.* *11*, 32–42.
- Yue, W., Sun, Q., Landreneau, R., Wu, C., Siegfried, J.M., Yu, J., and Zhang, L. (2009). Fibulin-5 suppresses lung cancer invasion by inhibiting matrix metalloproteinase-7 expression. *Cancer Res.* *69*, 6339–6346.

Zaravinos, A. (2015). Review Article The Regulatory Role of MicroRNAs in EMT and Cancer. *J. Oncol.* ID865816.

Zeigler-Johnson, C., Friebel, T., Walker, A.H., Wang, Y., Spangler, E., Panossian, S., Patacsil, M., Aplenc, R., Wein, A.J., Malkowicz, S.B., et al. (2004). CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res.* *64*, 8461–8467.

Zeisberg, M., and Neilson, E.G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* *119*, 1429–1437.

Zhai, Y., Iura, a, Yeasmin, S., Wiese, a B., Wu, R., Feng, Y., Fearon, E.R., and Cho, K.R. (2011). MSX2 is an oncogenic downstream target of activated WNT signaling in ovarian endometrioid adenocarcinoma. *Oncogene* *30*, 4152–4162.

Zhao, Y., Tindall, D.J., and Huang, H. (2014). Modulation of androgen receptor by FOXA1 and FOXO1 factors in prostate cancer. *Int. J. Biol. Sci.* *10*, 614–619.

Zhu, H., Mazor, M., Kawano, Y., Walker, M., Leung, H., Armstrong, K., Waxman, J., and Kypta, R. (2004). Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: Mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer Res.* *64*, 7918–7926.

**PUBLICATIONS ET  
COMMUNICATIONS  
PERSONNELLES**

## **LISTE DES PUBLICATIONS**

### **1 publication acceptée :**

**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(5):e63466

### **1 publication soumise :**

**Félicie Cottard**, Pauline Berthélémy, Eva Erdmann, Irène Asmane, Frédérique Schaff-Wendling, Céline Keime, Tao Ye, Jean-Emmanuel Kurtz et Jocelyn Céraline. Dual effects of constitutively active androgen receptor and full-length androgen receptor for N-cadherin regulation in prostate cancer

## LISTE DES COMMUNICATIONS

1. ESUR, Innsbruck (Autriche), 15-17 Septembre 2011

Poster

**Constitutively active androgen receptors deregulate N-cadherin gene expression in prostate cancer.** Cottard F., Meyer S., Erdmann E., Kurtz J.E., Bergerat J.P., Céraline J.

2. EuCC, Freiburg (Allemagne), Mai 2012

Communication Orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Sandra Meyer, Philippe Barthélémy, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

3. ESUR, Strasbourg (France), 25-27 Octobre 2012

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Cottard F., Asmane I., Erdmann E., Meyer S., Barthélémy P., Bergerat J.P., Kurtz J.E., Céraline J.

4. Androgens 2012, Helsinki (Finlande), 8-10 Novembre 2012

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

5. EuCC, Strasbourg (France), Mai 2013

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

6. EMBO, Amsterdam (Pays-Bas), 21-24 Septembre 2013

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

7. Premières journées de la FMTS, Strasbourg (France), 13-14 juin 2013

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

8. Journée des Récepteurs Nucléaires, Toulouse (France), 11 Octobre 2013

Communication Orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

9. ARTP, Paris (France), 20 novembre 2013

Poster, « Prix meilleur Poster »

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

10. 7<sup>ème</sup> Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg (France), 25-26 novembre 2013

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

11. AACR meeting, San Diego (USA), 5-9 avril 2014

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

12. Deuxièmes journées de la FMTS, Strasbourg (France), 1-2 juillet 2014

Communication orale, « Prix meilleure communication »

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Pierre Bergerat, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

13. Androgens 2014, Londres (Royaume-Uni), 17-19 septembre 2014

Poster, « Prix meilleur poster »

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

14. ESUR, Glasgow (Royaume-Uni), 9-11 octobre 2014

Poster, « Travel Award »

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

15. ARTP, Paris (France), 19 Novembre 2014

Communication orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

16. 8<sup>ème</sup> Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg (France), 20-21 Novembre 2014

Communication orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

17. Journée de la Ligue, Strasbourg (France), 3 Décembre 2014

Communication orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

18. Doctoral School Days, Strasbourg (France), 26-27 Avril 2015

Communication orale

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

19. Troisièmes journées de la FMTS, Strasbourg (France), 16-17 Avril 2015

Poster

**Constitutively active androgen receptor variants upregulate mesenchymal markers expression in prostate cancer.** Félicie Cottard, Pauline Berthélémy, Irène Asmane, Eva Erdmann, Jean-Emmanuel Kurtz, Jocelyn Céraline

## Impact des altérations du récepteur des androgènes sur les voies de signalisation liées à la différenciation cellulaire et à la progression du cancer de la prostate

Les androgènes jouent un rôle important dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses prostatiques et cette hormono-dépendance est mise à profit pour le traitement des formes métastatiques du cancer de la prostate. Toutefois, l'émergence de variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes (RA) dépourvus de leur partie C-terminale conduit inévitablement à une résistance au traitement. De plus, des données récentes suggèrent que ces variants du RA pourraient également contribuer à la progression du cancer de la prostate. Mon projet de thèse avait donc pour but d'étudier l'impact des variants constitutivement actifs du RA sur les voies de signalisation et les mécanismes conduisant à la progression tumorale. Dans un premier temps, j'ai montré que les variants constitutivement actifs du RA induisent un programme de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) partielle, un phénomène observé lors de la progression tumorale favorisant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. En effet, bien qu'aucune diminution du marqueur épithélial E-cadhérine n'ait été observée, les variants du RA sont associés à une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine, la vimentine et les facteurs de transcription SNAIL et ZEB1 comparée à un récepteur des androgènes entier (AR-FL). Afin d'avoir une meilleure compréhension du mode d'action des variants constitutivement actifs du RA dans la progression tumorale, j'ai ensuite étudié les mécanismes conduisant à cette expression différentielle de marqueurs de l'EMT en me focalisant sur la N-cadhérine. Bien que l'AR-FL et les variants constitutivement actifs du RA interagissent tous les deux au niveau des éléments de réponse aux androgènes dans l'intron 1 de la N-cadhérine, les modifications des histones qui en résultent sont différentes. En effet, une augmentation du niveau d'acétylation des histones dans cette région est observée uniquement en présence des variants du RA. L'ensemble de mes données nous mène à un modèle où l'AR-FL réprimerait l'expression de la N-cadhérine alors que les variants du RA induiraient au contraire son expression. Mes données de thèse soulignent ainsi l'importance de développer de nouvelles thérapies ciblant les variants constitutifs du RA ou leur mode d'action.

**Mots Clés :** Cancer de la prostate ; Variants constitutivement actifs du récepteur des androgènes ; Transition Epithélio-Mésenchymateuse (EMT) ; N-cadhérine ; Régulation transcriptionnelle

Androgens play a key role in prostate cancer cells survival and proliferation that is why androgen receptor (AR) signaling pathway is the main therapeutic target for metastatic prostate cancer. However, the expression of constitutively active AR variants lacking the carboxy-terminal end lowers therapy efficacy. Recent data suggest that these AR variants could also be associated with prostate cancer progression. So, the aim of my project was to study the impact of AR variants on signaling pathways and mechanisms leading to tumor progression. First, I showed that AR variants induce a partial epithelial-mesenchymal transition (EMT), a phenomenon observed during tumor progression promoting cancer cells migration and invasion. Although a loss of the epithelial marker E-cadherin was not observed, AR variants led to an upregulation of mesenchymal markers such as N-cadherin, vimentin, SNAIL and ZEB1 when compared to a full length AR (AR-FL). To have a better understanding of the mode of action of AR variants in EMT, I have studied the mechanisms leading to this differential expression of mesenchymal markers by focusing my research on N-cadherin regulation. While both AR-FL and AR variants could interact with androgen response elements present in intron 1 of N-cadherin, I highlighted that they had opposite effects concerning histone modifications. Indeed, increased histone acetylation in this genomic region was observed only in the presence of AR variants. All together my data lead us to propose a model in which AR-FL represses the N-cadherin gene, while on the contrary AR variants favor its expression. So, these findings evidenced the importance to develop new therapies to target these AR variants or their mode of action in prostate cancer.

**Key words:** Prostate cancer; Constitutively active androgen receptor variants; Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT); N-cadherin; Transcriptional regulation