Etude du ligand TRAIL et ses récepteurs dans la prostate normale et pathologique reliée au statut hormonal

Marie Réveiller

▶ **To cite this version:**

Marie Réveiller. Etude du ligand TRAIL et ses récepteurs dans la prostate normale et pathologique reliée au statut hormonal. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00323115

HAL Id: tel-00323115
https://theses.hal.science/tel-00323115

Submitted on 19 Sep 2008

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

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

N° d'ordre 128-2008 Année 2008

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 21 juillet 2008

par

Marie REVEILLER

Etude du ligand TRAIL et ses récepteurs dans la prostate normale et pathologique reliée au statut hormonal

Directeur de thèse : Madame le Docteur GRATAROLI

JURY :
Monsieur le Professeur Jean ANDRE, Président
Monsieur le Professeur Patrick FENICHEL, Rapporteur
Monsieur le Docteur Gwendal LAZENNEC, Rapporteur
Monsieur le Professeur Laurent MOREL, Rapporteur
Monsieur le Professeur Marian DEVONEC
Monsieur le Professeur Mohamed BENAHMED
Madame le Docteur Renée GRATAROLI

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	**M. le Professeur L. COLLET**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur P. COCHAT
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur G. CLERC
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

~

A ma mère,

A qui je dédie ma thèse pour m'avoir encouragée sans relâche dans mes études et particulièrement dans cette dernière aventure qu'est la thèse.

Un immense merci pour m'avoir donné l'opportunité de parvenir au bout de ce long chemin universitaire.

A mon père, mes frères et ma sœur, ma cousine Florence, et toute ma famille,

Merci d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces années. Vous êtes mes piliers, ma source.

A mes amis,

Julian, Emilie & Kristian, Gaëtan & Chantal, Christophe & Kasia, Aurélie, Aurélien, Virginie & Pierre, Hanane, Delphine,

Pour avoir partagé avec vous tant de bons moments qui donnent la force d'affronter le quotidien de thésard pas toujours facile.

A Sébastien,

Mon soleil pendant cette dernière année de thèse.

Un grand merci pour ton soutien au quotidien.

Grâce à toi, j'ai gardé confiance en moi dans les moments de doute.

Je souhaite remercier le Dr Mohamed Benahmed pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Vos conseils avisés m'ont été une grande aide, me permettant de rebondir dans mes recherches.

Je souhaite également remercier le Dr Renée Grataroli, mon directeur de thèse pour son soutien et sa gentillesse tout au long de ma thèse. Merci du temps que tu as pu me consacrer malgré tes impératifs.

Un grand merci au Professeur Marian Devonec pour m'avoir fait connaître l'unité Inserm 407, ainsi qu'au Docteur Alain Ruffion pour leur disponibilité et leurs conseils.

Je suis très reconnaissante envers mes rapporteurs, le Professeur Patrick Fenichel, le Professeur Laurent Morel et le Docteur Gwendal Lazennec, qui ont pris sur leur temps pour étudier mon travail.

Je remercie le Professeur Jean André pour avoir accepté de présider cette thèse et pour sa disponibilité tout au long de ma thèse

Egalement, je tiens à remercier les docteurs Anne Charié et Bruno Mathian des services de radioanalyses et d'hormonologie de l'Hôpital Lyon-Sud pour leur aide technique.

Merci à l'ensemble de l'équipe INSERM U407, pour cette ambiance de travail très sympathique, grâce à tous les étudiants et aux personnels :

Un immense merci à Jacqueline, pour sa bonne humeur, sa grande gentillesse et sa disponibilité ; merci également à Pierre pour son aide précieuse à l'animalerie ; merci à Catherine et Nicole pour leur aide, leur disponibilité et leur sympathie.

Merci à Claire Mauduit, Daniel Régnié, Myriam Decuassin, Christiane Levrat et Alain Goujeon pour leurs conseils scientifiques, leur disponibilité et leur gentillesse.

Un grand merci à Sophia, avec qui j'ai fait mes premiers pas dans l'expérimentation animale. Travaillez avec toi fut un réel plaisir. Merci pour ton aide précieuse.

Merci à Aurélien, Aurélie, Virginie, Béna, Souheila, Nisrine, Jean-Jacques, Véronique, Olga, Sadek, Léo, Amina, Fayçal, pour cette bonne ambiance.

Merci à David pour m'avoir encadrée dans mes débuts avec beaucoup d'attention.

Un grand merci également à l'équipe de Nice et particulièrement à Aurélie, pour m'avoir beaucoup aidé les derniers mois de ma thèse malgré la distance.

Enfin, je remercie vivement le Professeur Eric Gilson pour m'avoir accueilli dans son laboratoire cette dernière année de thèse ce qui m'a permis de finir mes travaux et de rédiger ma thèse dans de très bonnes conditions. Merci à son équipe et en particulier aux 2 Claire, à Delphine, Béa, Rita, Catherine, Serge et Adeline du site de Lyon-Sud.

TABLE DES MATIERES

~

ABREVIATIONS....11

I-INTRODUCTION....14

II-REVUE BIBLIOGRAPHIQUE....17

CHAPITRE I - LA PROSTATE....17

I. La prostate normale....19

1. Données anatomiques et histologiques....19

1.1. Anatomie....19

1.2. Histologie prostatique....19

2. Physiologie de la prostate....21

3. Interactions épithélium-mésenchyme....21

4. Contrôle neuroendocrinien de la prostate....23

4.1. La testostérone....23

4.1.1. Biosynthèse de la testostérone....23

4.1.2. La régulation des androgènes....25

4.1.3. Sécrétion et transport des androgènes....25

4.1.4. Le métabolisme de la testostérone....27

4.2. Rôle de la DHT dans la prostate....27

4.3. Le récepteur aux androgènes....29

4.3.1. Structure du gène et de la protéine du RA....29

4.3.2. Mode d'action du RA dans la prostate....31

La voie classique, dite génomique....31

La voie non génomique....32

4.4. Les œstrogènes....34

4.4.1. Les récepteurs aux œstrogènes (RE)....34

4.4.2. Le rôle des œstrogènes dans la prostate....34

II. Le cancer de la prostate....36

1. Epidémiologie : fréquence et facteurs de risques....36

2. Evolution naturelle du cancer de la prostate....40

2.1. Néoplasie intra-épithéliale prostatique....40

2.2. L'adénocarcinome prostatique....42

2.3. L'hormono-indépendance....44

2.4. Modifications génétiques et épigénétiques impliqués dans le cancer de la prostate 44
3. Diagnostic du cancer de la prostate 45
3.1. Le toucher rectal 45
3.2. Le dosage du PSA 46
3.3. Les biopsies de la prostate 47
4. Les traitements 47
4.1. Cancer de la prostate localisé (T1-2, No, Mo) 48
4.1.1. La prostatectomie radicale 48
4.1.2. La radiothérapie 48
4.2. Cancer de la prostate métastatique 48
4.2.1. Orchidectomie bilatérale 50
4.2.2. Analogues de la LH-RH 50
4.2.3. Anti-androgènes 50
4.3. Cancer prostatique au stade de l'échappement hormonal 52
4.3.1. L'hormonothérapie de deuxième ligne 53
4.3.2. La chimiothérapie 53
5. Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cancer de la prostate en échappement hormonal 55
5.1. Modifications de l'activation du RA 55
5.1.1. Hypersensibilité du RA aux androgènes 55
5.1.2. Activation du RA par des ligands inhabituels 56
5.1.3. Activation du RA sans ligand 57
5.1.4. Modification des co-régulateurs du RA 58
5.2. Voies alternatives de survie 59
5.3. Cellules souches 60
5.4. Rôle des œstrogènes et des RE 60
6. L'utilisation du bicalutamide dans le cancer de la prostate 62
6.1. Etudes pharmacocinétiques chez le rat et l'homme 62
6.2. Utilisation médicale et études cliniques 65
6.3. Interactions avec le RA 66
6.3.1. Effet du bicalutamide sur la conformation du RA 66
6.3.2. Effet du bicalutamide sur la localisation du RA 68
6.3.3. Effet du bicalutamide sur le complexe de transcription du RA 68
6.4. Effet du bicalutamide sur les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses 69
6.4.1. La croissance 69
6.4.2. L'apoptose 69
6.4.3. Les tumeurs prostatiques : modèles expérimentaux 70

6.5. Action agoniste du Bicalutamide 70
6.5.1. Syndrome de retrait des anti-androgènes 70
6.5.2. Mutations du RA 70
6.5.3. Surexpression du RA 71
6.5.4. Altérations des cofacteurs du RA 71
6.5.5. Autres voies d'activation du RA 72
III. Les modèles expérimentaux du cancer de la prostate 72
1. Les lignées cellulaires 72
2. Les modèles animaux 73
2.1. Les modèles animaux existants 74
2.1.1. Chez le rat 74
2.1.2. Chez la souris 74
2.1.2.1. Les modèles murins issus de la surexpression de gènes 75
2.1.2.2. Les modèles murins issus de l'inhibition de gènes 76
2.1.3. Chez le chien 78
2.2. Les modèles de xénogreffes 78
2.2.1. Les souris immunodéficientes 79
2.2.1.1. Les souris nude athymiques 79
2.2.1.2. Les souris SCID 79
2.2.1.3. Les autres souris immunodéficientes 80
2.2.2. Le matrigel 80
2.2.3. Les fibroblastes 81
2.2.4. Les nouvelles technologies d'analyse tumorale 81

CHAPITRE II - L'APOPTOSE
I. Mécanismes généraux du phénomène apoptotique 84
1. Les différents types de mort cellulaire 84
1.1. La nécrose 84
1.2. L'apoptose 84
1.2.1. Les caractéristiques de l'apoptose 84
1.2.2. L'apoptose, un phénomène conservé au cours de l'évolution 86
1.2.3. Rôle physiologique de l'apoptose 88
2. Les voies d'induction de l'apoptose 88
2.1. La voie mitochondriale 88
2.2. La voie des récepteurs de mort 90
2.2.1. Les ligands et récepteurs de la superfamille du TNF-α 90
2.2.2. Voies de signalisation 92

2.2.3. Activation de la voie mitochondriale par les récepteurs de mort 96
3. Les acteurs moléculaires de l'apoptose 98
3.1. La famille des caspases 98
3.1.1. Structure 98
3.1.2. Activation 98
3.1.3. Les substrats des caspases 100
3.2. La famille Bcl-2 102
3.3. Les inhibiteurs de l'apoptose 104
II. TRAIL et l'apoptose 106
1. TRAIL 106
1.1. Découverte du TRAIL 106
1.2. Aspects structuraux 108
1.3. Expression du ligand TRAIL 110
1.4. Rôles physiologiques de TRAIL 110
1.4.1. Surveillance anti-tumorale 110
1.4.2. Défense antivirale 111
1.4.3. Rôle dans la prévention de l'inflammation auto-immune 111
2. Les récepteurs de TRAIL 113
2.1. Aspects structuraux 113
2.2. Expression des récepteurs au TRAIL 114
2.3. La signalisation par les récepteurs de TRAIL 114
2.3.1. Apoptose induite par DR4 et DR5 114
2.3.2. Invalidation du gène TRAIL-R 115
2.3.3. Rôles de récepteurs leurres 115
2.3.4. Voie de signalisation de NF-κB 116
3. Applications thérapeutiques 116
3.1. Action des drogues sur la signalisation du TRAIL 116
3.2. Utilisation du TRAIL en thérapie anticancéreuse 117
III. Apoptose dans la prostate normale et pathologique - Implication du TRAIL 119
1. La prostate normale 119
2. Le cancer de la prostate 119
2.1. Le rôle des androgènes dans l'apoptose induite par les ligands de la famille du TNF-α 119
2.2. Les modifications d'expressions 120
2.3. Les mécanismes de résistance cellulaires à l'apoptose induite par TRAIL 120
2.4. Sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL 122

III-RESULTATS.....123
1-Régulation du ligand TRAIL et de ses récepteurs par les androgènes dans la prostate ventrale de rat.....125
ARTICLE PUBLIE.....126
2-Régulation de l'apoptose induite par TRAIL par les androgènes dans la lignée LNCaP...135
ARTICLE SOUMIS.....138
3- Etude d'un modèle de cancer prostatique humain chez la souris nude.....169
ARTICLE EN COURS DE REDACTION.....179
Introduction.....179
Materials and methods.....181
Results.....189
Figures.....197
Discussion.....208
References.....218
IV-DISCUSSION & PERSPECTIVES.....227
V-REFERENCES.....233

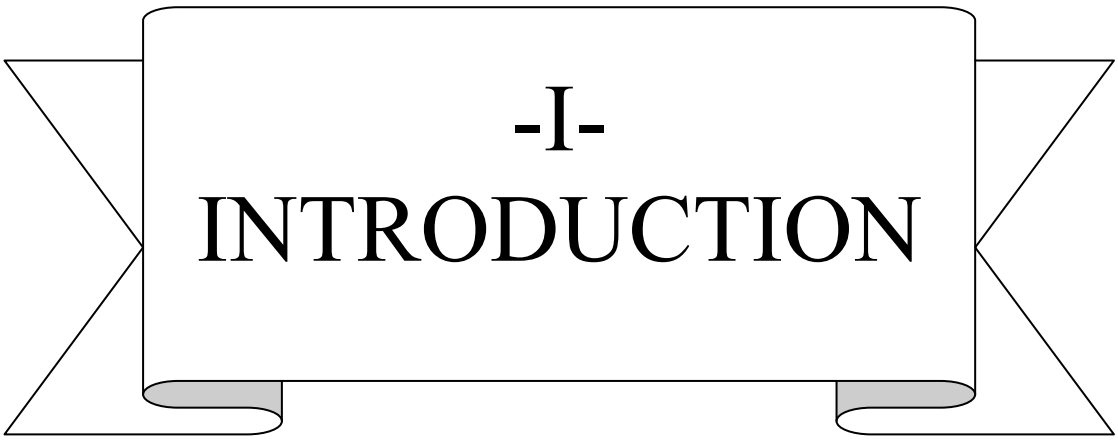
ABREVIATIONS

~

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Activation Factor
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ARE	Elément de Réponse aux Androgènes
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATP	Adenosine triphosphate
BAC	Blocage Androgénique Complet
BH	Bcl-Homology
BSA	Bovine Serum Albumine
CARD	Caspase Recruitment Domain
CREB	cAMP response element-binding
CRD	Cystein-Rich Domain
Cyp11a1	Cytochrome P450scc
Cyp17a1	Cytochrome P450c17
DcR	Decoy Receptor
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DHEA	Déhydroépiandostérone
DHT	Dihydrotestostérone
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DR	Death Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FADD	Fas Associated protein with Death Domain
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLIP	Flice-Like Inhibitory Protein
FSH	Hormone FolliculoStimulante
GFP	Green Fluorescent Protein
GnRH	Gonadotropine Releasing Hormone

GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HRE	Elément de Réponse aux Hormones
Hsd3b1	3β-hydroxystéroïde déshydrogénase
Hsd17b3	17β-hydroxystéroïde déshydrogénase
HSP	Heat Shock Protein
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IFN	Interféron
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukine
kDa	kilo Dalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KLK	Kallikreine
KO	Knock-Out
LH	Hormone Lutéinisante
LNCaP	Lymph Node Cancer Prostate
LH-RH	Luteinising Hormone Releasing Hormone
OPG	Ostéoprotégérine
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
NK	Natural Killer
P450arom	P450 aromatase
PIN	Prostatic Intraepithelial Neoplasia
PK	Protein Kinase
PLAD	Pre-Ligand Assembly Domain
PMEM	Perméabilité de la membrane externe mitochondriale
PSA	Prostate Specific Antigen
PSCA	Prostate Stem Cell Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RA	Récepteurs aux Androgènes
RE	Récepteurs aux oestrogènes
RG	Récepteurs aux Glucocorticoïdes
RM	Récepteurs aux Minéralocorticoïdes
RP	Récepteurs à la Progestérone

SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SHBG	Sex Hormone Binding Globulin
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TGF	Transforming Growth Factor
TNF-α	Tumor necrosis factor- α
TNF-R	Tumor necrosis factor Receptor
TRADD	TNF-R1-Associated Death Domain
TRAIL	Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand
TRAMP	Transgenic Mouse Model of Prostate cancer


-I-
INTRODUCTION

-I-INTRODUCTION

~

Le cancer de la prostate est le cancer masculin le plus fréquent devant le cancer du poumon ou les cancers colorectaux, et la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme (Sarma and Schottenfeld, 2002). Comme pour la prostate normale, la prolifération des cellules prostatique cancéreuses dépend des androgènes dans un premier temps (Marker et al., 2003; Taplin and Ho, 2001). Cette caractéristique est utilisée pour traiter le cancer prostatique métastatique quand il n'a pas pu être traité au stade localisé et consiste en la suppression de l'action des androgènes sur les tumeurs (Huggins and Hodges, 2002; Labrie et al., 1982). La privation androgénique, appelée hormonothérapie, induit une apoptose des cellules prostatiques cancéreuses hormonosensibles et résulte en une régression de la tumeur et une amélioration du pronostic (Isaacs et al., 1992). Malheureusement, l'évolution du cancer vers un stade hormono-indépendant par des mécanismes d'échappement hormonal est inéluctable et incurable à l'heure actuelle (Schroder, 1998; Seidenfeld et al., 2000). Les traitements palliatifs alors proposés consistent en une hormonothérapie de seconde ligne ou une chimiothérapie. Cette impasse thérapeutique souligne l'importance d'améliorer la compréhension des mécanismes apoptotiques induit par la privation androgénique quand le cancer de la prostate est encore hormonosensible afin de pouvoir le traiter avant la phase d'échappement hormonal.

Une des stratégies envisagées est l'utilisation de ligands inducteurs d'apoptose appartenant à la famille du TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α). Contrairement à Fas-ligand et au TNF-α, le ligand TRAIL ne présente pas de toxicité systémique chez le rongeur et le primate non humain. De plus, il possède la caractéristique d'induire l'apoptose de certaines cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines (Ashkenazi et al., 1999; Takeda et al., 2002). Le ligand TRAIL apparaît donc comme un candidat prometteur pour la thérapie anticancéreuse. A ce jour, chez l'homme, cinq récepteurs capables de lier TRAIL ont été identifiés. Deux d'entre eux, DR4 et DR5 sont capables d'induire l'apoptose tandis que les trois autres, DcR1, DcR2 et l'OPG, agissent comme récepteurs antagonistes. L'interaction de TRAIL avec ses cinq récepteurs différents (2 récepteurs de mort et 3 récepteurs leurres) est un modèle unique au sein de la superfamille du TNF-α et pose des questions sur la raison d'être et le mode fonctionnement de cet ensemble.

Les études antérieures effectuées au laboratoire sur un organe androgéno-dépendant le testicule de rat, ont mis en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs au

TRAIL corrélée avec le pic de testostérone au moment de la puberté, suggérant une hormono-régulation du système TRAIL (Grataroli et al., 2002).

Nous nous sommes alors interrogés sur la relation entre androgènes et apoptose induite par TRAIL et ses récepteurs au sein de la prostate. Les travaux de recherche effectués au cours de ma thèse s'inscrivent dans ce cadre-là.

Pour une compréhension du contexte de notre travail expérimental, nous décrirons dans la partie revue bibliographique, l'organe sur lequel a porté notre étude, la prostate. Nous nous intéresserons ensuite au cancer de la prostate et aux modèles animaux existants. Enfin, nous décrirons les molécules impliquées dans la mort cellulaire programmée en particulier le ligand TRAIL et ses récepteurs.

Nous présenterons ensuite notre étude dont le but a été d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par les androgènes dans la prostate normale et pathologique.

Brièvement, dans notre premier et second travail, nous avons étudié la régulation par les androgènes de l'expression de TRAIL et ses récepteurs dans la prostate ventrale de rat et dans la lignée LNCaP de cancer prostatique humain androgénosensible. Nous avons également modulé l'expression de certains de ces récepteurs pour étudier leur implication dans l'apoptose des cellules LNCaP induite par TRAIL.

Dans notre troisième travail, nous avons utilisé un modèle animal de cancer prostatique humain hormonosensible dans le but d'étudier la régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par la privation androgénique *in vivo*. De façon surprenante, nos résultats ont montré une stimulation de la croissance tumorale par un traitement des souris à l'anti-androgène bicalutamide, alors que la castration inhibe leur croissance. Parallèlement aux analyses de l'expression des récepteurs au TRAIL dans ces conditions d'expérimentations, nous avons caractérisé les expressions de plusieurs gènes pour comprendre la relation entre croissance tumorale et contexte hormonal.

-II-
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

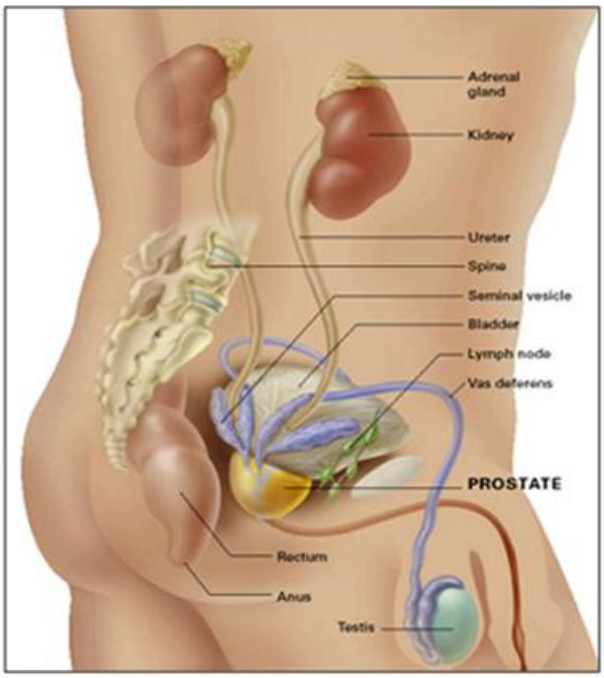


Figure 1 - Appareil urogénital de l'homme adulte.
La prostate est située sous la cavité pelvienne, juste sous la vessie, en arrière de la symphyse pubienne et en avant du rectum. Elle est traversée par l'urètre mais aussi par les canaux éjaculateurs. La prostate se situe donc au carrefour des voies génitales mâles et du système urinaire.
http://www.memorialcare.org/long_beach/services/todd_cancer/images/tci_prostate_caner.jpg

CHAPITRE I - LA PROSTATE

I. La prostate normale

1. Données anatomiques et histologiques

1.1. Anatomie

Chez l'homme adulte, la prostate est une glande compacte de la forme d'une châtaigne d'environ 4 x 2,5 cm, pour un poids moyen de 20 g. Elle est située dans le pelvis, en avant du rectum et elle entoure l'urètre juste en-dessous de la vessie (Figure 1). Elle est traversée d'avant en arrière par les canaux éjaculateurs issus de la convergence des vésicules séminales et des canaux déférents au niveau de la base prostatique.

La prostate est constituée de fibres musculaires lisses et de tissu glandulaire tubulo-alvéolaire donnant naissance à une trentaine de canicules qui débouchent dans la lumière de l'urètre. Bien que la prostate ne possède pas de lobe anatomiquement distinct, l'organisation anatomique et histologique actuellement acceptée est celle décrite par McNeal (McNeal, 1988). Selon la proportion en tissu glandulaire, trois zones ont été décrites : la zone centrale, la zone de transition, et la zone périphérique (Figure 2). La 4^{e} zone est non glandulaire et correspond au stroma fibro-musculaire antérieur. La prostate ne comporte pas véritablement de capsule mais est limitée par un ensemble de couches compressées de tissu conjonctif fibro-musculaire. La pertinence des zones décrites par McNeal est soulignée par les spécificités topographiques observées en pathologie prostatique (McNeal et al., 1988). La zone périphérique est le siège d'origine de la plupart des carcinomes de la prostate, et l'hyperplasie bénigne de la prostate se développe préférentiellement dans la zone de transition.

1.2. Histologie prostatique

Au niveau histologique, la prostate est constituée de glandes tubulo-alvéolaires ou acini entourés de stroma musculaire lisse (Figure 3) (Marker et al., 2003). Deux types cellulaires sont majoritairement présents dans les acini. Les cellules épithéliales sécrétoires organisées en monocouche continue sont responsables de l'activité exocrine de la prostate. Les cellules épithéliales basales à l'origine du renouvellement de l'épithélium sécrétoire, forment une

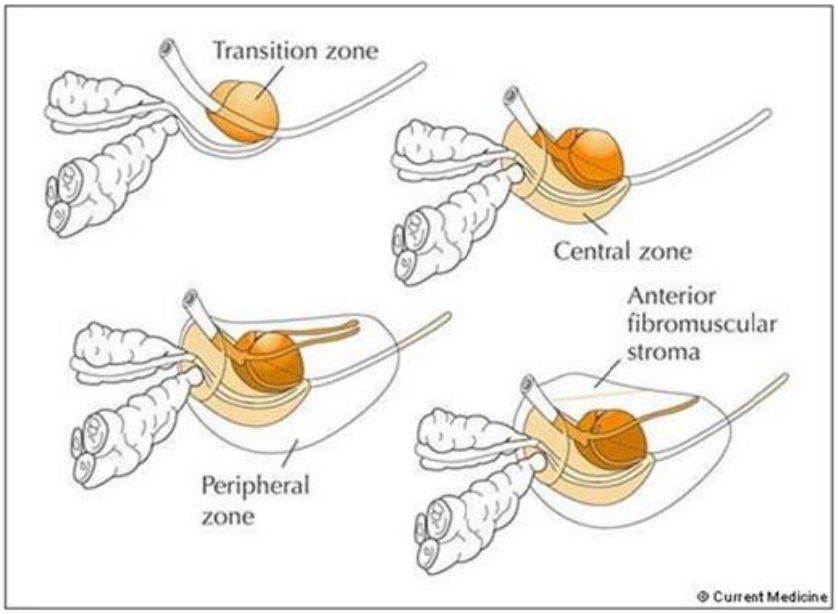


Figure 2 – Organisation zonale de la prostate selon McNeal.
La prostate est subdivisée en quatre régions tissulaires distinctes agencées autour de l'urètre. La zone de transition consistent en deux petits lobes latéraux entourant l'urètre prostatique proximale sans fusionner à sa face antérieure. La zone centrale entoure les canaux éjaculateurs des vésicules séminales. La zone périphérique entoure la zone centrale en arrière, latéralement et s'étend vers le bas où elle englobe quasiment l'urètre distal. Le stroma fibro-musculaire antérieur constitue le 1/3 antérieur de la prostate.
http://www.prostatelineimageatlas.com/images/01/0109/large/ACU0203-09-002.jpg

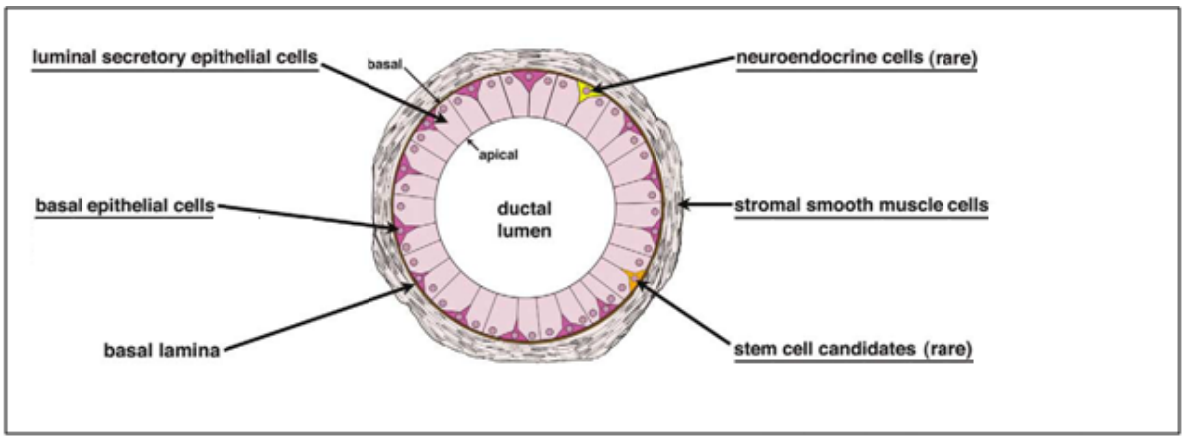


Figure 3 – Histologie générale d'une glande prostatique (d'après Marker *et al.* 2003).
Tous les types cellulaires composant un acinus prostatique sont schématisés ici. Le stroma conjonctif est constitué de fibroblastes, d'une matrice extracellulaire riche en fibres de collagènes et fibres élastiques, de cellules musculaires lisses, de nerfs et de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

couche continue entre les cellules sécrétrices et le lame basale. Deux autres types cellulaires plus rares existent dispersés dans l'épithélium glandulaire : les cellules neuroendocrines et des cellules épithéliales basales particulières qui expriment des marqueurs uniques et qui pourraient être des cellules souches épithéliales. Cet ensemble cellulaire est entouré d'une lame basale qui marque la délimitation avec le stroma conjonctif constitué de fibroblastes, de fibres de collagène et élastiques, de cellules musculaires lisses, de nerfs et de vaisseaux sanguins et lymphatiques.

2. Physiologie de la prostate

Bien qu'intimement liée aux structures urinaires, la prostate n'intervient pas dans le processus de la miction. Cependant, les sécrétions prostatiques participent à la formation du sperme et constituent 30% du volume du plasma séminal. Celui-ci est essentiellement composé de liquide sécrété par les vésicules séminales et la prostate. La première fraction d'éjection du sperme contient l'essentiel des spermatozoïdes en provenance des testicules et précède l'émission des liquides prostatique et séminal.

Les sécrétions prostatiques contiennent des protéines et des électrolytes. Les principales protéines prostatiques sont la phosphatase acide prostatique, la protéine de sécrétion prostatique et l'antigène spécifique prostatique (PSA) qui liquéfie le sperme en hydrolysant les protéines sécrétées par les vésicules séminales et libère les spermatozoïdes du coagulum du sperme. Parmi les électrolytes sécrétés, le zinc joue un rôle important, antibactérien et de liquéfaction du sperme. Le liquide prostatique n'est pas indispensable à la fécondité, mais il la favorise en facilitant la pénétration des spermatozoïdes à travers le col utérin.

3. Interactions épithélium-mésenchyme

Les interactions entre les cellules stromales et épithéliales sont essentielles à la différenciation et la croissance prostatique (Algarte-Genin et al., 2004; Long et al., 2005). Dans la prostate normale, la croissance des cellules épithéliales est régulée par les facteurs de croissance sécrétés par les cellules stromales. C'est en partie la dihydrotestostérone (DHT) qui se fixe sur le récepteur aux androgènes (RA) des cellules stromales et médie la sécrétion des facteurs de croissance (Long et al., 2005). Cinq familles de facteurs de croissance synthétisés par les cellules stromales sont impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules

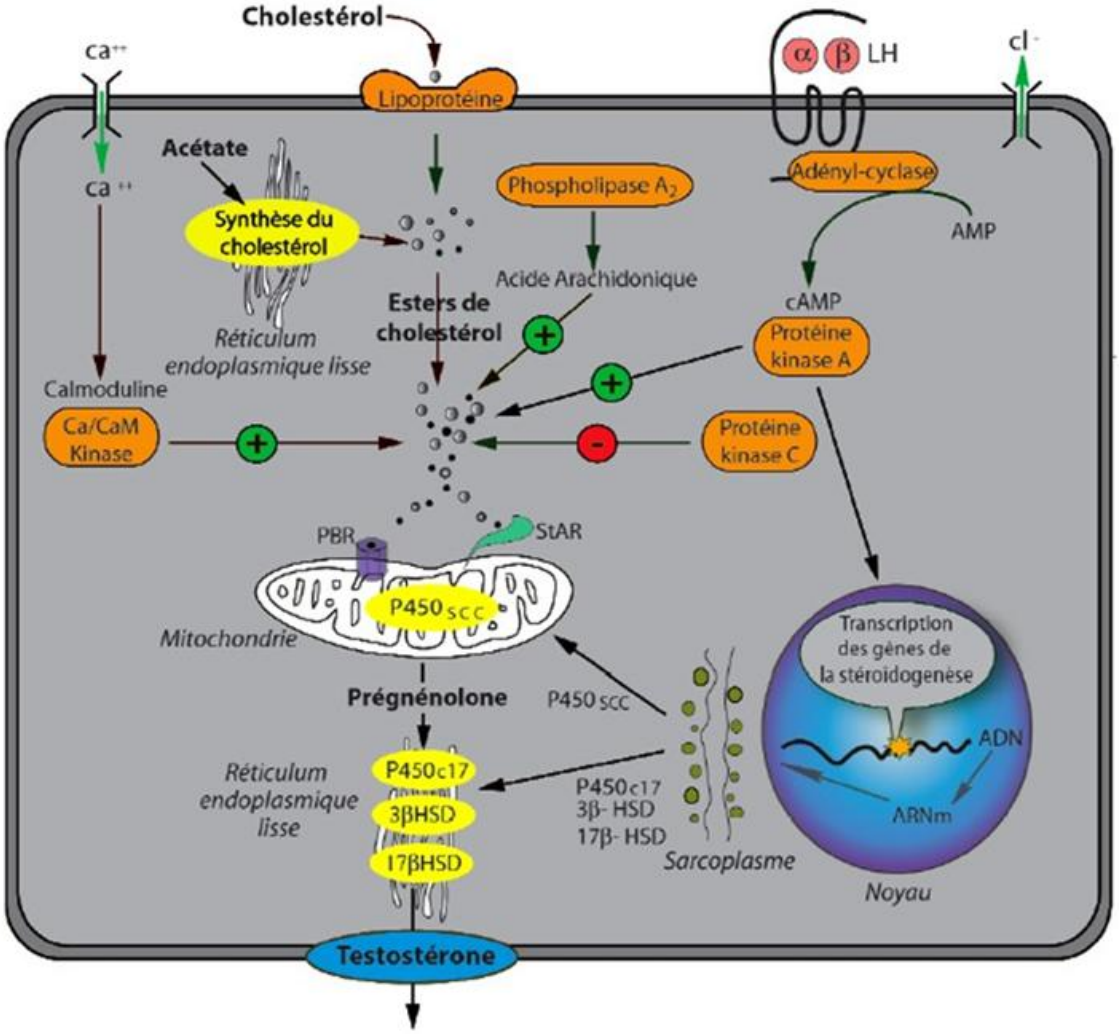


Figure 4 – Régulation de la stéroïdogenèse dans la cellule de Leydig (d'après Tostain *et al.* 2004).

épithéliales. Parmi les facteurs de croissance stimulant la prolifération des cellules épithéliales prostatiques, il y a les FGF (Fibroblast Growth Factor) 7 et 10, l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF-α (Transforming Growth Factor) et les IGF I et II (Insulin-like Growth Factor) dont le pouvoir mitogène est le plus fort. A l'inverse, le TGF-β_1 et HGF (Hormone Growth Factor) inhibent la croissance des cellules épithéliales.

4. Contrôle neuroendocrinien de la prostate

Le développement, la maintenance et la fonction de la prostate requièrent l'activité du RA et des androgènes (Marker et al., 2003).

4.1. La testostérone

4.1.1. Biosynthèse de la testostérone

La testostérone est le principal androgène circulant (Tostain et al., 2004). Elle est produite à 95% par les cellules de Leydig du testicule, le reste étant produit par les glandes surrénales en faibles quantités et par le cerveau en quantités infinitésimales. La biosynthèse de la testostérone nécessite l'intervention d'un certain nombre d'enzymes agissant en cascade à partir d'un précurseur commun à tous les stéroïdes, le cholestérol (Saez, 1994). La stéroïdogenèse commence par le transport du cholestérol du cytoplasme dans la mitochondrie par une protéine de transfert, **StAR** (steroidogenic acute regulatory protein) qui est l'étape limitante de la stéroïdogenèse (Stocco, 2002). Dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique lisse, le cholestérol est transformé en une série de métabolites par différentes enzymes du groupe des cytochromes P450 avant d'aboutir à la testostérone (Figure 4 et 6). La première étape de la biosynthèse des androgènes est une étape clef, permettant la conversion du cholestérol en prégnénolone. Cette étape est assurée par le **cytochrome P450scc** (ou Cyp11a1), situé dans la membrane interne de la mitochondrie, La prégnénolone est ensuite transportée dans le réticulum endoplasmique lisse où elle est convertie en progestérone par la **3β-hydroxystéroïde déshydrogénase** (3 β-HSD, ou Hsd3b1). Le **cytochrome P450c17** (ou Cyp17a1) va ensuite transformer successivement la progestérone en 17 β-OH-progestérone (activité-25-17 β-hydroxylase) puis en androstènedione (activité C17-20-lyase). Enfin l'androstènedione est convertie en testostérone par la **17 β-hydroxystéroïde déshydrogénase** (17 β-HSD, ou Hsd17b3. Il existe deux voies d'obtention de la testostérone, la voie Δ5 et la voie Δ4. Le passage des stéroïdes de la voie Δ5 à la voie Δ4 est catalysé par la 3 β-HSD.

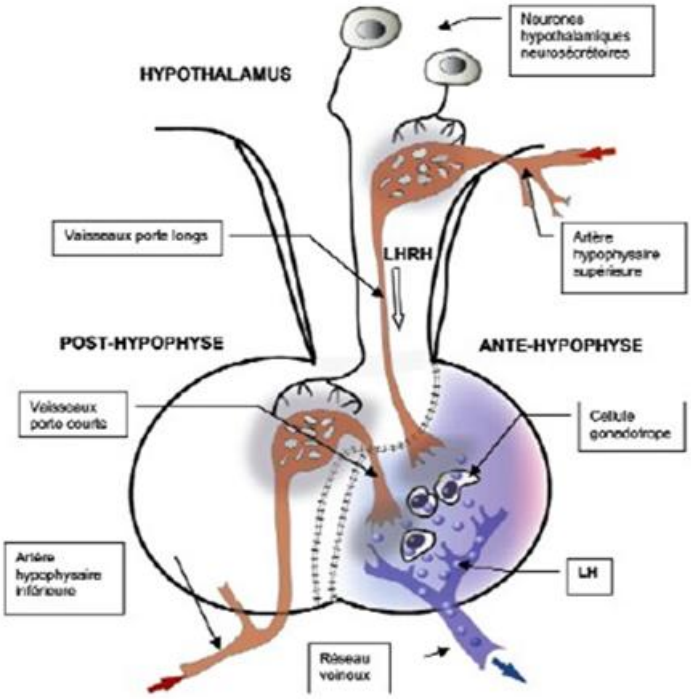


Figure 5 – Axe neuro-endocrine hypothalamo-hypophysaire boucle de contrôle avec les testicules (d'après Tostain *et al.* 2004).

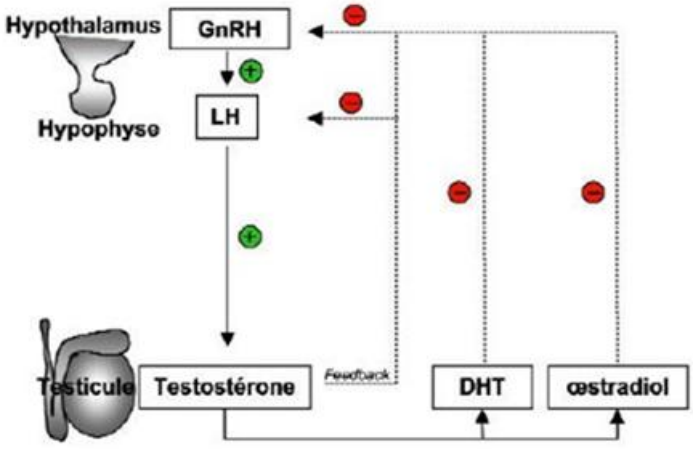


Figure 6 – Boucles de contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire (d'après Tostain *et al.* 2004).

4.1.2. La régulation des androgènes

La synthèse de testostérone est principalement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 5) (Tostain et al., 2004). Les cellules hypothalamiques neurosécrétoires libèrent la LH-RH sur un mode pulsatile, qui parvient aux cellules gonadotropes de l'hypophyse. Ces dernières sécrètent des gonadotrophines, la LH et la FSH, dans le système veineux sur un mode pulsatile également. Il existe un rythme circadien marqué par une augmentation des pulses de LH pendant le sommeil se traduisant par une augmentation de la testostérone aux premières heures du matin.

La LH est capable de contrôler la production et la sécrétion de testostérone via son récepteur situé à la surface des cellules de Leydig. Elle induit la transcription des gènes codant pour de nombreuses enzymes impliquées dans la biosynthèse de testostérone. La liaison de la LH à son récepteur, stimule l'adénylate cyclase permettant la formation d'AMPc. La FSH favorise la spermatogenèse via les cellules de Sertoli. Néanmoins, des mutations au niveau du gène codant pour la FSH sont également responsables de troubles de la stéroïdogenèse (Themmen and Huhtaniemi, 2000). Etant donné que les cellules de Leydig ne possèdent pas de récepteur à la FSH, cette dernière agirait sur la régulation de la stéroïdogenèse de façon indirecte. Des études montrent que la FSH stimule les cellules de Sertoli à sécréter divers facteurs capables d'agir en synergie avec la LH sur l'activation des enzymes et protéines impliquées dans la stéroïdogenèse.

Les androgènes exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotrophines au niveau hypothalamique et hypophysaire. Par exemple, la castration chirurgicale supprimant la production de testostérone fait disparaître le rétrocontrôle négatif et entraîne une augmentation de FSH et de LH. Par contre, l'administration d'un analogue de la LH-RH (utilisé pour traiter certains cancers de la prostate) provoque une stimulation continue de ses récepteurs sur l'hypophyse. Après un pic d'activité initiale, cette stimulation permanente désensibilise et inhibe l'expression des récepteurs à LH-RH, résultant en une suppression de LH et testostérone.

4.1.3. Sécrétion et transport des androgènes

La testostérone diffuse librement à travers les membranes plasmiques des cellules de Leydig et dans le sang veineux. Dans le plasma, la testostérone circule sous trois formes : 2% sous forme libre, seule forme utilisable directement par les tissus, 45-75% sont liés à la protéine de transport des stéroïdes sexuels, SHBG (sex hormone binding protein), et 30 à 55% sous forme

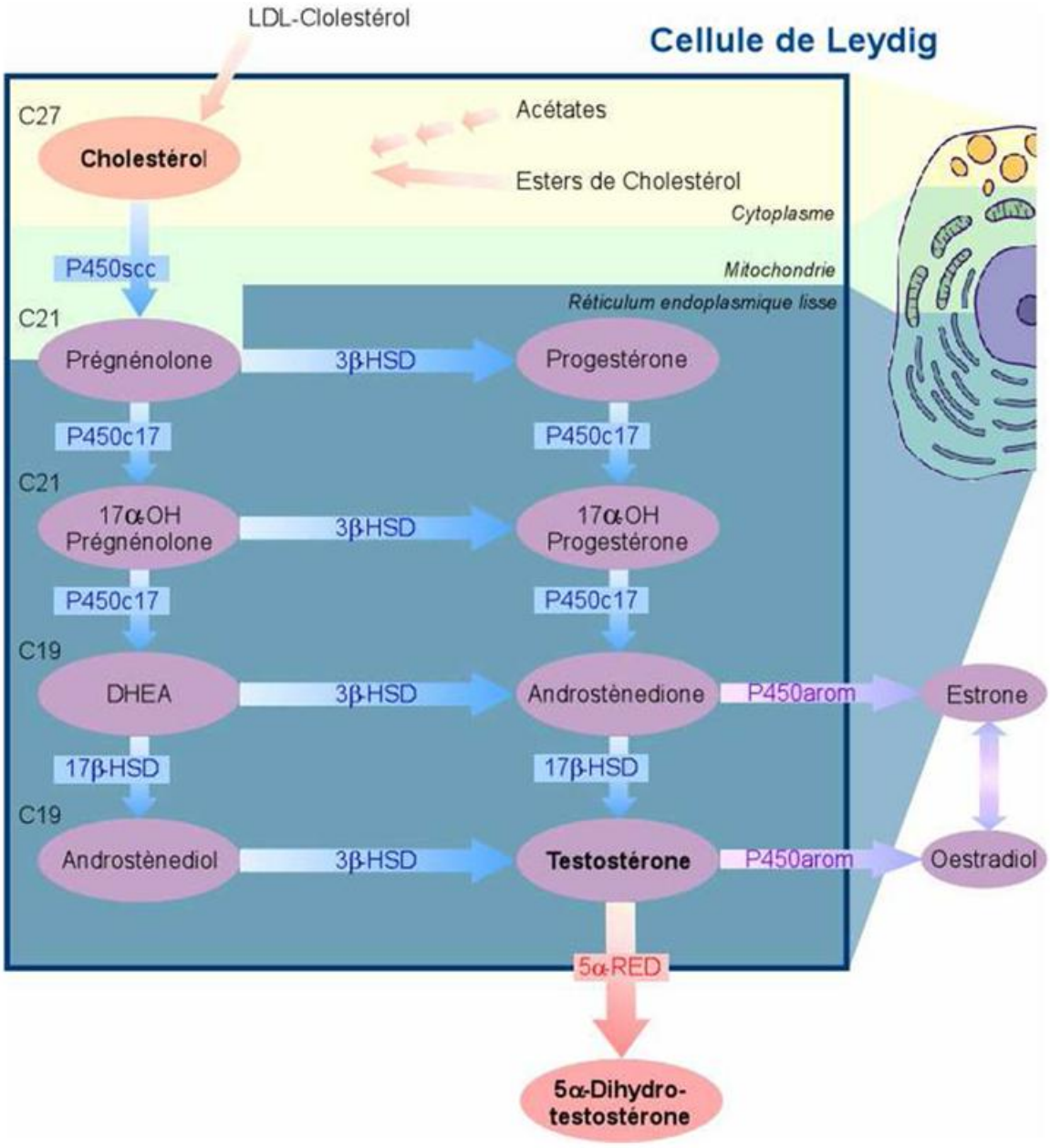


Figure 6 : Biosynthèse de la testostérone au niveau des cellules de Leydig
P450scc : Cytochrome P450scc (Cyp11a1) ; 3β-HSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (Hsd3b1) ; P450c17 : Cytochrome P450c17 (Cyp17a1) activités 17α-hydroxylase & C17-20-lyase ; 17β-HSD : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (Hsd17b3) ; P450arom : P450 aromatase (Cyp19) ; 5α-RED : 5α-réductase.

liée à l'albumine (Tostain et al., 2004). La testostérone liée à SHBG, contrairement à la fraction liée à l'albumine, se dissocie difficilement et n'est pas disponible pour l'utilisation tissulaire. La testostérone bio-disponible représente la somme de la testostérone libre et de la testostérone liée à l'albumine, soit 40 à 50% de la testostérone totale. Les protéines de liaison servent de réserve de stéroïdes qui, autrement, seraient rapidement métabolisée par le foie.

4.1.4. Le métabolisme de la testostérone

La testostérone peut agir directement sur le RA ou indirectement via son rôle de pro-hormone, par sa transformation en métabolites actifs qui augmentent et diversifient ses effets biologiques (Figure 7) (Tostain et al., 2004). Tout d'abord elle peut-être transformée en DHT sous l'action de la 5 α-réductase de type 1 et 2. La DHT a cinq fois plus d'affinité pour le RA que la testostérone, donc son action est potentialisée. D'autre part, la testostérone peut-être métabolisée par l'aromatase en un œstrogène puissant, l'œstradiol, principalement dans la graisse, et en quantité plus faible dans le testicule (15%), la peau, les reins, les os et le cerveau. Enfin, les voies de dégradation de la testostérone existent principalement dans le foie, mais aussi dans la peau et la prostate pour aboutir à une élimination dans l'urine ou par la peau. L'ensemble métabolique qui participe à la dégradation de la testostérone est très actif puisque la demi-vie de la testostérone est de 12 minutes, ce qui implique une fabrication permanente par le testicule.

4.2. Rôle de la DHT dans la prostate

La testostérone est convertie en DHT par l'action de la 5α-réductase de type 2 qui prédomine dans la prostate. L'importance de la DHT dans le développement de la prostate a été mise en évidence par un modèle humain naturel ayant une déficience en 5α-réductase (Zhu et al., 2005). Cette déficience est caractérisée par une diminution de la conversion de testostérone en DHT. Les adultes ont une prostate rudimentaire et un taux de PSA plasmatique bas ou non détectable. L'analyse histologique montre la présence de tissu conjonctif et de muscle lisse mais pas de tissu épithélial. L'administration de DHT à ces patients résulte en un élargissement de la prostate et une élévation du PSA. La différenciation et la croissance de la prostate sont largement médiée par la DHT, plutôt que la testostérone.

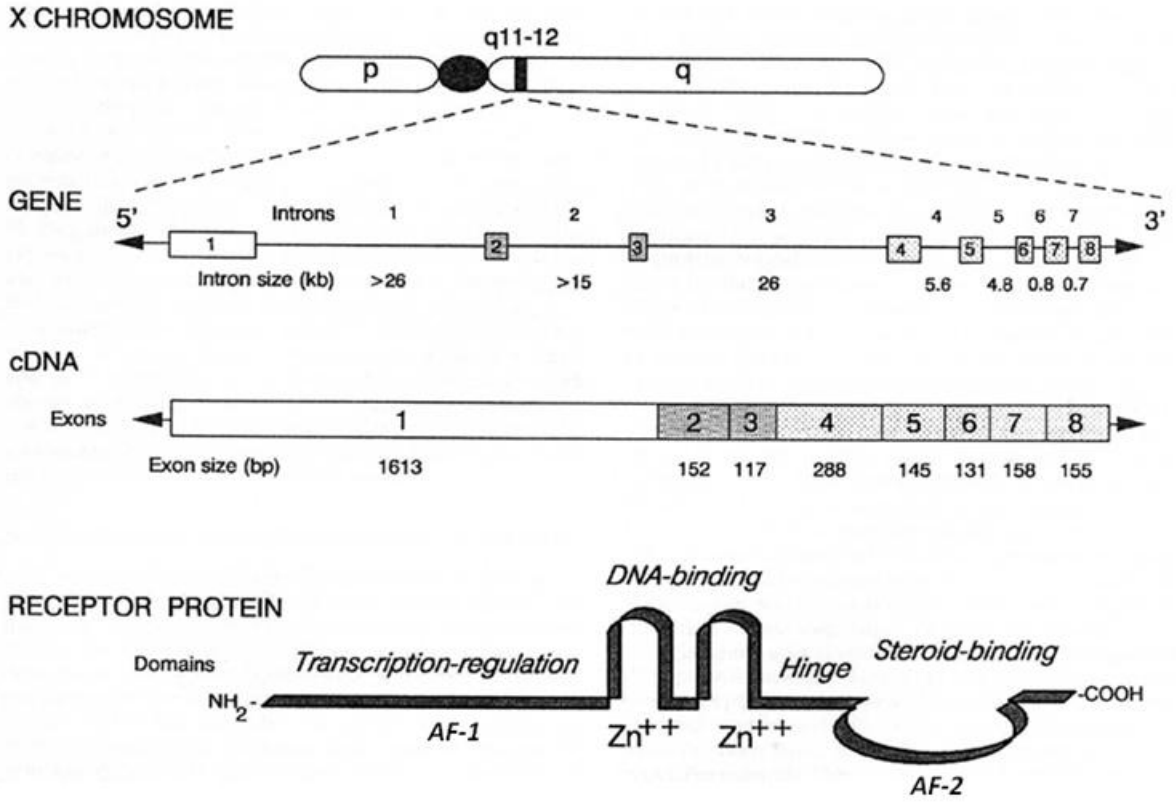


Figure 8 – Locus du gène du récepteur aux androgènes sur le chromosome X et représentation schématique de l'organisation structurelle du gène et de la protéine (d'après Quigley *et al.* 1995).

Le gène du RA est localisé sur la zone péri-centromérique du bras long du chromosome X au locus Xq11-12. Le gène recouvre de 75 à 90 kb d'ADN génomique, les huit exons étant séparés par des introns de taille allant de 0,7 à plus de 26 kb. L'ADNc comprend une région codante de 2760 pb. L'exon 1 code pour le domaine N-terminal de régulation de la transcription comprenant le domaine de transactivation AF-1 (activation function-1). Les exons 2 et 3 codent pour le domaine de liaison à l'ADN, contenant 2 structures en doigt de zinc. La région 5' de l'exon 4 code pour la région charnière (signal de localisation nucléaire). La région 3' de l'exon 4 et les exons 5 à 8 codent pour le domaine de liaison du ligand comprenant le domaine de transactivation AF-2.

4.3. Le récepteur aux androgènes

L'importance de l'action du RA dans la physiologie humaine est illustrée par l'étude du syndrome de l'insensibilité des androgènes. Cette maladie peut-être due à des mutations invalidant la fonction du RA à différents degrés. Une des conséquences de la perte de fonction du RA est l'absence complète de prostate chez l'adulte.

D'autre part, la privation androgénique chez l'adulte inhibe l'action du RA et entraîne une régression de la prostate (Nantermet et al., 2004).

4.3.1. Structure du gène et de la protéine du RA

Le récepteur aux androgènes (RA) est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs aux hormones stéroïdes comme les récepteurs à la progestérone (RP), aux glucocorticoïdes (RG) et aux minéralocorticoïdes (RM). Cette famille de récepteurs fait elle-même partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (Gelmann, 2002; Lee and Chang, 2003; Quigley et al., 1995; Tostain et al., 2004).

Le gène du RA est localisé sur le chromosome X en position q11-12 (Figure 8). Il est constitué de 8 exons qui codent pour une protéine de 110-114 KDa composée de 910-919 acides aminés. L'organisation structurale et fonctionnelle des exons du gène du RA montre une grande homologie avec les récepteurs aux hormones stéroïdes et comprend quatre domaines : le domaine NH2-terminal, le domaine de liaison à l'ADN, la région charnière et le domaine de liaison du ligand.

Le **domaine NH2-terminal** intervient dans la régulation de la transcription des gènes cibles notamment grâce à un domaine de transactivation nommé AF-1 (activation function-1) qui interagit avec les co-régulateurs. Il interagit aussi avec le domaine de liaison du ligand en C-terminal et stabilise le récepteur. La seconde particularité de ce domaine est de contenir une zone de polymorphisme constituée de séquences répétées de glutamine, proline et glycine. La longueur de ces répétitions serait impliquée dans certaines pathologies et interviendrait dans le niveau de transactivation du RA.

Le **domaine de liaison à l'ADN** est très conservé dans la famille des récepteurs aux hormones stéroïdes. Il est riche en cystéines qui par quatre se lient à un ion zinc et forment ainsi deux structures en "doigts de zinc". Les trois acides aminés à la base du premier doigt de zinc sont identiques aux RP, RG et RM et sont impliqués dans la spécificité de liaison à une séquence d'ADN appelée éléments de réponse aux androgènes (ARE). Le second doigt de zinc stabilise l'interaction du récepteur à l'ADN.

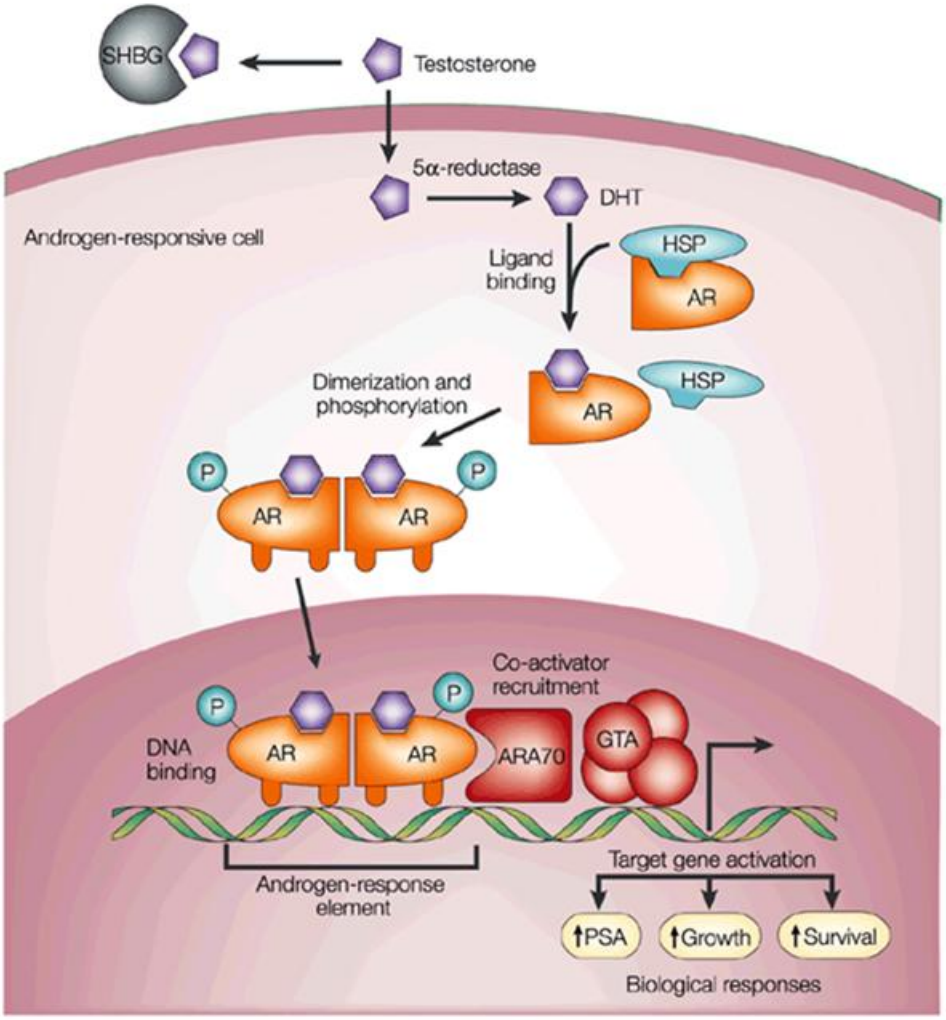


Figure 9 – Voie d'activation du récepteur aux androgènes par la voie classique, dite génomique (d'après Feldman & Feldman 2001).

La **région charnière** contient le signal de localisation nucléaire et un motif de dégradation par le système d'ubiquitination par le protéasome.

Le **domaine de liaison du ligand** a pour fonction principale de se lier avec une forte affinité et une forte spécificité aux androgènes. La liaison avec un androgène découvre un deuxième domaine de transactivation du RA nommé AF-2, où le domaine NH2-terminal et les coactivateurs peuvent se lier. Ce domaine interagit aussi avec les protéines chaperonnes de choc thermique Hsp90 et Hsp70 qui maintiennent le RA dépourvu d'hormones dans une conformation inactive, favorable à la liaison avec le ligand mais en empêchant sa liaison avec l'ADN.

4.3.2. Mode d'action du RA dans la prostate

Bien que la testostérone soit l'androgène majeur sécrété à partir des testicules, la DHT est le principal androgène dans la prostate qui médie l'action des androgènes via le RA. Outre la voie génomique la plus connue, le RA interagit avec différentes voies de signalisation intracellulaires complexes et interconnectées.

La voie classique, dite génomique

Le RA non actif est situé dans cytoplasme des cellules, maintenu par les protéines de choc thermique (Hsp) dans une conformation propice à l'interaction avec le ligand (Feldman and Feldman, 2001). La testostérone peut se lier au RA mais dans la cellule épithéliale prostatique elle est transformée par le 5α-réductase de type 2 en métabolite plus actif, la DHT. Schématiquement, l'interaction de la DHT avec le RA induit un changement conformationnel du RA, la dissociation des protéines Hsp, la dimérisation des RA et leur transport dans le noyau (Figure 9). Les dimères se fixent sur l'ADN sur les ARE et induisent le recrutement de coactivateurs, de facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II. Ce complexe protéique active la transcription de gènes spécifiques androgéno-régulés.

Le RA régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans différentes mécanismes cellulaires (Nantermet et al., 2004; Pang et al., 2002). Tout d'abord, il régule la transcription des gènes impliqués dans la synthèse, la maturation, le transport et la dégradation des protéines sécrétées dans le liquide séminale. Ensuite, le RA régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la glycolyse et du cholestérol. De plus, il module aussi l'expression de gènes impliqués dans la signalisation intracellulaire dont :

-le cycle cellulaire par induction des cyclines D1 et D3, et inhibition d'inhibiteurs du cycle comme la protéine Rb ;

-l'apoptose : caspase-2, FLIP ;
-les facteurs de croissance (IGF et EGF), et leur voie de signalisation, les MAP Kinases ;
-les facteurs de transcription.

La voie non génomique

La voie non génomique se différencie de la voie génomique par deux caractéristiques : sa rapidité d'action et l'absence d'interaction RA-ADN. En effet, l'activation de la voie non génomique est mesurable en quelques minutes alors que l'initiation de la transcription de gènes par la voie classique prend 30 à 45 min et la synthèse des protéines correspondantes, plusieurs heures (Walker and Cheng, 2005). La rapidité d'action de la voie non génomique fait souvent intervenir des modifications de type phosphorylation/déphosphorylation. Les inhibiteurs de la transcription et de la synthèse protéique sont sans effet sur la voie non génomique qui est indépendante de l'interaction du RA avec l'ADN.

Le RA lié à la testostérone active la voie de signalisation des MAPK (mitogen activated protein Kinase), impliquée dans de nombreux processus cellulaires (Heinlein and Chang, 2002; Kim et al., 2007). Cette voie consiste en une activation de protéines en cascade par phosphorylation, qui vont réguler différentes cibles intracellulaires par ce même mécanisme. Dans les cellules de Sertoli par exemple, la testostérone liée au RA stimule la voie des MAPK en une minute, qui aboutit à la phosphorylation de CREB (cAMP response element binding protein) au rôle essentiel dans la spermatogenèse (Fix et al., 2004; Rahman and Christian, 2007). Les MAPK pourraient aussi moduler la phosphorylation des cofacteurs du RA et réguler ainsi son activité transcriptionnelle (Heinlein and Chang, 2002). La voie des MAPK peut être activée de plusieurs façons : par la liaison directe du RA avec une protéine tyrosine kinase, Src, et par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (Fix et al., 2004; Heinlein and Chang, 2002; Rahman and Christian, 2007) (Heinlein and Chang, 2002; Kim et al., 2007; Kousteni et al., 2001).

La signalisation non génomique induite par le RA pourrait être initiée au niveau de domaines membranaires particuliers appelés raft qui ont pour rôles de favoriser les interactions entre molécules et donc les signaux de transductions intracellulaires (Freeman et al., 2005). En effet, il a été montré que le RA interagit directement avec une protéine membranaire, la caveoline-1. C'est un composant majeur de domaines raft organisés en cavéoles, (invagination de la membrane plasmique) qui module le niveau d'activation du RA (Lu et al., 2001).

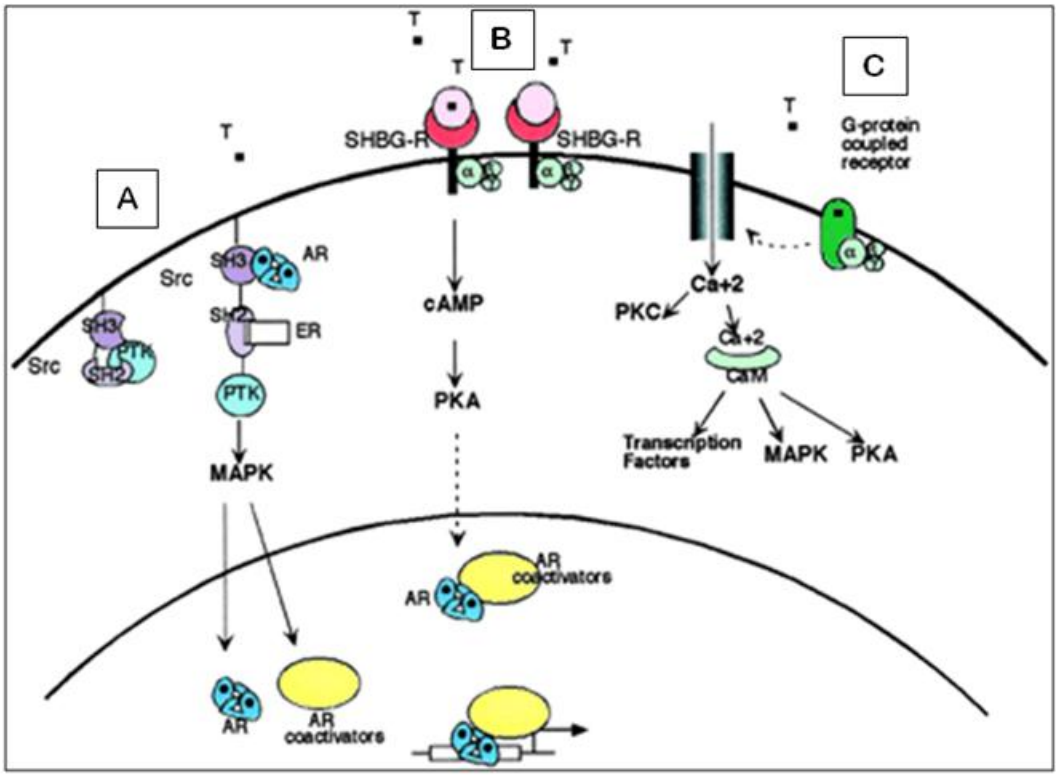


Figure 10 – Représentation schématiques de différentes voies d'activation du récepteur aux androgènes par la voie non génomique (d'après Heinlein & Chang 2002).

Les androgènes (T) peuvent stimuler des seconds messagers intracellulaires de la voie non génomique de différentes façons, par différents récepteurs. A : Les androgènes peuvent stimuler la voie des MAP Kinases par la stimulation du récepteur c-Src (Src). B : Les androgènes peuvent se lier au récepteur SHBG représenté ici couplé à une protéine G qui stimule l'AMPc et la protéine kinase A (PKA). C : L'hypothétique récepteur aux androgènes membranaire est représenté ici couplé à une protéine G. Un des effets médié par ce récepteur serait une augmentation des ions calcium intracellulaires qui activeraient la transduction du signal par des cascades impliquant la PKA, la protéine kinase C (PKC) et les MAPK.

D'autre part, l'existence d'un RA membranaire qui pourrait médier la voie non génomique des androgènes est très étudiée. Cette hypothèse a été mentionnée entre autres suite à l'effet de la testostérone sur l'augmentation d'ions calcium intracellulaires très rapide observé dans plusieurs types cellulaires : les macrophages, les cellules-T, les cellules de Sertoli et les LNCaP (Heinlein and Chang, 2002; Rahman and Christian, 2007). Cette action a été mise en évidence par l'utilisation de testostérone couplée à la BSA dont la localisation est membranaire. Parmi les types cellulaires précédemment cités à part les macrophages, tous expriment le RA laissant le doute possible. Ce RA membranaire semble donc très probable mais cette hypothèse reste à vérifier car il n'a pas encore été cloné ni purifié.

D'autres voies de signalisation interagissant avec le RA ont été beaucoup étudiées dans le processus de progression du cancer de la prostate dans la lignée LNCaP et impliquent entre autres la signalisation des facteurs de croissance et de cytokines (détaillé dans le § II.5.1.3.).

Les différents mécanismes d'action du RA par voie non génomique sont schématisés dans la figure 10.

4.4. Les œstrogènes

4.4.1. Les récepteurs aux œstrogènes (RE)

Comme pour les androgènes, les œstrogènes agissent par leurs récepteurs correspondants, les RE qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (Zhu et al., 2005). Ils modulent la transcription de gènes cibles via leur liaison à l'ADN par les éléments de réponse aux œstrogènes. Il existe deux isoformes de RE codés par deux gènes distincts, REα et REβ. Dans la prostate normale, les cellules épithéliales expriment REβ alors que les cellules stromales expriment les deux isoformes.

4.4.2. Le rôle des œstrogènes dans la prostate

Le développement de la prostate est très sensible au niveau d'œstrogènes circulants. En effet, l'exposition *in utero* de fœtus mâles à de très faibles taux d'œstrogènes résulte en une augmentation de la taille de la prostate. Au contraire, l'exposition *in utero* à de fortes doses en œstrogènes cause une réduction de la prostate avec une altération morphologique. Donc quand le niveau d'œstrogène varie, des altérations du développement prostatique sont observées, mais ces changements sont systémiques et conduisent en fait à un changement complexe de tout l'environnement endocrinien (Marker et al., 2003). L'œstradiol étant un métabolite de la

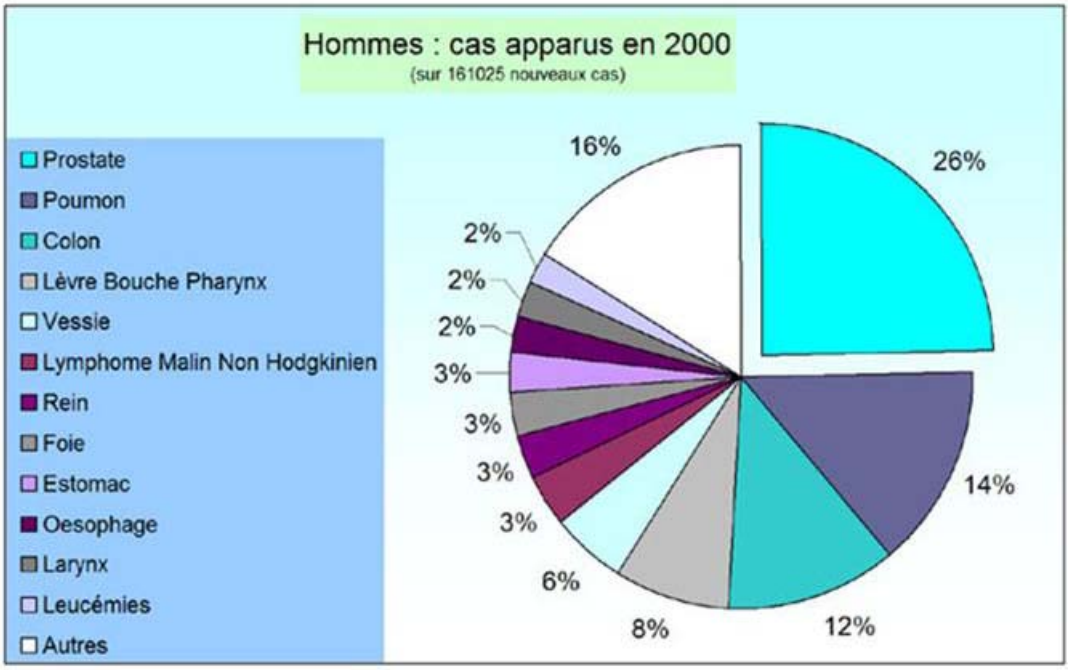


Figure 11 : Les nouveaux cas de cancers chez l'homme en 2000
http://www.cite-sciences.fr/francais/ala_cite/science_actualites/sitesactu/magazine/popup_photo.php?langue=fr&idmedia=2268&typeformat=QACTU&modepreview=&lang=fr&id_mag=2

testostérone qui participe au rétrocontrôle de la synthèse de testostérone, il est parfois difficile d'attribuer une fonction spécifique à l'un ou l'autre.

Les souris chez qui REα ou REβ, ou les deux, ont été invalidés (par Knock-out ou KO), ont une prostate normale. Donc le développement de la prostate est sensible à l'environnement endocrinien dont le taux d'œstrogènes, mais l'action locale des RE n'est pas requise pour le développement de la prostate dans un environnement endocrinien normal.

Si les RE ne semblent pas avoir un rôle direct dans la différenciation et le développement de la prostate, ils ont un rôle plus tardif (Ellem and Risbridger, 2007). En effet, les souris traitées transitoirement au stade néonatal aux œstrogènes développent avec l'âge une dysplasie épithéliale de la prostate et une inflammation due à une infiltration cellulaire. Cet effet de prolifération aberrante est médié par le REα car les souris KO REα ne présentent pas ce type d'anomalie suite au traitement aux œstrogènes, alors que les souris KO REβ ont la même réponse que les animaux normaux. Par contre, le REβ semble médier l'effet bénéfique attribué aux œstrogènes, de réduction et de prévention des maladies de la prostate comme le cancer (McPherson et al., 2007).

II. Le cancer de la prostate

L'histoire naturelle du cancer de la prostate semble débutée par la transformation progressive des cellules normales épithéliales en cellules tumorales suite à l'action de facteurs tumorigènes (prédisposition génétique, facteurs environnementaux,…). Les cellules subissent donc des modifications précancéreuses aboutissant à la formation d'un carcinome *in situ* devenant de plus en plus agressif avec perte de différenciation. Le cancer s'étend localement au sein de la glande prostatique dont il franchit les limites pour devenir métastatique. D'abord hormonosensible, le cancer devient insensible à la privation androgénique. Cet échappement au contrôle hormonal constitue la phase terminale du cancer de la prostate qui est aujourd'hui incurable.

1. Epidémiologie : fréquence et facteurs de risques

L'incidence du cancer de la prostate a très fortement augmenté au cours des deux dernières décennies avec 40 000 nouveaux cas recensés en France en 2003 contre 10 000 en 1980. Le taux d'incidence de ce cancer était de 25 pour 100 000 personnes en 1980, et de 75 pour 100

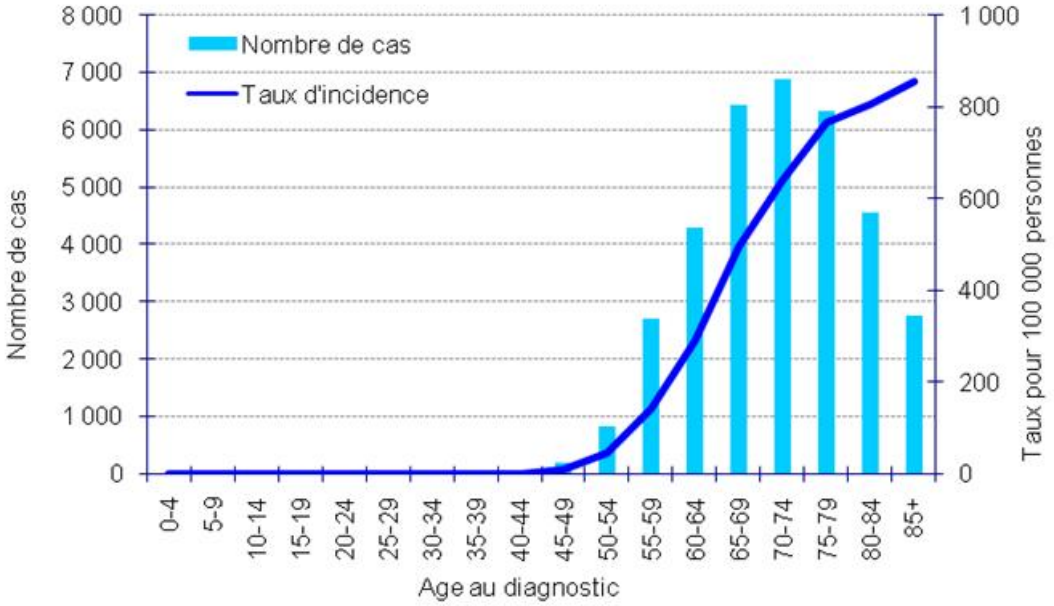


Figure 12 – Nombre de nouveaux cas de cancer de la prostate et taux d'incidence par classe d'âge au Royaume-Unis en 2004
http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/prostate/incidence/

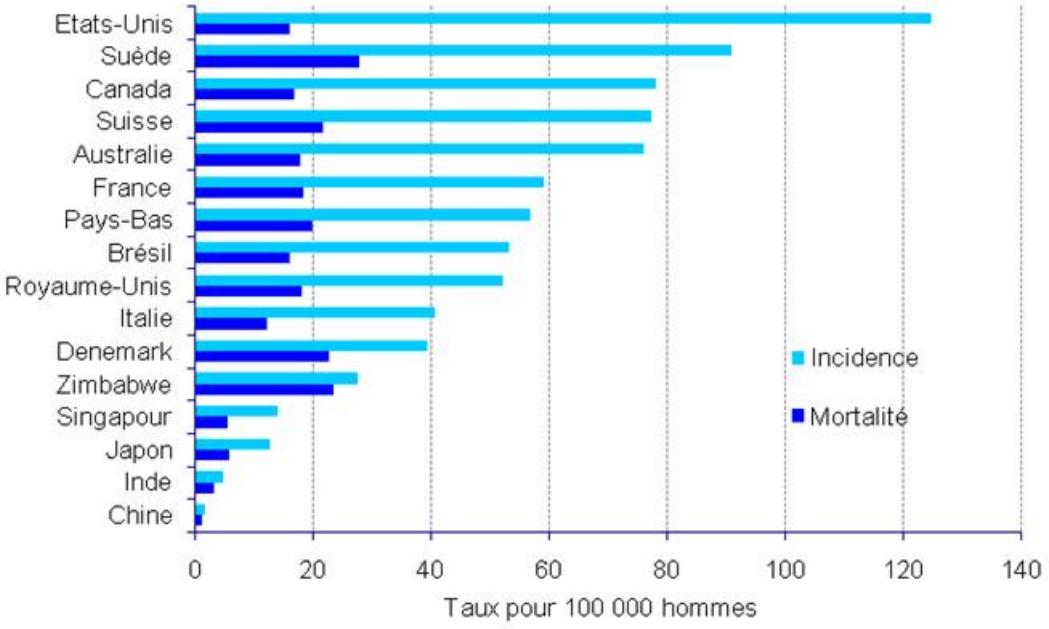


Figure 13 – Taux d'incidence et de mortalité du cancer de la prostate par pays estimés en 2002.
http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/prostate/incidence/

000 personnes en 2000, soit un taux d'évolution annuel de 5%. C'est désormais le cancer masculin le plus fréquent (25% des nouveaux cas de cancers masculins) devant le cancer du poumon ou les cancers colorectaux, et la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme (d'après l'institut de veille sanitaire en 2003, figure 11).

L'âge

Un des mécanismes mis en cause est le vieillissement de la population. En effet, l'incidence augmente régulièrement avec l'âge : le cancer de la prostate exceptionnel avant 50 ans, voit sa fréquence croître progressivement jusqu'à 60-65 ans puis brutalement ensuite (figure 12). C'est un cancer de l'homme âgé, l'âge médian étant de 74 ans en France et 75% des cancers de prostate sont diagnostiqués après 65 ans (Bauvin et al., 2003). Cette étroite relation avec l'âge risque d'avoir un retentissement socio-économique marqué en France, étant donné le vieillissement actuel de la population et l'entrée de la génération du "baby-boom" dans l'âge à risque ces prochaines années. Le nombre d'hommes de plus de 65 ans devrait être multiplié par quatre entre 2000 et 2050 dans le monde.

Les outils diagnostiques

L'augmentation de l'incidence des cancers prostatiques débute dans les années 1980 avec le développement de résections endoscopiques puis la biopsie échoguidée. Elle s'amplifie avec l'apparition du PSA après 1985. Ces nouveaux outils associés à un dépistage spontané des médecins ont conduit au diagnostic de cancer de prostate à un stade plus précoce et à un âge plus jeune. Pour la tranche d'âge 50-59 ans aux Etats-Unis, l'incidence du cancer prostatique est passée de 35 sur 100 000 en 1970, à 70 sur 100 000 en 1989 à 105 sur 100 000 en 1992. D'une maladie découverte souvent tardivement devant des symptômes urinaires ou métastatique chez l'homme de plus de 70 ans, le cancer de la prostate est devenu une maladie de l'homme plus jeune, à un stade plus souvent localisé et asymptomatique.

Les facteurs géographiques et ethniques

Enfin, les facteurs géographiques et ethniques rendent l'incidence de l'adénocarcinome prostatique très variable suivant les pays ou la communauté ethnique étudiée (Figure 13). La population la plus touchée est celle des Afro-Américains aux Etats-Unis. En France, les plus forts taux sont en Guadeloupe et Martinique.

La part de l'environnement semble très importante. Par exemple, les Asiatiques qui vivent aux Etats-Unis ont un risque de cancer de la prostate plus élevé que leurs homologues qui vivent en Asie. Cependant, les études autopsiques ont montré que la fréquence des cancers histologiques détectés dans ces deux populations est voisine. Au Japon, l'incidence du cancer

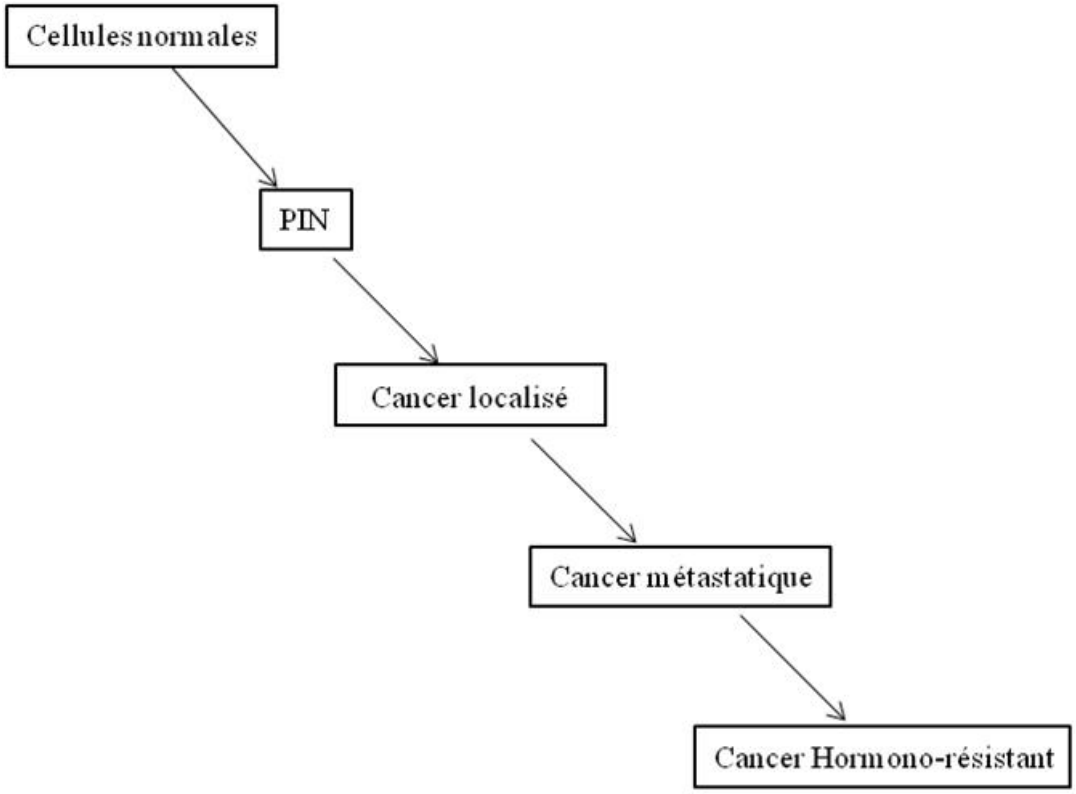


Figure 14 – Evolution du cancer de la prostate

de la prostate a augmenté avec l'évolution vers un mode de vie occidental. Par contre, l'incidence pour des Asiatiques qui vivent aux Etats-Unis ne représente que 50% de l'incidence des Américains-Caucasiens et 25% des Afro-Américains, soulignant l'importance des facteurs génétiques (Gronberg, 2003).

Les facteurs génétiques

L'existence d'antécédents familiaux est un facteur de risque important représentant 10 à 15% des patients ayant un cancer de la prostate. Un homme ayant un membre de sa famille du premier degré (père ou frère) atteint d'un cancer prostatique a un risque deux à trois fois plus de élevé de développer la maladie. Quelques gènes ont pu être identifiés dans un mode de transmission autosomique dominant mais cela représente un faible nombre de cas. L'effet le plus important des gènes serait dû au polymorphisme de gènes impliqués dans le développement et la fonction de la prostate comme les récepteurs aux androgènes et à la vitamine-D, la 5α-réductase et la 17α-hydroxylase (Gronberg, 2003).

Les facteurs exogènes

Parmi les facteurs alimentaires, les phyto-œstrogènes, le lycopen contenu dans la sauce tomate, le sélénium et la vitamine E sont les nutriments les plus prometteurs en termes de protection contre le cancer de la prostate et font l'objet d'études cliniques plus approfondies. A l'inverse, la consommation de graisses animales saturées, de quantités importantes de viandes rouges conduirait à une augmentation du risque de cancer de prostate. L'alcool et la cigarette sont sans impact sur l'incidence de la maladie (Gronberg, 2003).

C'est la combinaison des facteurs génétiques et environnementaux qui expliquerait les variations complexes de l'incidence du cancer prostatique.

2. Evolution naturelle du cancer de la prostate

L'évolution du cancer de la prostate est schématisée dans la figure 14.

2.1. Néoplasie intra-épithéliale prostatique

La néoplasie intra-épithéliale prostatique (PIN) est caractérisée par une prolifération cellulaire au voisinage des canaux et acini prostatiques, présentant des altérations phénotypiques et génétiques proche des cellules cancéreuses (Bostwick et al., 1996). La différence majeure avec les cancers est que l'assise cellulaire basale est conservée. Les PIN sont subdivisés en deux catégories : PIN de bas grade et PIN de haut grade. Les lésions de PIN de haut grade

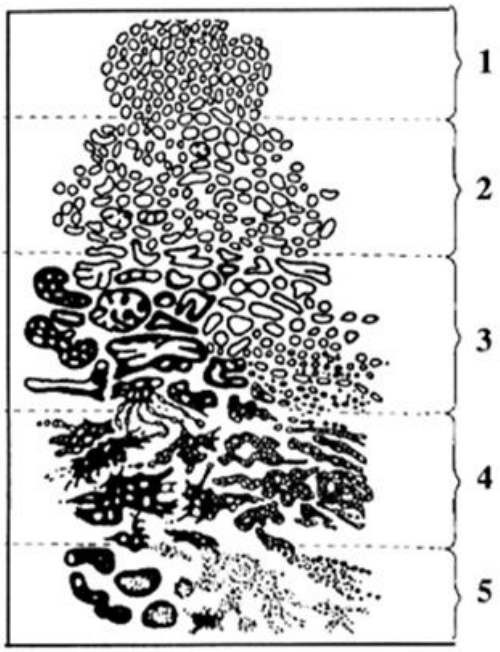


Figure 15 – Schéma de chacun des grades du score de Gleason

sont considérées comme étant les précurseurs des adénocarcinomes prostatiques, et coexistent avec les cancers dans plus de 85% des cas.

2.2. L'adénocarcinome prostatique

Les cancers prostatiques peuvent être classés suivant le type cellulaire qui est à l'origine de la tumeur :

Origine épithéliale :

- Adénocarcinome
- Carcinome à cellules transitionnelles
- Tumeur neuroendocrine

Origine stromale :

- Rhabdomyosarcome (plus souvent chez l'enfant de moins de 10 ans)
- Léiomyosarcome (plus souvent chez l'adulte après 40 ans)

99% des tumeurs malignes prostatiques sont des adénocarcinomes. Ils se développent aux dépends de l'épithélium sécrétoires des canaux et acini prostatiques et sont dépourvus de couches de cellules basales. Les noyaux des cellules carcinomateuses sont de taille augmentée par rapport aux cellules bénignes et comportent un nucléole proéminent.

L'adénocarcinome prostatique est multicentrique, polymorphe et forme un large spectre de lésions, allant de carcinomes très bien différenciés où les glandes tumorales diffèrent peu des glandes normales, à des carcinomes très peu différenciés ne présentant ni la morphologie, ni les fonctions sécrétoires habituelles. Deux types de classification sont utilisés pour caractériser les tumeurs en fonction de leur état d'avancement, pour préjuger de leur agressivité et ainsi adapter le traitement. **Le score de Gleason** est basé sur les différents aspects architecturaux de la tumeur dont les caractéristiques sont les suivantes (Gleason and Mellinger, 1974) :

- définir cinq grades architecturaux allant du grade 1, le plus différencié, au grade 5, le moins différencié (figure 15) ;
- prendre en compte les deux grades architecturaux les plus représentés dans la tumeur pour définir le score de Gleason, qui est la somme du premier grade et du second grade.

Le score de Gleason va donc de 2 (tumeurs bien différenciées) à 10 (tumeurs indifférenciées).

Une deuxième classification permet de définir le stade du cancer prostatique, c'est la **classification TNM** (de l'union internationale contre le cancer, 2002).

Elle détermine : -l'extension de la tumeur par la lettre T

-l'extension ganglionnaire par la lettre N

-l'extension métastatique par la lettre M

Le système TNM :

- **Stade T : Tumeur primitive**

-Tx : Tumeur primitive ne pouvant pas être évaluée

-T0 : Pas de signe de tumeur primitive

-T1 : Tumeur non palpable, non visible à l'imagerie

T1a : < 5% des copeaux

T1b : > 5% des copeaux

T1c : découverte par biopsie

-T2 : Tumeur limitée à la prostate

T2a : atteinte de moins de 50% d'un lobe

T2b : atteinte de plus de 50% d'un lobe

T2c : atteinte des deux lobes

-T3 : Extension au-delà de la capsule

T3a : atteinte du tissu extraprostatique

T3b : atteinte des vésicules séminales

-T4 : Extension aux organes adjacents

- **Stade N : Extension ganglionnaire régionale**

-Nx : On ne dispose pas des conditions minimales requises pour classer les ganglions lymphatiques régionaux et/ou juxta-régionaux

-N0 : Pas de signes d'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux

-N1 : Signes d'envahissement des ganglions lymphatiques régionaux

- **Stade M : Métastase à distance**

-Mx : On ne dispose pas des conditions minimales requises pour apprécier la présence de métastases à distance

-M0 : Pas de signes de métastases à distance

-M1 : Présence de métastases à distance

Le cancer de la prostate est caractérisé par un taux de prolifération lent. Il peut être présent, sous cette forme latente et asymptomatique des années, si bien que de nombreux hommes meurent d'autres causes, avec un cancer prostatique non déclaré. Cette forme initiale du cancer de la prostate est dite histologique et évolue ensuite vers une forme clinique, symptomatique. L'évolution d'un cancer prostatique passe par différents stades de différenciation (bien différenciés à peu différenciés) reflétant son agressivité, et d'extension. Les cellules cancéreuses prostatiques ont un tropisme pour certains organes comme les ganglions lymphatiques (régionaux ou distants), les os (rachis, fémur, bassin, côtes, sternum, crâne et humérus) et dans une moindre mesure dans les viscères (poumon, foie, surrénales et reins). Les cancers métastatiques sont dans un premier temps hormonosensibles.

2.3. L'hormono-indépendance

Suite à un traitement hormonal du cancer métastatique efficace dans 80% des cas sur une période de 18 mois en moyenne, un phénomène d'échappement apparaît alors (Schroder, 1998; Seidenfeld et al., 2000). Il est caractérisé par une reprise évolutive de la maladie, l'élévation du taux de PSA précédant de plusieurs mois la symptomatologie clinique. Les cellules tumorales sont capables de survivre et de se développer en l'absence d'androgènes. Les différentes stratégies cellulaires employées dans ce phénomène d'indépendance aux androgènes sont nombreuses et abordées dans le §5.

2.4. Modifications génétiques et épigénétiques impliqués dans le cancer de la prostate

Comme dans les autres cancers, le cancer de la prostate se développe à travers l'accumulation de modifications génétiques somatiques et épigénétiques qui résultent en l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes de ménage, ainsi que l'activation d'oncogènes, récapitulés dans le tableau 1.

Gènes	Localisation	Notes
Suppresseurs de tumeurs		
CDKN1B	12p13.1-p12	Code pour p27, inhibitrice des CDK (cyclin-dependent kinase). Un allèle est souvent délété dans les cancers primaires.
NKX3.1	8p21.2	Code pour une protéine à homéobox spécifique de la prostate, qui supprime la croissance des cellules épithéliales prostatiques. Un allèle est souvent délété dans les cancers primaires.
PTEN	10q23.31	Code pour la protéine PTEN qui supprime la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose. Un allèle est souvent perdu dans les cancers primaires et des mutations sont retrouvées dans les cancers primaires et métastatiques.
TP53	17p13.1	A de nombreuses fonctions suppresseur de tumeurs dont l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. Les mutations sont fréquentes dans les cancers avancés et réfractaires aux hormones.
Oncogènes		
MYC	8q24	Facteur de transcription qui régule de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la sénescence, l'apoptose et le métabolisme. Sa surexpression transforme les cellules.
ERG	21q22.3	Nouvel oncogène du cancer de la prostate
ETV1-4	7p21.3 19q13.12 1q21-23 17q21.31	Codent pour des facteurs de transcription « ETS-like » 1-4,proposés comme de nouveaux oncogènes du cancer de la prostate.
AR	Xq11-12	Code pour le récepteur aux androgènes. Amplification ou mutations dans les cancers avancés et réfractaires aux hormones.
Activation de la télomérase		Maintien la fonction des télomères et contribue à l'immortalisation des cellules. Est activée dans la plupart des cancers prostatiques.
Gènes de ménages		
GSTP1	11q13	Enzyme de détoxification. Est inactivée dans 90% des cancers par hyperméthylation.
Dysfonctionnement des télomères	Extrémités des chromosomes	Contribue à l'instabilité chromosomale. Un raccourcicement des télomères existe dans 90% des PIN et cancers prostatiques.
Autres		
PTGS2, APC, MDR1, EDNRB, RASSF1α, RARβ2		Une hyperméthylation des régions régulatrices existe dans la plupart des cancers primaires et métastatiques.

Tableau 1 - Modifications génétiques somatiques et épigénétiques impliqués dans le cancer de la prostate (d'après (De Marzo et al., 2007).

3. Diagnostic du cancer de la prostate

3.1. Le toucher rectal

Le toucher rectal est un moyen simple d'apprécier le volume et la souplesse de la prostate. La zone périphérique où se développe 70% des cancers de la prostate est proche du rectum, et donc accessible au toucher rectal.

3.2. Le dosage du PSA

Le PSA est sécrété dans le liquide séminal à de très hautes concentrations par les cellules épithéliales. Le passage dans le sang est normalement très faible. La désorganisation architecturale de la glande prostatique majore ce phénomène de relargage sanguin. Le cancer de la prostate, l'adénome prostatique, l'inflammation et les traumatismes prostatiques sont ainsi responsables d'une élévation du PSA sérique. Depuis le début des années 80, le PSA est utilisé comme marqueur du cancer prostatique. C'est devenu un outil indispensable du dépistage, du diagnostic précoce, de la stadification et du suivi des patients atteints d'un cancer de la prostate.

Le taux de PSA sanguin varie en fonction de l'âge (tableau 2). L'utilisation de ces seuils augmente la sensibilité du dépistage chez les sujets jeunes et privilégie la spécificité chez les sujets âgés évitant beaucoup d'explorations inutiles.

	Tranches d'âge			
	40 - 49 ans	50 - 59 ans	60 - 69 ans	70 - 79 ans
[PSA]	2,5 ng/ml	3,5 ng/ml	4,5 ng/ml	6,5 ng/ml
Nombre	165	144	94	68

Tableau 2 - Taux de PSA par tranches d'âges (d'après Riedinger et al. 1998).

Une élévation du PSA n'est pas synonyme de cancer et réciproquement, un PSA faible n'exclue pas la présence d'un cancer. Le seuil de 4 ng/ml a été décrit comme offrant le meilleur équilibre entre spécificité et sensibilité lorsqu'il est utilisé seul pour dépister un cancer (Brawer, 1999; Coley et al., 1995). A ce seuil, la valeur prédictive du PSA oscille entre 11 et 45% (Karazanashvili and Abrahamsson, 2003). Ces valeurs varient en fonction de la tranche de PSA examinée. Entre 4 et 10 ng/ml la valeur prédictive positive du PSA est de 18-25% et au-delà elle est de 58-64%. Du fait de ces mauvaises performances en terme de spécificité, le nombre de faux positifs est élevé et responsable d'un grand nombre de biopsies prostatiques. Dans certains cas, le taux de PSA peut être interprété en fonction de l'âge du patient et une valeur de 3 ng/ml peut servir de référence chez les patients à partir de 45 ans ayant un risque familial de cancer de la prostate ou chez les patients d'origine afro-antillaise.

Le PSA sérique existe sous forme de deux fractions : une partie complexée à des protéines circulantes et une partie libre. Pour améliorer la spécificité du PSA surtout dans la zone entre 4 à 10 ng/ml où le nombre de faux positifs est le plus élevé, on peut utiliser le rapport PSA libre/total. Un rapport inférieur à 15% est en faveur d'un cancer de la prostate, alors qu'au-

delà de 25%, il est en faveur d'un adénome ou d'une prostate normale (Catalona et al., 1998). Pour les patients qui ont un rapport entre 15 et 25% le PSA libre/total n'apporte pas d'information. C'est un outil néanmoins utile qui permet d'éviter 20 à 30% des biopsies.
D'autre part, la progression du PSA en fonction du temps appelée vélocité du PSA peut être utilisée pour améliorer son efficacité. Une élévation annuelle de 0,75 ng/ml du PSA est prédictive d'un cancer de la prostate (Carter et al., 1992; Smith and Catalona, 1994). Cette valeur semble particulièrement intéressante pour les patients ayant un PSA inférieur à 4 ng/ml.
Le taux de PSA est également utilisé pour suivre l'évolution d'un traitement du cancer de la prostate. C'est un indicateur précoce et fidèle de l'efficacité thérapeutique et du développement d'une récidive.

3.3. Les biopsies de la prostate

Toute anomalie au toucher rectal et/ou taux de PSA anormal conduisent le praticien à proposer des biopsies de la prostate. Elles seront analyser par un anatomopathologiste qui déterminera entre autres le score de Gleason, la longueur du tissu envahit, le statut de la capsule prostatique et l'envahissement des nerfs périphériques.

4. Les traitements

En 1941, Hoggins et Hodges ont découvert non seulement que la privation androgénique par orchidectomie ou par administration d'œstrogènes chez des patients inhibaient la croissance du cancer prostatique mais aussi que l'administration d'androgènes le faisait au contraire progresser (Huggins and Hodges, 2002). Ils démontrèrent avec ces résultats sensationnels que le cancer prostatique est sous contrôle hormonal. On crut qu'un remède définitif au cancer prostatique avait été trouvé ce qui valut à Hoggins le prix Nobel de médecine en 1966. Malheureusement, il apparut chez les patients traités un phénomène d'échappement. A l'heure actuelle, les traitements hormonaux se sont diversifiés mais le phénomène d'échappement n'est toujours pas élucidé.
Les approches thérapeutiques sont fonctions du stade diagnostiqué du cancer et de l'espérance de vie du patient. Les traitements sont curatifs dans le cas de cancers prostatiques localisés et palliatifs pour les stades localement avancés et métastatiques.

4.1. Cancer de la prostate localisé (T1-2, No, Mo)

Grâce aux outils de dépistage actuels, le cancer localisé asymptomatique est la forme la plus souvent diagnostiquée. Lorsque l'espérance de vie est supérieure à dix ans, trois traitements curatifs existent ayant des résultats carcinologiques comparables : la prostatectomie radicale, la radiothérapie externe, et la radiothérapie interne ou curiethérapie. Par contre, ces traitements ont des complications importantes, non négligeables pour la qualité de vie des patients puisque 2 à 5% des hommes ont une incontinence sévère, et 10 à 90% deviennent impuissants avec une moyenne à 70% (Frankel et al., 2003; Siegel et al., 2001; Stanford et al., 2000; Weldon et al., 1997). La question des bénéfices et des inconvénients engendrés par les traitements des cancers asymptomatiques à évolution lente mérite d'être posée et discutée en fonction de l'âge du patient et de la différenciation de la tumeur (Frankel et al., 2003). Lorsque l'espérance de vie est inférieure à dix ans, une surveillance sans traitement ou avec hormonothérapie plus ou moins associée à une radiothérapie pourront être proposée.

4.1.1. La prostatectomie radicale

Elle consiste en l'exérèse de la prostate dans sa totalité ainsi que des vésicules séminales.
Une étude clinique a montré que la prostatectomie radicale sur des patients ayant un cancer prostatique localisé montre une réduction de la mortalité spécifique et globale ainsi qu'une diminution du risque de métastases et de progression locale de la maladie par rapport aux patients mis sous surveillance (Bill-Axelson et al., 2005).

4.1.2. La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons à haute énergie et des particules pour détruire les cellules cancéreuses. Dans la technique de **radiothérapie externe**, le rayonnement produit par une source externe est focalisé sur la prostate après l'avoir précisément repérée.
La **curiethérapie** consiste en l'irradiation *in situ* du tissu prostatique par implantation de grains radioactifs d'iode^{125} ou de palladium^{103} laissés en place de manière définitive et qui délivrent très progressivement la dose choisie.

4.2. Cancer de la prostate localement avancé ou métastatique

Lorsque le cancer est localement avancé (stade T3NoMo) s'étendant à la graisse péri-prostatique ou aux vésicules séminales, le traitement palliatif de référence est l'association radiothérapie externe à une hormonothérapie néo-adjuvante ou adjuvante. La radiothérapie a

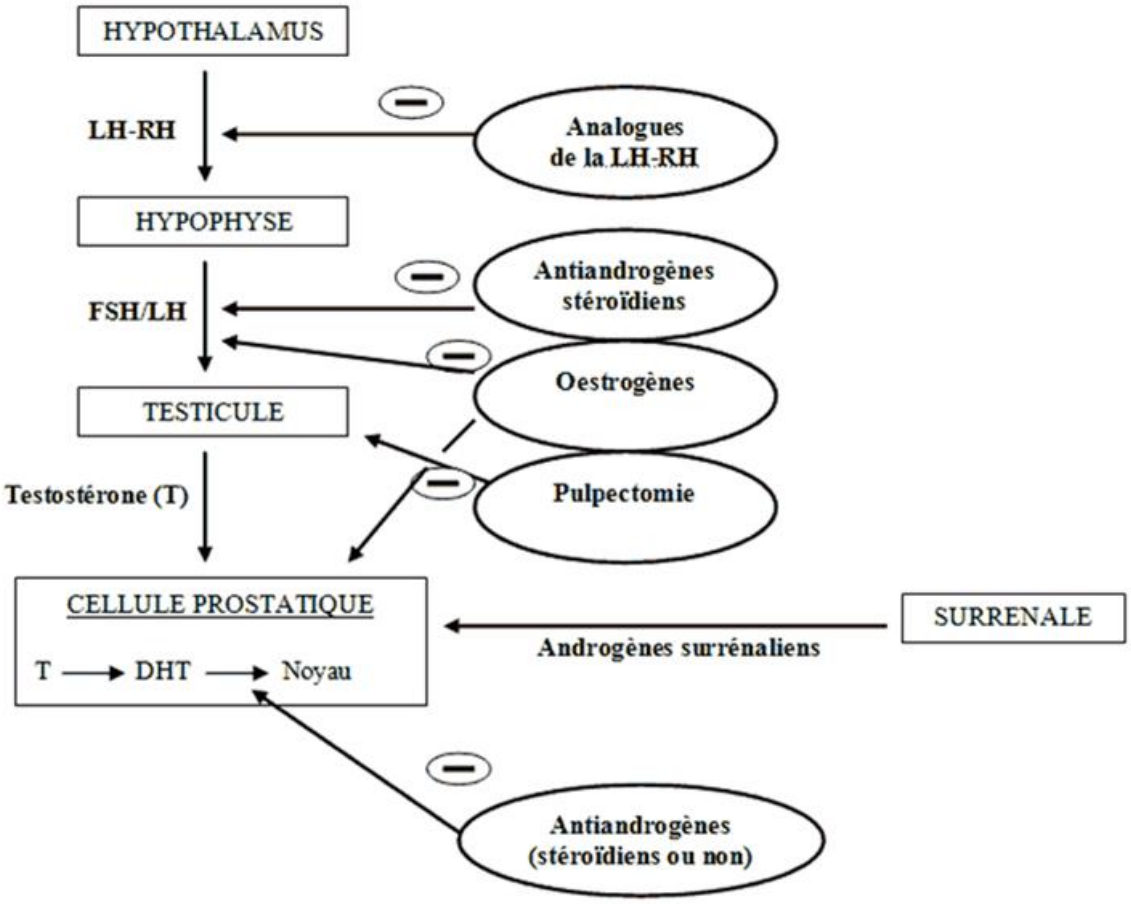


Figure 16 – Schéma général de l'hormonothérapie

pour but de diminuer le risque de progression locale, et l'hormonothérapie de prévenir le risque de métastases à distance. Le taux de survie spécifique à cinq ans est de 94%.
Lorsque le cancer est métastatique (TxN+ ou TxM+), l'hormonothérapie appelée aussi traitement hormonal sera le traitement palliatif choisit. C'est la privation androgénique de la tumeur soit en supprimant la production de testostérone, soit en empêchant la testostérone d'agir sur les cellules prostatiques cancéreuses, et résulte donc en une inhibition, bien que transitoire, de la croissance tumorale (Figure 16).

4.2.1. Orchidectomie bilatérale

L'orchidectomie bilatérale consiste à réaliser l'ablation des testicules, totale ou sous-capsulaire (pulpectomie), lieu de production de testostérone. D'un point de vue historique, c'est le traitement de référence du cancer de la prostate métastatique mais la castration chirurgicale est actuellement moins pratiquée (Huggins and Hodges, 2002). Elle s'est faite remplacée en partie par le traitement aux analogues de la LH-RH d'efficacité identique (Seidenfeld et al., 2000). L'orchidectomie pose des problèmes psychologiques importants dans la mesure où elle conduit à une impuissance sexuelle totale définitive et irréversible, accompagnée d'une disparition de la libido. Néanmoins, elle est utilisée dans les situations d'urgence qui nécessitent une suppression androgénique rapide.

4.2.2. Analogues de la LH-RH

Les analogues de la LH-RH entraînent une stimulation continue des récepteurs hypophysaires de la LH-RH, qui a pour conséquence de les désensibiliser. Il s'en suit un arrêt de la sécrétion de LH et donc des androgènes d'origine testiculaire. Le taux de testostérone chute au même seuil que la castration chirurgicale (Seidenfeld et al., 2000). Néanmoins, avant la désensibilisation des récepteurs, les analogues de LH-RH provoquent une stimulation initiale de l'hypophyse qui s'accompagne d'une hypersécrétion temporaire de LH et de testostérone qu'il convient donc de contrecarrer par le traitement combiné avec un anti-androgène durant les 3 à 4 premières semaines (Goktas et al., 1999).

4.2.3. Anti-androgènes

Les anti-androgènes inhibent compétitivement la fixation des androgènes testiculaires et surrénaliens sur le RA des cellules cibles. On distingue deux types d'anti-androgènes : stéroïdiens ou non-stéroïdiens.

Le seul **anti-androgène stéroïdien** utilisé en France est le cyprotérone acétate. Il a une structure apparentée à la progestérone qui lui confère une activité anti-gonadotrope centrale en plus de son activité anti-androgénique au niveau périphérique. Son mode d'action est complet car il bloque la sécrétion de LH par l'hypophyse et donc de testostérone, et bloque le RA des cellules prostatiques. Son efficacité carcinologique est comparable à celle de la castration chirurgicale ou médicale.

Les **anti-androgènes non-stéroïdiens** bloquent le récepteur androgénique des cellules prostatiques avec pour conséquence une stimulation de la production de testostérone par la levée du rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Trois molécules sont actuellement utilisées en France : le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide dont le mode d'action sera détaillé plus loin (§ 6). Ils sont surtout utilisés en combinaison avec un analogue de la LH-RH pour obtenir un blocage anti-androgénique complet (BAC) afin d'inhiber l'action des androgènes d'origine surrénalienne. En effet, si la castration médicale ou chirurgicale simple entraîne diminution du taux de testostérone de 90%, la DHT intra prostatique diminue de 50 à 70% seulement, car les cellules prostatiques possèdent les enzymes nécessaires à la conversion des androgènes surrénaliens en DHT (Labrie et al., 2003). Néanmoins, le bénéfice apporté sur la survie globale à 5 ans par le BAC est de 3% par rapport aux analogues de LH-RH seuls (Chodak, 2005; Lukka et al., 2006). Cette amélioration du BAC doit être tempérée par les effets secondaires qui leur sont associés se traduisant par une réduction de la qualité de vie significative par rapport aux analogues seuls.

Les différents agents antihormonaux disponibles en France et leurs actions sont récapitulés dans le tableau 3 :

CATEGORIES	MOLECULES	ACTIONS
Agonistes de la LH-RH	• Triptoréline (Décapeptyl®) • Leuproréline (Enantone®) • Buséréline (Bigonist®) • Goséréline (Zoladex®)	Inhibition de la sécrétion de LH, FSH et d'androgènes d'origine testiculaire
Anti-androgènes stéroïdiens	• Acétate de cyprotérone (Androcur®)	Inhibition du RA Action progestative de diminution de sécrétion de LH, FSH et d'androgènes d'origine testiculaire
Anti-androgènes non stéroïdiens	• Nilatulamide (Anandron®) • Flutamide (Eulexine®) • Bicalutamide (Casodex®)	Inhibition du RA et augmentation de testostérone
Anti-androgènes surrénaliens	• Corticoïdes : Prednisone • Kétoconazole (Nizorale®) • Aminoglutéthimide (Orimétène®)	Inhibition des androgènes surrénaliens
Œstrogènes de synthèse	• Diethylstilbestrol (Distilbène®) • Phosphate d'estramucine (Estracyt®)	Inhibition centrale de la sécrétion de LH-RH, LH et testostérone testiculaire

Tableau 3 - Les différentes molécules utilisées en France pour traiter les cancers de la prostate par hormonothérapie en première et/ou seconde intention.

4.3. Cancer prostatique au stade de l'échappement hormonal

Si l'ensemble des traitements présentés dans le paragraphe précédent permet une amélioration de la qualité de vie et de l'espérance de vie, ils n'en restent pas moins des traitements palliatifs. En effet, le cancer évolue immanquablement vers une androgéno-indépendance dans les 18 mois en moyenne suivant le début de l'hormono-privation. Cette évolution se caractérise par une nouvelle ascension du PSA qui traduit la reprise de la croissance tumorale. Les traitements palliatifs alors proposés consistent en une hormonothérapie de deuxième ligne

ou une chimiothérapie (Lam et al., 2006). A ce stade, l'espérance de vie fluctue entre 12 et 18 mois (Seidenfeld et al., 2000).

4.3.1. L'hormonothérapie de deuxième ligne

Les **anti-androgènes** peuvent être utilisés en seconde intention en fonction de la molécule utilisée en première intention. Par exemple, une réduction du taux de PSA a pu être observée avec du bicalutamide chez des patients initialement traités au flutamide, ainsi qu'avec le nilutamide après un traitement initial par flutamide ou bicalutamide (Fossa et al., 2001; Kassouf et al., 2003; Kucuk et al., 2001; Taplin et al., 1999). Par contre, les bénéfices sur la qualité de vie sont moins évidents.

L'**estrogénothérapie** a été le premier traitement hormonal du cancer de la prostate, utilisant principalement le diéthylstilbœstrol. Il agit en bloquant la sécrétion de LH hypophysaire et donc la sécrétion de testostérone testiculaire. Son efficacité est semblable à celle des anti-androgènes mais en raison des effets secondaires trop importants (toxicité cardio-vasculaire), les œstrogènes ne sont plus utilisés en première intention mais en hormonothérapie de seconde ligne. Ils présentent un bénéfice en terme de réponse biologique et sur une amélioration symptomatique de 82% sur une durée moyenne de 6 mois (Orlando et al., 2000; Smith et al., 1998).

Les **inhibiteurs des androgènes surrénaliens** associés à un anti-androgène et les **corticoïdes** seuls ou associés à certaines chimiothérapie peuvent être utilisés pour traiter les cancers de la prostate hormono-indépendants.

4.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie s'est beaucoup développée ces dernières années avec l'utilisation de nouveaux agents anticancéreux.

Depuis 2000, **l'association mitoxantrone/prednisone** (un corticoïde) a montré une amélioration de la qualité de vie et un bénéfice clinique, malgré l'absence d'amélioration de la survie (Tannock et al., 1996). Le mitoxantrone est un inhibiteur de la topoisomérase de type II (anthracycline) utilisé pour traiter d'autres cancers.

Actuellement, ce sont les **taxanes** qui améliorent nettement les traitements du cancer de la prostate hormonorésistant. Ce sont des inhibiteurs de la dépolymérisation des microtubules qui bloquent la division cellulaire d'une part, et d'autre part, ils semblent induire la mort cellulaire par inhibition de la protéine Bcl-2 (Haldar et al., 1997). A présent, pour la première fois depuis 20 ans, deux études de phases III démontrent un avantage en termes de survie du

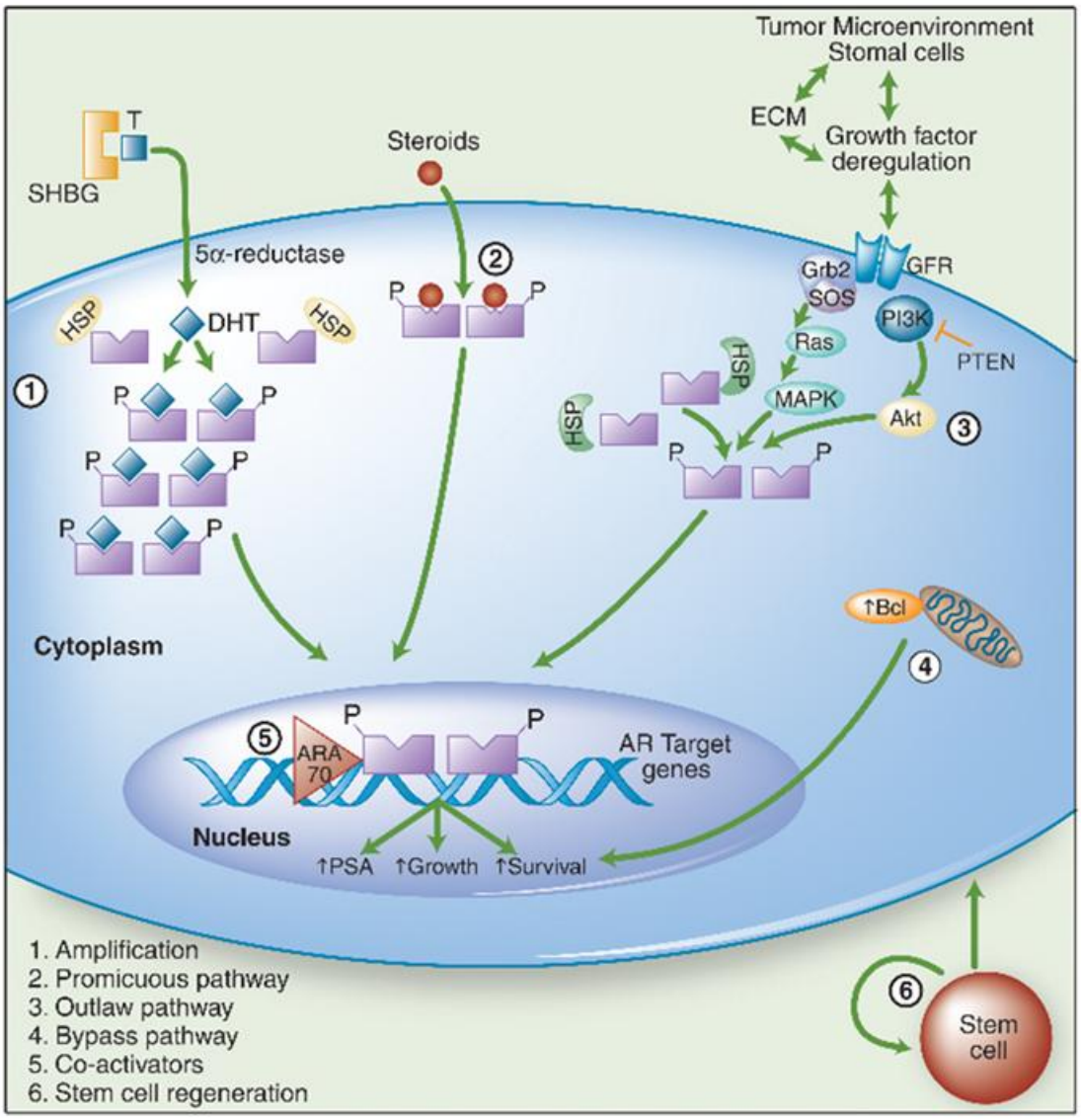


Figure 17 – Les différents mécanismes possibles de l'hormono-indépendance (d'après Pienta & Bradley).

1, amplification. Les cellules cancéreuses prostatiques abaissent leur seuil de sensibilité aux androgènes pour leur survie en augmentant la production des récepteurs aux androgènes (RA), la sensibilité du RA aux androgènes et la conversion locale de testostérone en DHT, par la 5α-réductase (5αR). **2, "promiscuous binding" : activation du RA par des ligands inhabituels**. Mutations du RA qui élargit les interactions du RA à des molécules non-androgéniques ou aux anti-androgènes, qui activent le RA. **3, "outlaw pathway" : activation du RA sans ligand**. Le RA est activé suite à des cascades de signaux intracellulaires indépendants de la fixation d'un ligand. **4, voie de survie**. Les cellules cancéreuses prostatiques développent la capacité de survivre indépendamment du RA. **5, corégulateurs**. L'altérations de la balance entre coactivateurs et corépresseurs, qui sont les intermédiaires entre le RA et la machinerie de transcription, influencent l'activation du RA, contribuant à la réponse aux faibles taux d'androgènes et aux mécanismes d'activation alternatifs. **6, les cellules souches**. Les cellules souches cancéreuses prostatiques qui ne dépendent pas du RA pour leur survie régénèrent continuellement la population cellulaire tumorale malgré la thérapie.

docetaxel seul ou combiné à l'estramustine comparé au standard mitoxantrone/prednisone (Petrylak et al., 2004; Tannock et al., 2004). Le docetaxel améliore également la réponse biologique du PSA, le contrôle des douleurs et la qualité de vie. Le phosphate d'estramustine, un conjugué d'œstradiol et d'une moutarde azotée, possède des propriétés antimitotiques en se fixant à la tubuline et à des protéines associées à la tubuline.

5. Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cancer de la prostate en échappement hormonal

L'apparition du cancer de prostate et son évolution vers une androgéno-indépendance sont probablement multi-causales, impliquant à la fois des altérations génétiques, des remaniements chromatiniens, des changements d'expression protéique et des modifications des voies de signalisation intracellulaires. Les mécanismes de résistances aux androgènes sont complexes et peuvent être subdivisés en plusieurs catégories (Feldman and Feldman, 2001; Pienta and Bradley, 2006) (figure 17).

5.1. Modifications de l'activation du RA

5.1.1. Hypersensibilité du RA aux androgènes

En réponse à une privation androgénique, un des mécanismes utilisés par la cellule est d'augmenter la sensibilité du RA dans un environnement très faible en androgènes. Cette voie est donc dépendante du RA et pas strictement indépendante des androgènes.

30% des tumeurs en échappement présentent une **amplification du RA** qui n'existe pas dans les tumeurs initiales avant le traitement hormonal (Koivisto et al., 1997; Visakorpi et al., 1995). C'est donc un processus qui entraîne l'androgéno-indépendance de la tumeur suite à la privation androgénique. Néanmoins, ce sont les patients qui répondent bien à l'hormonothérapie initiale (supérieure à douze mois) qui développent ce mécanisme d'amplification, alors que les tumeurs des patients qui ne répondent pas ou qui échappent rapidement ne présentent pas d'amplification du RA (Koivisto et al., 1997). Le taux de survie de ces deniers est d'ailleurs deux fois plus faible que les patients qui ont acquis cette amplification.

De nombreuses publications ont montré que la résistance aux androgènes était corrélée avec la **surexpression du RA** dans des modèles de souris castrées et *in vitro* (Chen et al., 2004; Culig et al., 1999; Gregory et al., 2001; Hobisch et al., 2000; Shi et al., 2004). Si l'amplification du RA se traduit par une surexpression du RA, l'inverse n'est pas forcément vrai (Culig et al.,

1999; Holzbeierlein et al., 2004). Cette surexpression du RA permet d'abaisser le seuil de réponse des cellules aux androgènes et ainsi de stimuler la croissance cellulaire avec des concentrations en androgènes très faibles (Chen et al., 2004; Culig et al., 1999; Gregory et al., 2001; Hobisch et al., 2000).

En plus de la surexpression du RA, Gregory *et al.* ont montré une **augmentation de la sensibilité du RA** dans des lignées cellulaires où la stabilité du RA est augmentée (demi-vie deux à quatre fois plus longue) et sa localisation est nucléaire et cytoplasmique même en absence de DHT (Gregory et al., 2001).

Un dernier mécanisme d'hypersensibilité aux androgènes peut-être dû à une **augmentation de la production locale en androgènes** par les cellules cancéreuses elles-mêmes. En effet il a été montré que des enzymes de la biosynthèse des stéroïdes sont surexprimées dans les tumeurs récurrentes (Holzbeierlein et al., 2004). Après privation androgénique, le taux de testostérone dans le sérum décroît à 95%, alors que celui de la DHT diminue de 50 à 70% seulement dans la prostate (Labrie et al., 2003; Labrie et al., 1986). De plus, il a été mis en évidence qu'une activité élevée en 5α-réductase de type II dans certains groupes ethniques est corrélée avec un fort taux de cancer prostatique (Makridakis et al., 1997).

5.1.2. Activation du RA par des ligands inhabituels

Le RA sauvage est activé par la testostérone et la DHT seulement mais cette spécificité peut-être élargit à d'autres ligands en cas de mutations. Les **mutations du RA** sont rares dans les cancers prostatiques localisés mais fréquentes dans les cancers métastatiques androgéno-indépendants (Haapala et al., 2001; Marcelli et al., 2000; Taplin et al., 1999; Taplin et al., 1995). Donc les mutations du RA n'interviennent pas les phases initiatrices du cancer de la prostate mais sont plutôt des évènements tardifs dans la progression du cancer. La majorité des mutations découvertes sont localisées dans le domaine de liaison du ligand du RA qui entraînent des changements de conformation activant la voie de signalisation des androgènes (Haapala et al., 2001; Taplin et al., 1995). Ainsi, le RA muté peut-être activé dans un environnement dépourvu d'androgènes par les anti-androgènes flutamide, bicalutamide et cyprotérone acétate, et par la progestérone et l'œstradiol (Berrevoets et al., 2002; Haapala et al., 2001; Taplin et al., 1995). Taplin *et al* montrent la corrélation entre le type de traitement administré avant l'échappement hormonal et l'apparition d'une mutation précise (Taplin et al., 1999). Après traitement au BAC avec flutamide, 5 patients sur 16 présentent la mutation sur l'acide aminé 877 alors que sur 17 patients ayant reçus un traitement hormonal sans antagoniste, un seul présente une mutation en position 890. Parmi les mutations sur la position

877, 4 sont de type T877A comme précédemment décrite sur la lignée LNCaP et sur des patients ayant un cancer prostatique avancé, et la 5^{e} est de type T877S. Le flutamide agit comme agoniste du RA dans les cellules transfectées avec les RA mutés en 877 (T877A et T877S) alors qu'il exerce une action antagoniste sur le RA sauvage et le RA muté en 890. Cette corrélation a été faite aussi avec le BAC au bicalutamide (Hara et al., 2003). Le traitement hormonal induit une pression de sélection sur les cellules cancéreuses favorisant la sélection clonale des mutants du RA dont la fréquence et la position sont corrélées à l'anti-androgène utilisé. Ces mutations induisent un phénomène observé en clinique sur environ 10% des patients traités à long terme avec un anti-androgène appelé **syndrome de retrait des anti-androgènes** (Taplin et al., 2003). Suite au retrait de l'anti-androgène, une régression de la tumeur est observée pendant quelques mois.

5.1.3. Activation du RA sans ligand

Le RA peut-être activé sans ligand par interaction avec d'autres voies de signalisation intracellulaires.

Certains **facteurs de croissance** comme IGF-1, KGF et EGF peuvent induire la transcription de gènes régulés par RA en absence d'androgènes (Culig et al., 1994). Cette activation est inhibée par le bicalutamide, suggérant qu'elle fait intervenir le domaine de liaison du ligand du RA. Un des mécanismes possibles proposé par Fan *et al* est que IGF-1 pourrait inhiber le recrutement du corépresseur Foxo1 sur le RA (Fan et al., 2007). D'autre part, le récepteur à l'IGF (IGF-R1) à activité tyrosine kinase interagit avec la voie de signalisation du RA en modulant sa phosphorylation et donc son activité, induisant sa translocation nucléaire (Wu et al., 2006).

En absence d'androgènes, l'interleukine **IL-6** permet aussi l'activation transcriptionnelle du RA, et possède une action synergique en présence d'androgènes (Hobisch et al., 1998; Ueda et al., 2002; Yang et al., 2003). L'effet de l'IL-6 sur la croissance des cellules tumorales est néanmoins controversé. Yang *et al* ont montré que l'IL-6 module l'activité du RA via différentes voies de signalisation. Ils suggèrent qu'il stimule la transactivation du RA par les voies des MAPK et de STAT3, un facteur de transcription activé par le récepteur à l'IL-6, mais qu'il inhibe l'activation du RA via la voie de PI3K-Akt. De la même façon, la surexpression de l'interleukine **IL-4** dans le lignée LNCaP stimule leur croissance dans un milieu dépourvu d'androgènes, et augmente leur sensibilité aux androgènes (Lee et al., 2008). De plus, il a été montré une augmentation de IL-4 et IGF-1 dans le sérum des patients ayant un cancer prostatique récurent (Wise et al., 2000; Wu et al., 2006).

Tout comme certains facteurs de croissance et cytokines, **HER-2/neu**, un membre de la famille des récepteurs à l'EGF a un rôle dans la résistance des cancers de la prostate. Il est surexprimé dans les cancers résistants et les lignées cellulaires androgéno-indépendantes (Craft et al., 1999; Osman et al., 2001; Shi et al., 2004). Sa surexpression dans les lignées hormonosensibles leur confère une androgéno-indépendance *in vitro* et *in vivo* dans les souris castrées (Craft et al., 1999). Son action sur la transactivation du RA est synergique avec de faibles concentrations en androgènes mais n'est pas bloquée par le bicalutamide, donc l'activation du RA par HER-2/neu ne passe pas par le domaine de liaison du ligand contrairement aux facteurs de croissance.
Deux voies de signalisation intracellulaire médient l'activation du RA par HER-2/neu : la voie des MAP kinases et Akt (Wen et al., 2000; Yeh et al., 1999; Zhou et al., 2000).

5.1.4. Modification des co-régulateurs du RA

Un grand nombre de coactivateurs et corépresseurs impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du RA a été identifié (Heinlein and Chang, 2002). Des altérations dans la balance entre coactivateurs et corépresseurs peuvent influencer l'activation du RE dans le cancer du sein et ainsi moduler l'efficacité des traitements (Feldman and Feldman, 2001). Concernant le RA, il a été montré que des **coactivateurs** tels que Cdc25, SRC-1, TIF2 et CBP, sont surexprimés dans les cancers prostatiques avancés et androgéno-indépendants (Comuzzi et al., 2004; Fujimoto et al., 2001; Gregory et al., 2001; Ngan et al., 2003). De plus, la surexpression des co-régulateurs TIF2 et SRC-1 permet l'activation du RA par des androgènes de faible affinité (DHEA, œstradiol, androstenedione, progestérone) et la co-transfection de ARA70 et RA dans la lignée DU145 transforme les anti-androgènes en agonistes (Gregory et al., 2001; Miyamoto et al., 1998). Gregory *et al* suggèrent que la plupart des cancers prostatiques récurrents surexpriment des coactivateurs qui facilitent la transactivation du RA et potentialisent la réponse aux faibles taux d'androgènes (Gregory et al., 2001). Ainsi, la combinaison de plusieurs mécanismes comme les mutations du RA et la surexpression des coactivateurs, associée à l'hypersensibilité du récepteur, contribuent probablement à l'androgéno-résistance des cancers prostatiques.
Outre les co-régulateurs, les **molécules chaperonnes** peuvent interagir avec les récepteurs stéroïdes en contribuant soit à leur liaison avec l'hormone, soit à leur interaction sur l'élément de réponse aux hormones des promoteurs des gènes cibles. Les molécules chaperonnes ont aussi un rôle de remodelage de la chromatine via la modification des histones. Récemment, la nucléophosmine, une protéine chaperonne d'histone, a été identifiée comme interagissant

avec le RA sur les ARE du gène PSA (Leotoing et al., 2008). La nucléophosmine participe à la régulation des fonctions du RA car son inhibition diminue la transcription de gènes contenant des ARE. Or, la nucléophosmine étant surexprimée dans les tissus prostatiques cancéreux, elle pourrait contribuer à l'altération des fonctions du RA dans le cancer de la prostate (Leotoing et al., 2008; Subong et al., 1999).

5.2. Voies alternatives de survie

La voie de signalisation du RA peut-être contournée de sorte que les cellules prostatiques cancéreuses développent des voies de survie indépendantes de l'activation du RA. Le mécanisme le plus connu implique la modulation de l'apoptose. Dans les cellules androgéno-dépendantes, l'activation du RA stimule la prolifération cellulaire et la privation androgénique induit l'apoptose des cellules. Les cellules de cancer de prostate androgéno-indépendantes montrent souvent une surexpression des **molécules anti-apoptotiques** (O'Kane et al., 2006). La protéine Bcl-2 n'est pas exprimée dans l'épithélium prostatique normal mais est exprimée dans les PIN et les différents degrés de cancers prostatiques (Colombel et al., 1993). Il a été montré que son expression est corrélée avec le grade du cancer. L'expression de Bcl-2 n'est néanmoins pas requise dans tous les cancers androgéno-indépendants.

Un autre mécanisme développé par les cellules prostatiques cancéreuses est la **différenciation neuroendocrine**. En effet, la population de cellules qui acquièrent le phénotype et les marqueurs de cellules neuroendocrines augmente et est corrélée avec la progression tumorale, un pronostic faible et le stade androgéno-indépendant (Liao et al., 2007; Yuan et al., 2007). Dans la prostate normale, les cellules neuroendocrines sont impliquées dans la régulation de la croissance et la différenciation des cellules épithéliales de manière androgéno-indépendante. Elles sécrètent une variété de neuropeptides à effets mitogèniques sur les cellules épithéliales adjacentes qui pourraient contribuer à la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses en situation de privation androgénique.

La voie de signalisation de l'activation de **Akt**, ou l'inactivation de **PTEN**, est un moyen pour la cellule cancéreuse d'échapper à l'apoptose dans un milieu dépourvu en androgènes et est activée entre autres par l'IGFR et HER-2/neu. Comme décrit dans la figure, Akt ou protéine kinase B, est activée par la production de PIP3 lui-même activé par la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). Les cibles d'Akt sont impliquées dans la régulation de la prolifération, du métabolisme et de l'apoptose. Le niveau d'Akt activé est très élevé dans les cancers prostatiques récurrents (Ayala et al., 2004). La privation androgénique renforce la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose induite par les agents chimio-thérapeutiques via

l'activation d'Akt (Lee et al., 2004; Pfeil et al., 2004). PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) régule négativement la voie d'activation de Akt. PTEN est un gène suppresseur de tumeur délété dans 23% des PIN de haut grade et dans 70% des cancers prostatiques primaires (Yoshimoto et al., 2006). Son invalidation chez la souris résulte en la formation de cancers prostatiques métastatiques (Ma et al., 2005; Wang et al., 2003). Il a été montré que PTEN interagit directement avec le RA, inhibant sa translocation nucléaire et favorisant sa dégradation alors qu'Akt est impliqué dans la phosphorylation du RA et de ces cofacteurs (Fan et al., 2007; Lin et al., 2004).

5.3. Cellules souches

Craft *et al* ont suggéré que les cancers prostatiques contiennent une population hétérogène de cellules dont l'androgéno-sensibilité varie (Craft et al., 1999). Le traitement hormonal exerçant une pression de sélection altère la composition en cellules des tumeurs pour favoriser la prolifération des cellules androgéno-indépendantes. Les auteurs ont montré l'expansion clonale de cellules androgéno-indépendantes à partir d'une cellule par 10^5-10^6 cellules androgéno-dépendantes.

Il semblerait que les cellules androgéno-indépendantes présentes dans les cancers prostatiques soient en fait des cellules souches basales rares, responsables du maintient de la tumeur (Collins et al., 2005). Une sous-population de cellules a été identifiée à partir de tumeurs prostatiques humaines ayant des marqueurs spécifiques et représentant 0,1% des tumeurs. Elles sont capables de s'auto-renouveler et de générer des populations cellulaires à phénotype hétérogène, dont le phénotype épithélial sécrétoire (exprimant le RA et la phosphatase acide prostatiques). Elles pourraient donc correspondre à cette population de cellules souches cancéreuses dans les tumeurs prostatiques.

5.4. Rôle des œstrogènes et des RE

Chez le rongeur, l'action combinée de la testostérone et de l'œstradiol provoque l'apparition de cancer prostatique alors que l'invalidation du gène de l'aromatase chez la souris, induisant un taux élevé de testostérone et un déficit en œstradiol, ne provoque pas de cancer de prostate (Ellem and Risbridger, 2007). Chez l'homme, des études épidémiologiques ont montré que les Afro-Américains ont un niveau sérique en œstradiol plus élevé (corrélé à un taux de cancers prostatiques plus élevé) que les Américains Caucasiens à testostéronémie égale.

Les taux d'androgènes et œstrogènes intra-prostatiques diffèrent des taux sériques et dépendent de l'expression et de l'activité des enzymes de synthèse des stéroïdes. L'aromatase

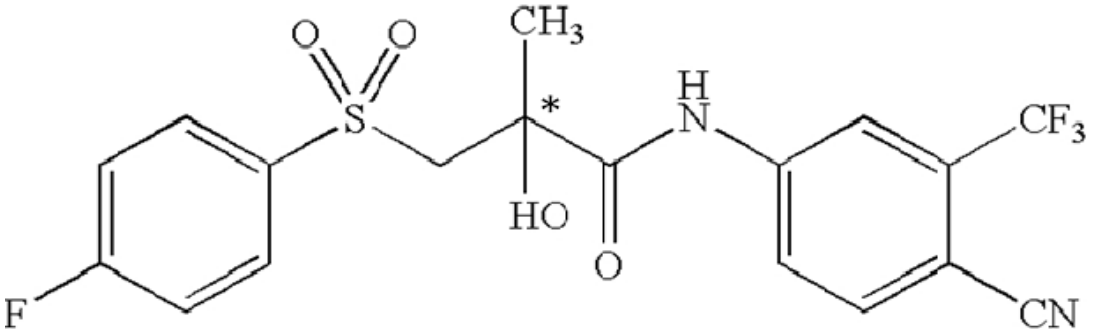


Figure 18 – Structure chimique du bicalutamide
***: position du centre chiral**

dont l'expression est localisée aux cellules stromales dans la prostate normale s'étend aux cellules épithéliales cancéreuses prostatiques (Ellem et al., 2004). Cette enzyme qui transforme la testostérone et l'androstenedione en œstradiol, induit probablement une augmentation locale en œstradiol participant au développement et à la progression du cancer prostatique.

L'effet carcinogène des œstrogènes sur la prostate serait médié par le REα alors que le REβ est associé à un effet antiprolifératif et pro-apoptotique. Néanmoins, si l'expression de REβ disparaît dans les PIN et les cancers prostatiques de haut grade, il réapparaît dans les métastases lymphatiques et osseuses lui suggérant un rôle dans l'invasion métastatique (Ellem and Risbridger, 2007).

Pandani *et al* ont montré que l'œstradiol via ces deux récepteurs induit l'expression de IGF-RI dans les lignées LNCaP et PC3 (Pandini et al., 2007). Cette activation semble passer par la voie non-génomique des RE car leur liaison à l'ADN n'est pas requise alors que la cascade impliquant Src et les MAP kinases est activée. Les auteurs ont donc montré que les œstrogènes contribuent au dérèglement du système IGF dans le cancer de la prostate.

6. L'utilisation du bicalutamide dans le cancer de la prostate

6.1. Etudes pharmacocinétiques chez le rat et l'homme

Le bicalutamide est un anti-androgène non stéroïdien (figure 18) comme le flutamide et le nilutamide. Contrairement aux anti-androgènes stéroïdiens comme le cyprotérone acétate, il se lie exclusivement au RA et est dépourvu d'activité anti-gonadotropique et anti-œstrogénique ce qui représente donc un avantage en terme de spécificité.

La molécule de bicalutamide a un poids moléculaire de 430,38 g/mol et contient un centre asymétrique. C'est l'énantiomère R du bicalutamide, ayant une affinité 30 fois supérieure à l'énantiomère S pour le RA, qui est responsable de son activité anti-androgénique.

Il se lie au RA avec une moindre affinité que la DHT, mais avec 2 à 4 fois plus d'affinité que l'hydroxyflutamide, le métabolite actif du flutamide.

Concentrations plasmatiques

Chez l'homme, les études pharmacocinétiques montrent qu'avec une administration quotidienne de bicalutamide la concentration plasmatique augmente dans le temps jusqu'à atteindre un plateau à 1 mois de traitement. La valeur constante mesurée à ce plateau est environ 10 fois supérieure à celle d'une seule dose. Selon Tyrrell *et al*, la proportionnalité

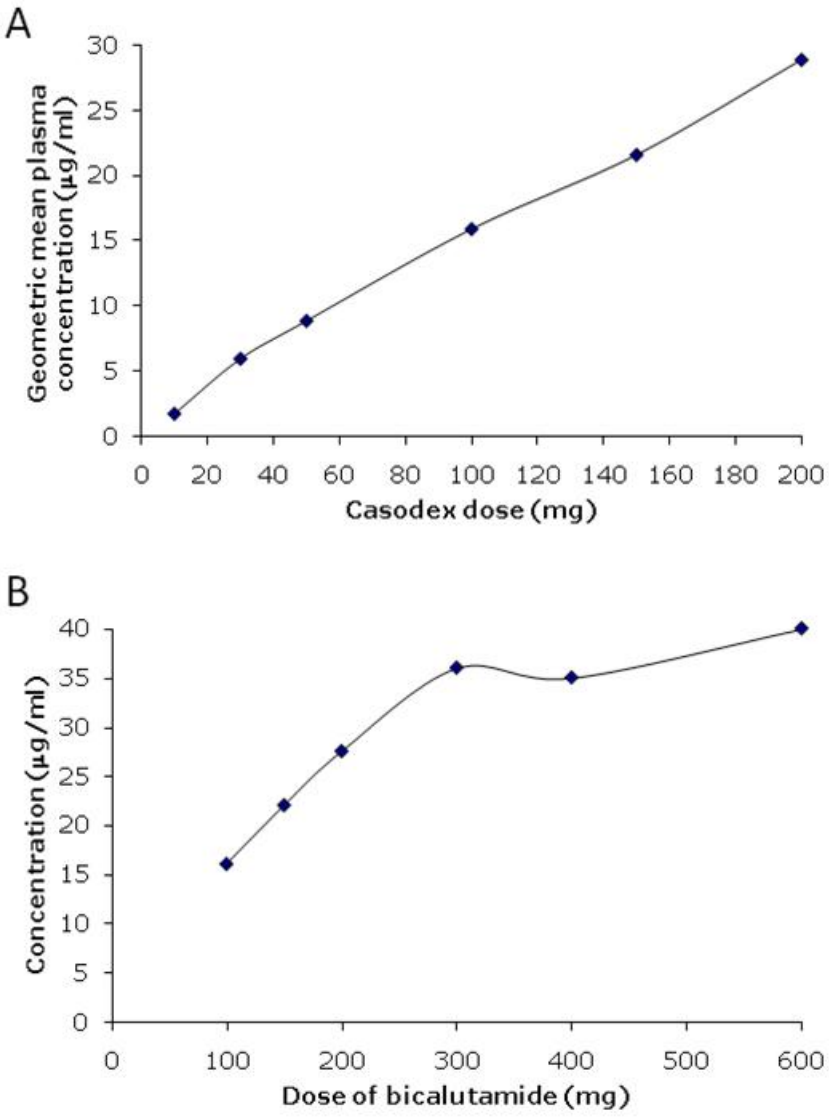


Figure 19 – Concentrations plasmatiques de bicalutamide en fonction de la dose administrée.
A. D'après Tyrrell *et al.* 1998
B. D'après Kolvenbag *et al.* 1998

entre la dose et la concentration plasmatique mesurée à ce plateau est linéaire pour des doses de 10 à 50 mg/j (figure 19A) (Tyrrell et al., 1998). Une deuxième étude faite sur une plus large gamme de doses a montré que la corrélation est linéaire jusqu'à la dose de 300 mg/j puis la concentration plasmatique en bicalutamide n'augmente plus et stagne de 300 à 600 mg/j (figure 19B) (Kolvenbag et al., 1998).

Chez le rat, l'assimilation du bicalutamide est beaucoup plus faible. Les concentrations plasmatiques correspondant à une seule dose de bicalutamide et à six mois de traitement sont égales (Cockshott 1991). Ceci est dû entre autre à une différence d'élimination, la demi-vie du bicalutamide étant de 1 jour chez le rat et de 6 jours chez l'homme.

Pour comparaison, une administration quotidienne sur plusieurs mois de 150 mg de bicalutamide chez l'homme, correspondant à une dose 2,1 mg/kg (basée sur le poids moyen d'un homme de 70 kg), équivaut à une concentration plasmatique de 21,6 mg/ml. Chez le rat, une administration quotidienne sur plusieurs mois de 10 mg/kg correspond à une concentration plasmatique de 3 µg/ml de bicalutamide.

Effets du bicalutamide sur le système central

L'administration de bicalutamide empêche le rétrocontrôle de la testostérone au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les études cliniques effectuées chez l'homme ont montré que les taux sérique de LH, FSH, testostérone et œstradiol sont augmentés quelque soit la dose de bicalutamide testée (Cockshott, 2004; Tyrrell et al., 1998). Donc, chez l'homme, le bicalutamide peut bloquer le rétrocontrôle négatif de la testostérone en se fixant sur les récepteurs aux androgènes au niveau central.

Chez le rat, les modifications hormonales de LH et testostérone varient suivant la dose de bicalutamide et le mode d'administration utilisé (Iswaran et al., 1997).

Effets du bicalutamide sur les organes androgéno-dépendants

En raison de la difficulté à obtenir des échantillons humains, les observations de l'effet du bicalutamide sur les testicules ont été effectuées sur des effectifs réduits. L'administration de bicalutamide à 50 mg/j ne semble pas causer de changement majeur dans les testicules humains au niveau de la morphologie, ni au niveau de la maturité du sperme (Jones et al., 1994; Morgante et al., 2001). Néanmoins, il semble induire une augmentation modérée du tissu fibreux entre les tubules, ainsi qu'une hyperplasie des cellules de Leydig (Bjerklund Johansen et al., 1994).

Le modèle des rongeurs permet de faire des analyses de cinétiques et de doses du bicalutamide sur les organes androgéno-dépendants. Tout d'abord, le bicalutamide semble induire une hyperplasie des cellules de Leydig dans les testicules de rat dès la dose de 5 mg/kg/j alors que leurs poids semblent être diminués qu'à partir de 10 mg/kg/j (Iswaran et al., 1997). Par contre, les poids de la prostate ventrale et des vésicules séminales chez le rat sont diminués dès la dose de 1 mg/kg/j (Zaccheo et al., 2000). Chez la souris, seules les vésicules séminales voient leur poids diminué par le bicalutamide à partir de la dose de 1 mg/kg/j (à 3 semaines de traitement) (Broulik and Starka, 1997; Skarda, 2003).
Cette diminution du poids est mise en relation d'une part avec de l'apoptose induite par le bicalutamide dans la prostate normale de rat (dès 6 heures de traitement à 10 mg/kg/j, avec un pic d'apoptose à 5 jours) et d'autre part, avec une diminution de l'angiogenèse (à 25 mg/kg/j) (Kaya et al., 2005; Nickerson and Pollak, 1999).

6.2. Utilisation médicale et études cliniques

Lorsque le cancer de la prostate n'a pas pu être traité au stade localisé, son évolution est lente mais inexorable vers le stade métastasique. Pour prévenir ou traiter ses complications, le principal traitement disponible aujourd'hui reste l'hormonothérapie. C'est dans ce contexte que le bicalutamide est produit par la société pharmaceutique AstraZeneca sous le nom de Casodex®. Il est couramment utilisé en combinaison avec d'autres traitements comme les analogues de la LH-RH afin d'obtenir un blocage androgénique complet empêchant ainsi l'action des androgènes d'origine surrénalienne (Labrie et al., 1982). Plusieurs études prospectives, randomisées et méta-analyses ont montré une prolongation de la survie des cancers de la prostate métastatiques de trois à six mois. Dans le cadre du BAC, le bicalutamide est utilisé à 50 mg/j. Il a reçu également une autorisation de mise sur le marché à 150 mg/j pour être utilisé seul dans certaines conditions.

Etudes cliniques du bicalutamide en monothérapie

L'idée d'utiliser le bicalutamide en monothérapie s'est progressivement faite jour dans l'espoir de diminuer au moins partiellement les effets secondaires de l'hormonothérapie du BAC.
Parmi les études prospectives utilisant le bicalutamide à 50 mg/j sur des patients ayant un cancer de la prostate localement avancé, deux sur trois ont montré une **survie significativement plus faible** des patients traités au bicalutamide par rapport à la castration

(médicale ou chirurgicale) (Bales and Chodak, 1996; Iversen et al., 1996; Kaisary et al., 1995). Par contre, le bicalutamide permet une meilleure qualité de vie et un meilleur maintien de l'activité sexuelle.

Il a ensuite été proposé d'augmenter les doses de bicalutamide à 150 mg/j en monothérapie pour en améliorer l'effet. Les deux études réalisées dans ce sens ne montrent **pas de différence de survie globale** par rapport à la castration, tout en gardant les bénéfices en termes de qualité de vie sur des patients ayant un cancer de la prostate localement avancé (Iversen et al., 2000; Tyrrell et al., 1998).

Une étude récente réalisée sur 8113 patients a évalué le traitement au bicalutamide à 150 mg/j à des patients ayant un cancer prostatique localement avancé, sur un suivi médian de 7,4 ans par rapport à un groupe placebo, et a montré :

-**aucune différence en survie globale**, mais une diminution du risque de progression ;

-un **bénéfice de survie globale en adjuvant à la radiothérapie** ;

-un **bénéfice de survie sans progression clinique en adjuvant à la prostatectomie radicale** (Fourcade et al., 2007).

Par contre, le traitement par bicalutamide à 150 mg/j seul, de patients ayant un cancer prostatique localisé, **la survie est réduite** en comparaison aux patients traités par placebo (McLeod et al., 2006; Wirth et al., 2004).

6.3. Interactions avec le RA

Le bicalutamide est considéré comme un anti-androgène pur. En se fixant au RA des cellules épithéliales prostatiques, le bicalutamide inhibe son activité transcriptionnelle et donc empêche l'action de la DHT.

6.3.1. Effet du bicalutamide sur la conformation du RA

Les changements de conformation du RA induit par la liaison de la DHT ou du bicalutamide ont été analysés par digestion limitée par la trypsine et montrent que les fragments résistants à la protéolyse partielle sont de tailles différentes (Kuil et al., 1995). L'incubation de la DHT avec RA résulte en un fragment initial de 35 KDa et une heure après résulte en un fragment de 29 KDa. Le fragment issu de la liaison du bicalutamide au RA est de 35 KDa même une heure après l'incubation. Les auteurs proposent le modèle séquentiel d'activation du RA suivant : la DHT se lie au complexe RA-protéines Hsp et induit un premier changement de conformation (fragment de 35 KDa) ; il s'en suit une dissociation des protéines Hsp et un deuxième changement de conformation (fragment de 29 KDa) qui correspond au RA actif. Le mode

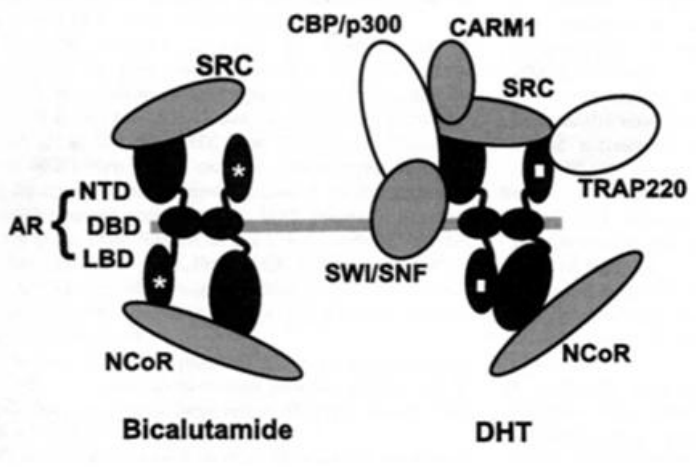


Figure 20 – Modèle d'interaction du récepteur aux androgènes (AR) avec les coactivateurs et corépresseurs en réponse à la liaison à la DHT et au bicalutamide (d'après Hodgson et al. 2007).
Les domaines du AR (NTD: N-terminal, DBD : liaison à l'ADN, LBD : liaison au ligand) sont représentés. En présence de bicalutamide (à gauche, astérisk), il n'y a pas d'interaction NH2/COOH-terminale et NCoR peut se lier aux extrémités NH2 et COOH-terminale. SRC-1 peut aussi interagir avec le NTD du RA lié au bicalutamide mais est incapable de recruter des coactivateurs supplémentaires. En présence de DHT (à droite), le RA peut recruter les protéines SRC, les coactivateurs supplémentaires et les complexes de remodelage de la chromatine. Ces interactions peuvent être médiées directement par le LBD et/ou par le changement conformationnel dans le NTD suite à l'interaction des extrémités NH2/COOH-terminales. NCoR peut toujours interagir faiblement avec le NTD et réprimer l'activité transcriptionnelle, mais sa liaison n'est pas stabilisée avec le LBD.

d'action du bicalutamide se fait par l'inhibition du deuxième changement de conformation, suggérant qu'il empêche la dissociation des protéines Hsp. Notons que le bicalutamide a la même action antagoniste et les mêmes changements de conformation pour les RA « sauvage » et muté des LNCaP, contrairement au flutamide qui est antagoniste du RA sauvage (fragment de 35 KDa et inhibition de la transcription) mais agoniste du RA muté des LNCaP (fragment de 29 KDa et activation de la transcription).

6.3.2. Effet du bicalutamide sur la localisation du RA

On pensait au début que le bicalutamide exerçait sa fonction d'antagoniste en bloquant la translocation nucléaire du RA ou sa fixation à l'ADN (Berrevoets et al., 1993; Veldscholte et al., 1992b). A présent, de nombreux travaux ont montré que le bicalutamide entraîne une translocation nucléaire du RA (sauvage ou muté des LNCaP) (Marcelli et al., 2006; Masiello et al., 2002; Tyagi et al., 2000; Waller et al., 2000). Contrairement à la DHT qui induit une distribution nucléaire punctiforme du RA, le bicalutamide induit une répartition homogène du RA dans le noyau. Bien qu'il n'active pas la transcription du gène PSA, le bicalutamide entraîne la fixation du RA sur l'ADN sur les ARE du promoteur du gène (Chen et al., 2004; Klokk et al., 2007; Masiello et al., 2002).

6.3.3. Effet du bicalutamide sur le complexe de transcription du RA

Si l'activité antagoniste du bicalutamide est bien connue, la façon dont il intervient dans la voie de signalisation du RA est moins claire. Différentes études ont analysé les cofacteurs recrutés par le complexe de transcription du RA. L'hypothèse est de savoir si le bicalutamide inhibe le recrutement de coactivateurs sur le complexe de transcription ou s'il induit le recrutement de corépresseurs. Pour Masiello *et al* ce sont les coactivateurs, SRC-1 et 2 nécessaires à l'activité transcriptionnelle du RA, qui ne sont pas recrutés par le complexe RA-bicalutamide et donc responsables de son activité antagoniste (Masiello et al., 2002). D'autres travaux ont montré que le complexe de transcription RA-bicalutamide est inhibé par le recrutement des corépresseurs NcoR, SMRT, HDAC1 et 2 (Shang et al., 2002).

En tout cas, il y a un consensus sur le fait que le bicalutamide ne permet pas la formation d'un complexe transcriptionnel actif. Néanmoins, Hodgson *et al* ont récemment montré que si le complexe RA-bicalutamide n'était pas activé par SRC-1, il pouvait interagir avec lui via son extrémité NH2-terminale émettant l'hypothèse d'un mécanisme potentiel de résistance du bicalutamide par ce biais (Hodgson et al., 2007) (figure 20).

6.4. Effet du bicalutamide sur les cellules épithéliales prostatiques cancéreuses

L'effet d'un anti-androgène se répercute sur plusieurs mécanismes cellulaires liés entre autres à la prolifération, apoptose et angiogenèse, aboutissant à la régression de la prostate.

6.4.1. La croissance

La croissance des cellules épithéliales prostatiques sécrétoires dépend des androgènes, donc l'effet premier de l'action du bicalutamide sur ces cellules est l'inhibition de leur prolifération.

Le bicalutamide inhibe la croissance des cellules cancéreuses prostatiques hormonosensibles, dont les LNCaP qui possèdent un RA muté (Berrevoets et al., 1993; Veldscholte et al., 1992a). De même, les cellules hormono-résistantes, DU145 et PC3, transfectées avec le RA retrouvent leur hormonosensibilité et sont inhibées par le bicalutamide, montrant que cet effet passe bien par le RA (Festuccia et al., 2005), Kizu 2004). Cette inhibition de croissance s'accompagne d'une inhibition de l'activité de transcription du RA sur le promoteur de certains gènes comme le PSA. De même, le bicalutamide inhibe l'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire, Cdc6 et les cyclines A et B, ce qui a pour conséquence le blocage des cellules en phase G1 (Bai et al., 2005; Zhan et al., 2002).

La concentration du bicalutamide inhibant la prolifération cellulaire de 50% (IC_{50}) varie selon les conditions d'expérimentation des auteurs. Par exemple, Bouchal *et al* qui cultivent les LNCaP dans un milieu dépourvu d'androgènes, obtiennent une IC_{50} de 40 μM à 3 jours de traitement, tandis que Zhan *et al* qui utilisent un milieu supplémenté avec 1nM de testostérone obtiennent une IC_{50} de 100 μM à 2 jours (Bouchal et al., 2005; Zhan et al., 2002). La présence des androgènes dans le milieu protège donc les cellules de l'action du bicalutamide.

6.4.2. L'apoptose

Le bicalutamide induit la fragmentation de l'ADN dans les cellules LNCaP (Zhan et al., 2002). Une réduction du potentiel membranaire mitochondrial est observée en parallèle à cette fragmentation seulement quand les cellules sont cultivées dans un milieu sans sérum (Lee et al., 2003). Le bicalutamide induit l'activation des caspases 8 et 3 et la surexpression de Bcl-2 dans les cellules LNCaP n'atténue pas l'apoptose induite par le bicalutamide. La voie mitochondriale ne semble pas impliquée dans l'apoptose induite par le bicalutamide dans les cellules LNCaP qu'on peut alors classer comme appartenant aux cellules de type I où l'apoptose s'effectue principalement par la voie des récepteurs de mort (cf chapitre II) (Lee et al., 2003).

Enfin, l'expression d'un certain nombre de gènes en relation avec l'apoptose est modifiée par le bicalutamide. L'expression des gènes pro-apoptotiques comme DR4, Bax et p53 est stimulée tandis que l'expression de gènes anti-apoptotiques comme la survivine est diminuée (Bouchal et al., 2005). Enfin, selon les publications, le bicalutamide inhibe parfois l'expression du RA ou non, résultats probablement reliés aux conditions d'expérimentations (Bouchal et al., 2005; Bouchal et al., 2002; Festuccia et al., 2005).

6.4.3. Les tumeurs prostatiques : modèles expérimentaux

Chez le rat, il existe un bon modèle de carcinome prostatique, les R3327 Dunning, qui forment des tumeurs sous-cutanées hormonosensibles. Le bicalutamide induit une inhibition de la croissance de ces tumeurs de 45% dès la dose de 1 mg/kg/j en 9 semaines de traitement.

6.5. Action agoniste du Bicalutamide

6.5.1. Syndrome de retrait des anti-androgènes

Dans une période de 18 mois en moyenne suivant l'instauration d'une hormonothérapie, la maladie évolue progressivement malgré la mise en place du traitement ; le cancer arrive à un stade d'échappement hormonal. Il y a même parfois une inversion de réponse de la tumeur au traitement qui est souvent un BAC, et qui stimule alors la croissance tumorale. Suite au retrait du médicament mis en cause, observé avec le bicalutamide entre autres, une amélioration de la maladie est observée durant 6 mois, c'est « le syndrome de retrait des anti-androgènes » (Boccon-Gibod, 1996; Nieh, 1995; Weldon et al., 1997). Suite à ces observations cliniques, de nombreuses études scientifiques sont parues ces dix dernières années analysant les différents mécanismes qui pourraient être impliqués dans cet effet.

6.5.2. Mutations du RA

Les mutations du RA dans les cancers prostatiques sont estimées à 10% des cas pour lesquels le syndrome de retrait des anti-androgènes est observé (Taplin et al., 2003). Ces mutations sont toujours localisées au niveau du site de liaison du ligand. Parmi celles qui sont corrélées à un traitement au bicalutamide, la mutation W741C qui a été décrite plusieurs fois dont une métastase de cancer prostatique au foie (Haapala et al., 2001; Yoshida et al., 2005). Les cellules issues de cette tumeur, appelées KUCaP, ont toujours une dépendance aux androgènes car la castration inhibe leur croissance, mais le bicalutamide stimule leur prolifération.

L'étude de Hara *et al* a démontré la corrélation entre les mutations observées et le traitement au bicalutamide (Hara et al., 2003). Les auteurs ont cultivé des cellules LNCaP à long terme dans un milieu dépourvu d'androgènes, en présence de bicalutamide dans le but de mimer le BAC. Ces cellules qui prolifèrent à partir de 13 semaines de culture ne présentent pas de variation d'expression du RA mais ont acquis la mutation W741C (en plus de la T877A) et le bicalutamide stimule leur croissance.

6.5.3. Surexpression du RA

La surexpression du RA est un mécanisme de résistance à la privation androgénique très fréquent observé *in vitro* et *in vivo*. Une étude comparant sept tumeurs hormonosensibles différentes greffées dans des souris castrées a montré qu'elles surexpriment toutes le RA par rapport aux lignées cellulaires initiales (Chen et al., 2004).

Afin de se rapprocher des conditions cliniques de l'hormonothérapie, Culig *et al* ont cultivées des cellules LNCaP dans un milieu dépourvu d'androgènes (Culig et al., 1999). Dans un premier temps, les cellules ne prolifèrent pas jusqu'au moment où elles s'adaptent au milieu. Dans ces cellules, l'expression du RA est augmentée, et son activité transcriptionnelle est stimulée par le bicalutamide. De même pour la croissance de ces cellules, elles présentent un profil opposé aux cellules parentales : leur croissance est inhibée par le R1881 et stimulée par le bicalutamide.

L'expérience inverse qui consiste à surexprimer le RA dans des cellules hormonodépendantes montre que la concentration en R1881 qui stimule la croissance cellulaire est beaucoup plus faible (0,01 nM au lieu de 0,1 nM) et qu'elles sont devenues résistantes à l'action anti-androgénique du bicalutamide qui stimule même l'expression du PSA (Chen et al., 2004).

Ces résultats suggèrent qu'une forte expression en RA confère aux cellules une résistance à l'anti-androgène bicalutamide qui dans certains cas agit même comme agoniste.

6.5.4. Altérations des cofacteurs du RA

L'analyse du complexe de transcription du RA sur les promoteurs du PSA et de KLK2 dans les LNCaP surexprimant le AR a montré que le bicalutamide induit le même profil de recrutement de cofacteurs que le R1881 c'est-à-dire : le RA, le coactivateur SRC-1 et la polymérase II. Dans les cellules LNCaP normales, le bicalutamide induit le recrutement du RA et du corépresseur NCoR mais pas de SRC-1, ni de la polymérase II (Chen et al., 2004). La surexpression du RA semble donc modifier l'assemblage des cofacteurs du RA de sorte que le bicalutamide devient agoniste quant à l'activité transcriptionnelle du RA. Hodgson *et*

al suggère que l'activité agoniste du bicalutamide nécessite d'avantage l'interaction du coactivateur SRC-1 plutôt que la perte du corépresseur NCoR (Hodgson et al., 2007).

6.5.5. Autres voies d'activation du RA

Le bicalutamide peut avoir une action agoniste à faible concentration (1 nM) et antagoniste à forte concentration (10 μM) sur la phosphorylation de la protéine ERK-1/2, de la voie des MAP Kinases (voie non génomique du RA). Cette voie est normalement stimulée par la DHT dans les cellules LNCaP hormonosensibles, mais activée constitutivement dans les LNCaP androgéno-indépendantes (Unni et al., 2004).

Le traitement au bicalutamide semble stimuler deux autres voies de signalisation interagissant avec le RA : la voie PTEN/Akt impliquée dans les signaux d'apoptose/survie cellulaire et la voie EGFR/Her-2 impliquée dans la prolifération et l'invasion cellulaire (Festuccia et al., 2005; Gravina et al., 2007; Osman et al., 2001). Festuccia *et al* ont pu analysés des cancers de prostate de patients traités 120 jours en monothérapie au bicalutamide 150 mg/j avant prostatectomie radicale (Festuccia et al., 2005). Les auteurs ont montré une diminution de l'expression de PTEN, une stimulation de la phosphorylation d'Akt et de l'expression d'EGFR et Her-2 dans ces cancers. Ces résultats montrent que le bicalutamide entraîne une activation de différentes voies de signalisation qui interagissent avec le RA et dont l'activation constitutive permet l'adaptation des cellules cancéreuses à la privation androgénique.

III. Les modèles expérimentaux du cancer de la prostate

1. Les lignées cellulaires

L'utilisation des lignées cellulaires présente l'avantage de contrôler le milieu de culture et d'analyser des paramètres précis contrairement aux modèles animaux où de nombreux facteurs peuvent interagir.

Les trois lignées cellulaires les plus utilisées sont les DU145, les PC3 et les LNCaP, issues de métastases de cancers prostatiques au cerveau, os et ganglions lymphatiques respectivement (Sobel and Sadar, 2005a). Les DU145 et les PC3 n'expriment pas le RA, ni le PSA, et leur croissance est indépendante de la concentration en androgènes. Contrairement aux PC3, les

cellules DU145 n'expriment pas le gène *Pten*, donc Akt est constitutivement activée ce qui confère aux cellules une résistance aux chimiothérapies (Reinhold et al., 2003). Elles sont souvent utilisées pour étudier le caractère androgéno-résistant des cancers prostatiques. Ces lignées sont hautement tumorigéniques ; leur inoculation *in vivo* dans des souris nude ne nécessite pas la présence de matrigel contrairement aux cellules LNCaP. De façon intéressante, il a été montré que la transfection de ces cellules avec le RA leur confère une androgéno-sensibilité et diminue leur agressivité (Bonaccorsi et al., 2004; Bonaccorsi et al., 2006; Marcelli et al., 1995; Shen et al., 2000; Xu et al., 2006).

Les cellules LNCaP sont des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-sensibles (Horoszewicz et al., 1983). Leur RA est muté en T877A résultant vraisemblablement du traitement au flutamide du patient dont les cellules sont issues (Taplin et al., 1995; Veldscholte et al., 1992a; Veldscholte et al., 1990). Par rapport au RA sauvage, cette mutation a pour conséquences l'activation du RA et la stimulation de la croissance cellulaire par le flutamide, le cyprotérone acétate et l'œstradiol, en plus des androgènes (Sun et al., 2006; Taplin et al., 1995; Veldscholte et al., 1992a). Les cellules LNCaP n'expriment pas le gène *Pten*, donc Akt est constitutivement activée. De nombreuses lignées sont issues des cellules LNCaP pour étudier différents mécanismes comme l'androgéno-indépendance, la neurodifférenciation, les métastases.

D'autres lignées cellulaires existent issues des modèles animaux de rat, souris et de xénogreffes de tumeurs humaines (Bostwick et al., 2004; Sobel and Sadar, 2005a; Sobel and Sadar, 2005b).

2. Les modèles animaux

Les modèles *in vivo* sont essentiels à l'étude des tumeurs car ils prennent en compte des caractéristiques physiologiques importantes comme la structure tridimensionnelle, l'angiogenèse et les interactions avec les cellules stromales. Ces facteurs influencent le développement et la croissance tumorale. De plus, certains modèles *in vivo* permettent d'étudier le processus métastatique, particulièrement important dans le cancer de la prostate.

Deux types de modèles animaux existent pour l'étude du cancer de la prostate : les animaux développant des cancers prostatiques plus ou moins spontanément suite à des altérations génétiques ou chimiques, et les animaux servant d'hôte pour des greffes de tumeurs humaines (xénogreffes).

2.1.Les modèles animaux existants

Un grand nombre de modèles animaux existent qui donnent lieu à des cancers prostatiques spontanés ou induits, avec pour chacun des avantages et inconvénients.

2.1.1. Chez le rat

Il existe un dizaine de modèles de rat pour étudier le cancer de la prostate (Bostwick et al., 2004). Parmi ces modèles, on peut citer le modèle **Lobund-Wistar** de rat qui présente des similitudes avec le cancer de la prostate humain. Les rats développent des cancers prostatiques spontanés avec l'âge dans 26% des cas (pour des rats de 26 mois). Ils métastasent dans les os et sont sous influence hormonale. Les tumeurs sont des adénocarcinomes dont l'histologie est identique à l'humain. L'incidence tumorale peut-être augmentée jusqu'à 90% après traitement au méthyl-nitrosourea et à la testostérone. Ce modèle a été utilisé entre autres pour étudier l'effet de certains aliments sur le cancer de la prostate.

Le **modèle R-3327 Dunning** de rat développe un adénocarcinome prostatique spontané androgéno-sensible, qui a la même histologie que le cancer prostatique humain. Les tumeurs possèdent une activité de 5α-réductase et ont des récepteurs aux androgènes et à la LH-RH. Ces rats ont été beaucoup utilisés pour étudier l'effet de divers traitements hormonaux, chimio-thérapeutiques, ou combinés à d'autres traitements comme la radiothérapie.

Le **modèle Noble** de rat est l'unique modèle à développer sous l'action des œstrogènes des cancers de la prostate et du sein. Spontanément, il développe très peu de cancer prostatique mais le traitement simultané de la testostérone et l'œstradiol augmente l'incidence tumorale à 73% à 18 mois, et 100% en fin de vie. De façon intéressante, ce traitement induit aussi des dysplasies similaires au PIN chez l'homme. On peut noter que les expressions des RE ne sont pas altérées dans les dysplasies alors que le récepteur à la progestérone est augmenté, suggérant une action des œstrogènes via le RP (Lau et al., 1998).

2.1.2. Chez la souris

Naturellement, les souris ne développent pas de pathologie bénigne ou maligne de la prostate. Il a donc fallu créer des **souris transgéniques** mimant la progression naturelle du cancer de la prostate humain. A présent, deux stratégies de modifications génétiques sont utilisées pour générer ces modèles : la surexpression et l'inhibition de gènes.

2.1.2.1.Les modèles murins issus de la surexpression de gènes

Nous évoquerons les modèles de souris dont le gène surexprimé est conduit par un promoteur spécifique à la prostate. Le promoteur du gène de la probasine est souvent utilisé car il est spécifique des cellules épithéliales prostatiques de rat et régulé par les androgènes (Zhang et al., 2000).

Un des premiers modèles créé fut le modèle **TRAMP** (TRansgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate) qui exprime les antigènes (T et t) du virus SV40 spécifiquement dans la prostate qui bloquent les voies de signalisation des protéines Rb et p53 (Bostwick et al., 2004; Greenberg et al., 1995; Hill et al., 2005). Les souris présentent une progression de la prostate allant de l'hyperplasie épithéliale au cancer primaire puis aux métastases dans les ganglions lymphatiques et les os. L'histologie des tumeurs est semblable à celle des cancers de prostate humains. Les tumeurs prostatiques de ce modèle sont initialement androgéno-dépendantes mais 70 à 80% des tumeurs deviennent androgéno-indépendantes et peu différenciées après castration. Ce modèle présente néanmoins des limites car les effets de l'antigène viral ne sont pas observés naturellement dans le cancer de prostate humain. Selon la souche de souris utilisée, les tumeurs prostatiques présentent une différenciation neuroendocrine importantes (Chiaverotti et al., 2008).

Dans les modèles suivants, les gènes ciblés sont des gènes dont on sait qu'ils sont surexprimés dans le cancer de la prostate humain.

La surexpression du **RA** dans les cellules épithéliales prostatiques de souris induit l'apparition avec l'âge (après la première année) de lésions de type PIN de haut grade (Chiaverotti et al., 2008). D'autre part, ce modèle montre que dans les zones histologiques normales, le taux de prolifération des cellules épithéliales prostatiques est élevé mais contrebalancé par un taux d'apoptose élevé lui-aussi.

Certains membres de la famille des FGF semblent être impliqués dans le cancer prostatique. Chez l'homme, il a été montré que le **FGF8b** a un potentiel tumorigénique important, car sa surexpression dans la lignée LNCaP stimule leur croissance *in vitro* et *in vivo*, et inversement avec l'inhibition du FGF8b. De plus, le FGF8b est surexprimé à tous les stades du cancer de la prostate humain : des PIN à l'androgéno-indépendance. La surexpression prostatique de FGF8b chez la souris constitue un modèle intéressant. Il induit dans un premier temps l'apparition d'hyperplasie prostatique très tôt (2-3 mois) puis de lésions PIN de bas grade vers 5-7 mois (Song et al., 2002). Avec l'âge, le % de PIN de bas grade augmente et il apparaît des PIN de haut grade dont certains ont une histologie similaire au carcinome prostatique humain.

Le FGF8b est donc un agent mitogène puissant impliqué dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate.

Akt est un oncogène impliqué dans la croissance et la survie cellulaire. Dans les cancers prostatiques où le gène *Pten* est inactivé, l'activité d'Akt est fortement augmentée. Chez la souris, la surexpression de la forme activée d'Akt dans la prostate ventrale dès 2 jours postnatals résulte en une hyperplasie et des PIN mais pas de carcinome invasif (Majumder et al., 2003). Donc Akt seul n'est pas suffisant à la formation de cancer prostatique.

Le facteur de transcription **c-MYC** agit généralement comme régulateur positif de la prolifération cellulaire. Comme dans de nombreux cancers, il est surexprimé dans 30% des cancers prostatiques humains. Sa surexpression dans la prostate de souris se traduit par l'apparition de PIN qui évoluent en adénocarcinomes (Ellwood-Yen et al., 2003). Les taux de prolifération et d'apoptose ainsi que l'angiogenèse sont augmentés dans les prostates des souris transgéniques. La formation des PIN est réversible avec la privation androgénique mais pas les adénocarcinomes, car d'autres altérations génétiques sont apparues comme la perte du gène NKX3.1.

Le gène ***Neu*** code pour un récepteur de la famille des EGFR qui est impliqué dans la progression des cancers prostatiques vers l'androgéno-indépendance. Les souris transgéniques surexprimant Neu développent des PIN qui progressent en adénocarcinomes invasifs (Li et al., 2006). Ce modèle animal a permis d'analyser par microarrays le profil d'expression de ces prostates afin d'identifier des nouveaux marqueurs et de comprendre la voie de signalisation de Neu dans les cancers androgéno-indépendants. Les auteurs ont pu montrer une augmentation du RA phosphorylé dans ces cancers induit par la surexpression de *Neu*.

2.1.2.2.Les modèles murins issus de l'inhibition de gènes

La perte de fonction de certains gènes est impliquée dans certains cancers prostatiques humains. L'invalidation de l'expression de gène chez la souris ou Knock-Out (KO), est une approche qui permet d'étudier le rôle du gène dans la tumorigenèse de la prostate.

Le gène ***NKX3.1*** code pour un facteur de transcription homeobox dont l'expression est spécifique à la prostate. Il est délété dans 80% des cancers prostatiques humains. Les souris KO NKX3.1 développent des PIN de bas grade dans la prostate mais pas d'adénocarcinomes (Abdulkadir et al., 2002). La seule perte d'expression de NKX3.1 semble avoir un rôle dans l'initiation des PIN mais pas dans la progression en cancers prostatiques.

Le gène ***Pten*** (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) a un rôle central dans la prostate. Il est inactivé dans de nombreux cancers prostatiques avancés et

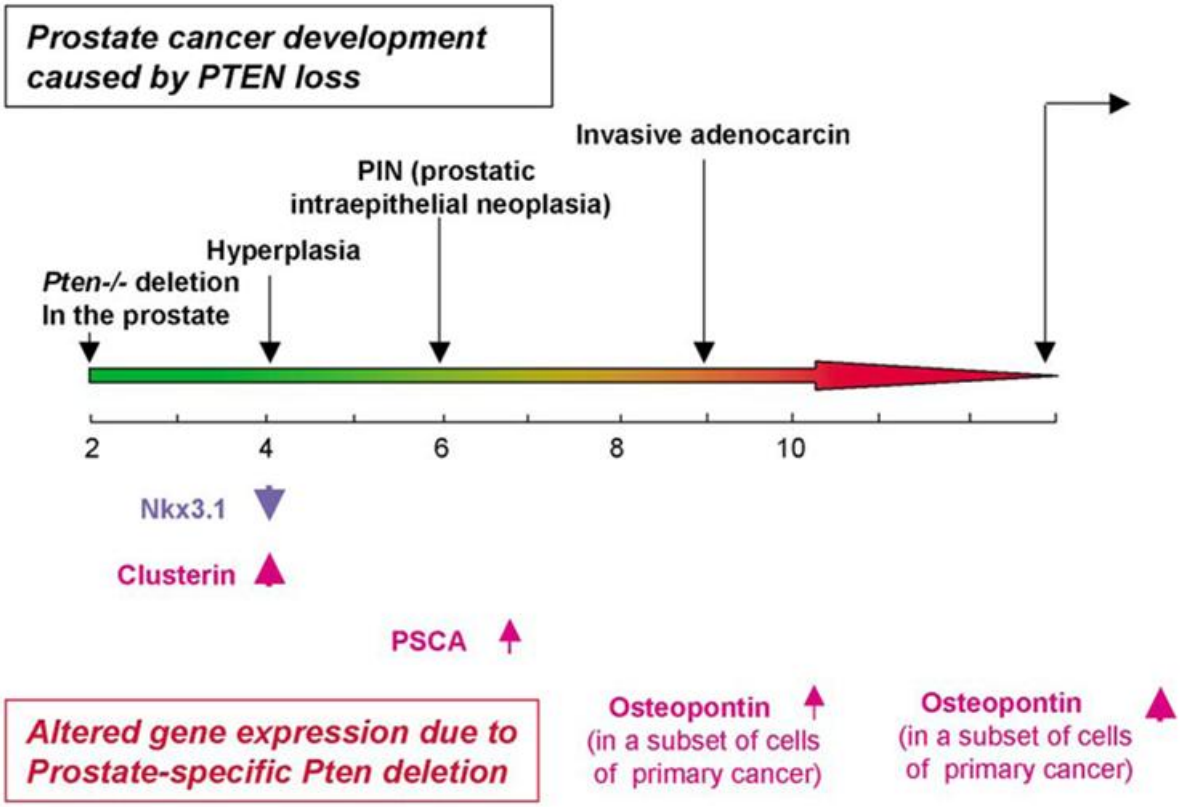


Figure 21 – Résumé de l'initiation et la progression du cancer de la prostate chez la souris possèdant une délètion homozygote pour Pten dans l'épithélium prostatique
(d'après Wang *et al*. 2003).

métastatiques. Le KO conditionnel de *Pten* dans la prostate de souris entraîne une hyperplasie, puis des PIN qui évoluent en adénocarcinomes invasifs et en métastases en neuf semaines seulement (Wang et al., 2003). C'est le premier modèle où l'invalidation d'un gène chez la souris conduit à la formation de métastases des ganglions lymphatiques, poumons et os du cancer de la prostate et mime la progression du cancer prostatique humain. Non seulement Akt est fortement activée dans les cellules cancéreuses comme attendu, mais d'autres modifications sont observées comme la perte d'expression de NKX3.1 et les surexpressions du PSCA (Prostate Stem Cell Antigen), la clusterine et l'ostéonpontine au fur et à mesure de la progression tumorale (figure 21).

2.1.3. Chez le chien

Le chien est la seule espèce non-humaine qui présente des cancers prostatiques spontanés et fréquents (Bostwick et al., 2004). Ces cancers sont cliniquement agressifs et métastasent aux ganglions lymphatiques, poumons et os. Certains cancers prostatiques existent alors que les chiens sont castrés suggérant que ces tumeurs sont indépendantes de la concentration en androgènes circulantes. Des PIN de haut grade ont été identifiés dans la majorité des prostates de chien ayant des lésions cancéreuses qui sont très similaires au niveau histologique à ceux de l'homme. Ce modèle de PIN pourrait servir à évaluer rapidement l'efficacité d'agents chimio-préventifs. D'autre part, l'adénovirus humain ayant la capacité à infecter les cellules épithéliales prostatiques canines, le chien représente un modèle de choix pour étudier le traitement des cancers prostatiques des patients par thérapie génique.

2.2.Les modèles de xénogreffes

Avec l'utilisation des souris immunodéficientes *nude* puis *scid*, des efforts importants ont été entrepris pour développer des xénogreffes à partir de cancers prostatiques humains. Dans un premier temps, les taux de réussite étaient souvent faibles mais ils ont considérablement augmenté avec l'utilisation des fibroblastes ou du matrigel (Lim et al., 1993). Les recherches utilisant le modèle des xénogreffes concernent : 1) la caractérisation des différentes étapes de la progression du cancer, 2) l'efficacité des traitements, 3) l'identification de nouveaux marqueurs du cancer de la prostate et 4) l'étude du processus métastatique.

Deux types de xénogreffes existent en fonction de l'origine de la tumeur prostatique : les xénogreffes issus de cancers prostatiques de patients directement implantés dans les souris hôtes, et les xénogreffes issues de lignées cellulaires inoculées (LNCaP ou PC3). Les premières sont entretenues et conservées par transplantations successives. Généralement, les

xénogreffes conservent les caractéristiques biologiques et cytogénétiques de la tumeur initiale et durant les passages.

Différents facteurs influencent l'incidence et la croissance des xénogreffes : le niveau d'immunodéficience des souris hôtes, l'ajout de matrigel et la co-inoculation des cellules prostatiques cancéreuses avec des fibroblastes.

2.2.1. Les souris immunodéficientes

Il existe plusieurs types de souris immunodéficientes dues à des mutations sur un ou plusieurs gènes. Ces mutations ont été découvertes souvent de manière fortuite au sein de colonies d'animaux entretenues dans divers laboratoires de recherche à partir des années 1960.

2.2.1.1.Les souris nude athymiques

La mutation *nu* fut découverte en 1966 par Flanagan qui décrivit une mutation spontanée résultant en une souris nue, sans poil. En 1968, Pantelouris observa que ces souris n'avaient pas de thymus (Pantelouris, 1968). Les souris nude ont une mutation sur le gène autosomal récessif *foxn1* qui induit un dysfonctionnement du thymus rudimentaire. La déficience en lymphocytes T fonctionnels permet aux souris athymiques d'accepter les xénogreffes (espèces différentes) et les allogreffes (individus différents d'une même espèce) de tissus normaux et malins (Gershwin et al., 1975). Elles ont néanmoins des lymphocytes B normaux et des cellules NK à forte activité qui inhibent en partie la formation des métastases (contrairement aux souris SCID). Leur immunodéficience partielle est associée à un phénotype d'absence de poils. L'introduction des souris nude comme hôte pour les transplantations de cancers humains a ouvert une nouvelle aire dans la recherche sur les cancers notamment de la prostate (van Weerden and Romijn, 2000).

2.2.1.2.Les souris SCID

La mutation *scid* fut découverte par Bosma *et coll* en 1980 (Bosma et al., 1983). Ces souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) ont une mutation récessive qui donne lieu à un système de recombinase anormal. Elles n'assemblent pas efficacement le gène du récepteur à l'antigène dans les lymphocytes en développement et n'ont pas la capacité de réarranger les gènes des immunoglobulines et des récepteurs aux lymphocytes T. Ces souris n'ont donc pas de lymphocytes B et T fonctionnels, ni d'immunoglobulines. Elles sont très susceptibles à la

formation d'implants tumoraux et aux métastases. Néanmoins, elles possèdent toujours les cellules NK (Natural Killers), macrophages et granulocytes normaux.

2.2.1.3.Les autres souris immunodéficientes

Les **souris Beige** (*bg*) présentent des défauts de coagulation, de macrophages fonctionnels et surtout de cellules NK et lymphocytes T cytotoxiques, et les **souris Xid** (X-linked immune deficiency) ont une mutation (*xid*) qui cause des dysfonctionnements en lymphocytes B.
Des croisements ont donné lieu à des souris associant deux mutations, comme les **souris *scid-bg***, ou trois comme les **souris *bg-nu-xid***. Ces souris servent de modèle pour les xénogreffes, et en particulièrement pour des lignées cellulaires qui se développent très lentement chez les souris nude.
Ces souris ayant une immunodéficience parfois sévère suivant les mutations, elles nécessitent des conditions expérimentales strictes dépourvues d'agents pathogènes.

2.2.2. Le matrigel

Le matrigel est une préparation à base de membranes basales extraites du sarcome de souris de Engelbreth-Holm-Swarm, une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire. Ses composants majeurs sont la laminine, le collagène IV, l'héparane sulfate, l'entactine et le nidogène ainsi que des facteurs de croissance. Ces composants interagissent entre eux et forment un réseau tridimensionnel ressemblant aux membranes basales (Kleinman et al., 1986). Concrètement, le matrigel est liquide à 4°C mais se gélifie rapidement entre 22 et 35°C. Il permet ainsi de garder les cellules injectées avec le matrigel dans la souris au niveau du point d'inoculation. Le réseau protéique formé par les composants de la matrice extracellulaire joue un rôle fondamental dans l'encrage des cellules épithéliales injectées leur permettant de retrouver une forme et une polarité (Lim et al., 1993).
Alors que les premiers tests de xénogreffes effectués sur des souris nude étaient faibles, l'ajout de matrigel a considérablement augmenté la prise tumorale. Pretlow *et al* montrent qu'avec le matrigel, la quantité de cellules PC-3 nécessaires pour former une tumeur est 25 000 fois plus faible que sans matrigel (Pretlow et al., 1991). Concernant les cellules LNCaP, les auteurs ne sont jamais arrivés à obtenir des tumeurs sans matrigel, alors qu'avec matrigel, une tumeur s'est développée à partir de 3 millions de cellules. Lim *et al* rapportent qu'après l'injection d'un million de LNCaP, l'incidence tumorale est de 88% au bout de 3 mois (Lim et al., 1993).

Le matrigel contient une protéase appelée activateur tissulaire du plasminogène et des métalloprotéases qui participeraient à l'angiogenèse des tumeurs (Wilson and Sinha, 1997).

2.2.3. Les fibroblastes

La co-inoculation de cellules LNCaP avec des fibroblastes, d'espèces et d'origine diverses, a permis d'améliorer la prise tumorale sur les souris nude (Gleave et al., 1991).

Sur ce modèle de co-inoculation, Olumi *et al* ont étudié le rôle des fibroblastes adjacents aux carcinomes prostatiques sur l'initiation et/ou la progression de cellules épithéliales normales ou immortalisées avec l'antigène large-T du virus SV40 (Olumi et al., 1999). Ils ont montré que ces fibroblastes stimulent fortement la progression tumorale quand ils sont co-inoculés avec les cellules épithéliales prostatiques immortalisées, ce qui n'est pas le cas des fibroblastes "normaux". Par contre, les fibroblastes adjacents aux carcinomes n'ont pas la capacité d'initier des tumeurs avec des cellules épithéliales prostatiques normales. Les auteurs ont ainsi montré que les cellules stromales ont un rôle dans la progression du processus tumoral dans la prostate.

Une étude a comparé l'effet du matrigel et des fibroblastes (de prostates normales d'adultes de 40 ans environ) dans le modèle de xénogreffes de LNCaP et montre que l'incidence tumorale est identique (50%), ainsi que le taux de croissance (Tuxhorn et al., 2002). L'analyse morphologique révèle néanmoins que la présence des fibroblastes favorise une vascularisation plus précoce que le matrigel. De plus, les tumeurs induites par le matrigel possèdent quelques vaisseaux sanguins normaux mais aussi des plages hémorragiques non délimitées par les cellules endothéliales.

La co-inoculation des LNCaP avec du matrigel et des fibroblastes permet une prise tumorale dans 100% des cas ainsi qu'un taux de croissance meilleure. Les deux composants sont donc importants pour la tumorigenèse des cellules LNCaP (Tuxhorn et al., 2002).

2.2.4. Les nouvelles technologies d'analyse tumorale

Les nouvelles technologiques d'imagerie permettent de suivre la croissance tumorale dans les modèles animaux de manière non-invasive (Liao et al., 2007; Seethammagari et al., 2006; Wirtzfeld et al., 2005)). Liao *et al* utilisent le système Cre/LoxP pour générer de nouveaux modèles animaux en combinant le KO conditionnel de *Pten* dans la prostate avec le KO conditionnel de gènes rapporteurs comme la luciférase ou la GFP (Green Fluorescent Protein) (Liao et al., 2007). Les mécanismes de recombinaison inactivent le gène *Pten* et activent les gènes rapporteurs dans la prostate. Le modèle de la GFP permet de localiser et récupérer les

tumeurs avec précision une fois l'animal sacrifié. Avec la luciférase, le suivi de la croissance tumorale prostatique s'effectue par bioluminescence sur l'animal anesthésié et l'intensité du signal calculé est corrélée au volume tumoral. Les auteurs montrent ainsi qu'avec l'utilisation de cette technologie sur le modèle *Pten*, ils peuvent suivre la croissance prostatique tumorale, la régression induite par la castration, et l'échappement tumoral, dans le temps chez un même animal. Cette technique permet aussi de suivre l'apparition des métastases dans le modèle TRAMP par exemple (Seethammagari et al., 2006).

D'autre part, Wirtzfeld *et al* ont mis au point l'utilisation d'ultrasons pour reconstituer une image tridimensionnelle de la prostate de souris (Wirtzfeld et al., 2005). C'est une technologie sensible, de haute résolution spatiale, rapide et simple à effectuer mais qui doit être analysée par un radiologiste. Cette technique permet de calculer le volume prostatique avec précision mais ne donne pas d'informations sur la formation des métastases.

Ces nouvelles technologies d'imagerie présentent l'avantage de réduire le nombre d'animaux dans les protocoles, de suivre l'évolution tumorale dans le temps et permettent donc d'analyser l'efficacité des traitements dans le cadre d'études précliniques.

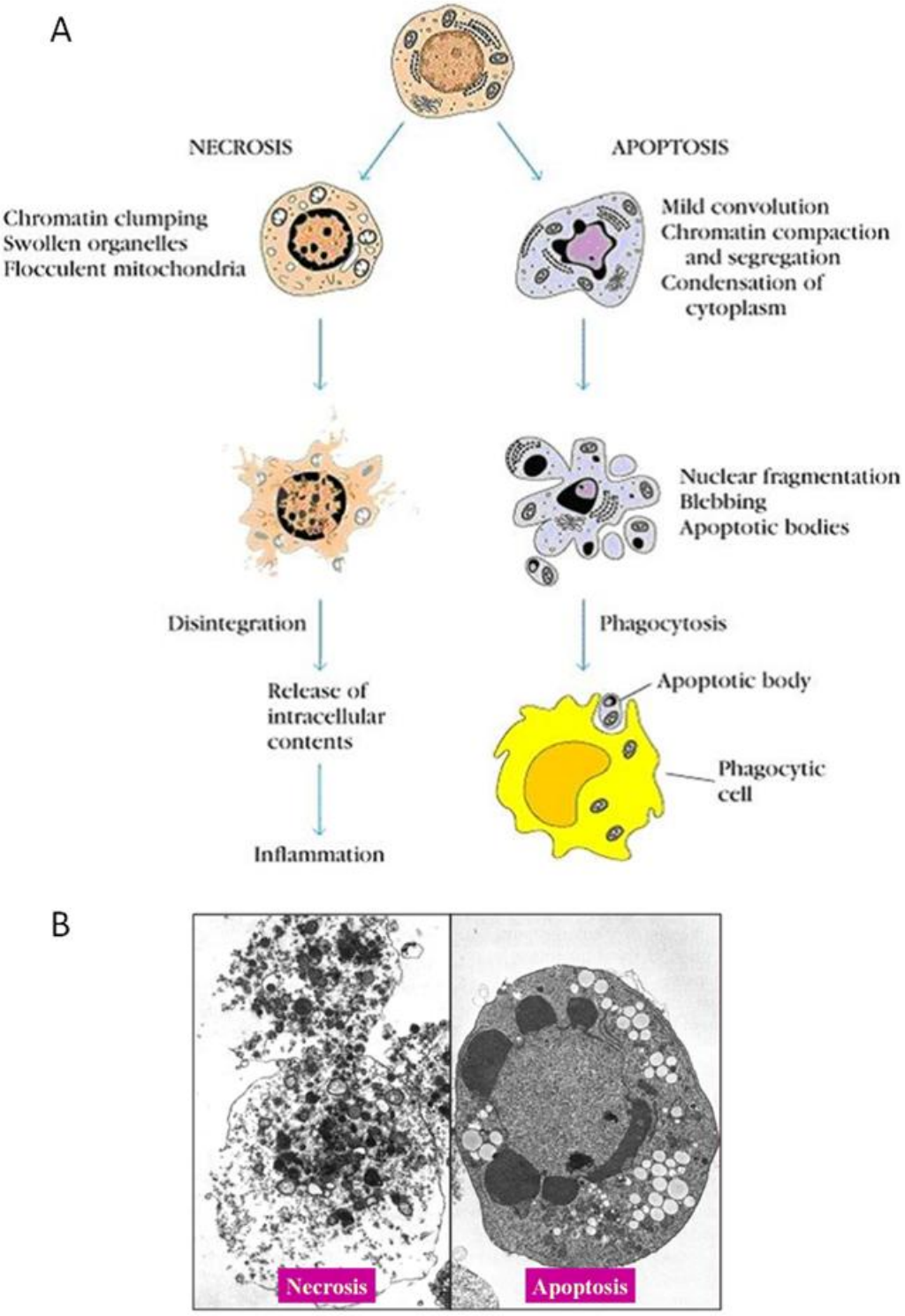


Figure 22 – Différences des mécanismes cellulaires impliqués dans la nécrose et l'apoptose.

A. Schéma représentant les différences entre apoptose et nécrose.

B. Microscopie électronique d'une cellule en nécrose (à gauche) qui déverse son contenu cellulaire dans son environnement, et d'une cellule en apoptose (à droite) dont la chromatine est condensée et l'intégrité membranaire conservée.

CHAPITRE II - L'APOPTOSE

I. Mécanismes généraux du phénomène apoptotique

1. Les différents types de mort cellulaire (figure 22)

1.1. La nécrose

Jusqu'en 1972, la nécrose était considérée comme l'unique forme de mort cellulaire possible. Elle intervient lors d'une agression importante des tissus comme l'ischémie ou les brûlures. Elle se caractérise par un œdème cellulaire conduisant à l'éclatement de la cellule et donc à la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire. Cela entraîne une inflammation et le recrutement des cellules spécialisées du système immunitaire pour éliminer les débris cellulaires et amorcer la réparation tissulaire. La nécrose est un processus passif qui ne nécessite pas d'ATP. La concentration d'ATP est d'ailleurs un paramètre important dans l'orientation de la cellule vers la nécrose (concentration faible en ATP) ou l'apoptose (concentration élevée en ATP) (Nicotera and Melino, 2004). Enfin, l'ADN des cellules nécrotiques est dégradé de façon aléatoire par des endonucléases activées par des protéases à sérines (Bicknell and Cohen, 1995; Dong et al., 1997).

1.2. L'apoptose

1.2.1. Les caractéristiques de l'apoptose

En 1972, Kerr *et al*. introduisent le mot « apoptose », en référence au terme grec signifiant « chute des pétales ou des feuilles », en décrivant un processus de mort cellulaire distinct de la nécrose (Kerr et al., 1972).

L'apoptose est un processus actif de mort cellulaire programmée représentant la capacité d'autodestruction d'une cellule qui met en jeu des acteurs moléculaires spécifiques (Hengartner, 2000; Wyllie et al., 1980). La cellule subit une série de modifications biochimiques conduisant successivement à : 1) la diminution du volume cellulaire, 2) la condensation puis à la fragmentation de la chromatine entre les nucléosomes aboutissant à des fragments multiples de 180 à 200 paires de bases (Wyllie, 1980; Wyllie et al., 1980; Wyllie et al., 1984), 3) au bourgeonnement cellulaire formant des corps apoptotiques alors phagocytés

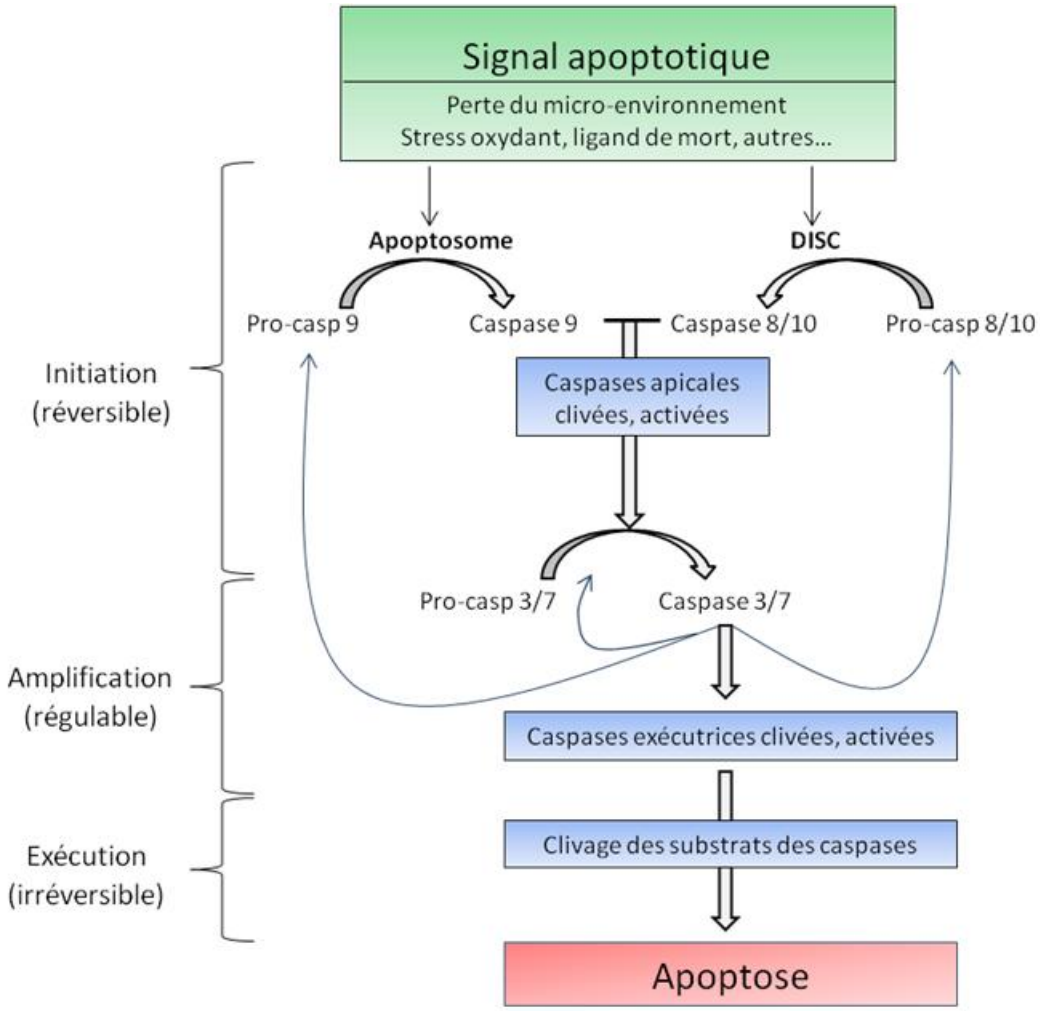


Figure 23 – Représentation des trois phases de l'apoptose
Au niveau cellulaire, les signaux apoptotiques sont intégrés par deux structures principales conduisant à la genèse du signal de mort : l'apoptosome et le DISC. Ces structures permettent l'activation des caspases initiatrices lors de la phase d'initiation réversible. Il s'en suit l'activation des caspases effectrices clivant de nombreux substrats cellulaires vitaux et engageant la cellule vers la mort. Les caspases effectrices peuvent activer en retour les caspases initiatrices formant une boucle d'amplification modulable.

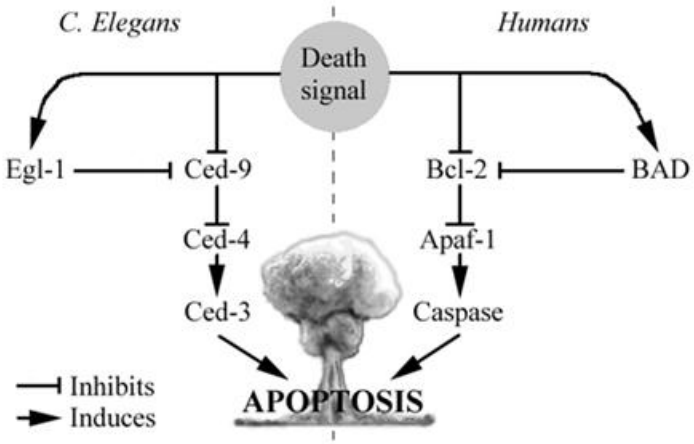


Figure 24 - Mort cellulaire programmée du vers à l'homme.
Les analogues des gènes *Ced* qui contrôlent l'apoptose chez *C. elegans* ont été identifiés chez l'homme. Le signal de mort est initié soit directement en inhibant l'action des protéines anti-apoptotiques (Ced-9 chez *C. elegans* et Bcl-2 chez l'homme) soit en activant des facteurs capables de supprimer l'action de ces protéines inhibitrices (Egl-1 et BAD). Les activations de Ced-4 ou Apaf-1 déclenchent les exécuteurs finaux de l'apoptose, Ced-3 ou les Caspases.

par des macrophages ou les cellules épithéliales environnantes. Pendant ce processus, la cellule garde l'intégrité de sa membrane plasmique n'induisant aucune réaction inflammatoire (Wyllie, 1980). La membrane plasmique subit néanmoins une modification précoce d'inversion des phospholipides membranaires, dont une exposition extracellulaire des phosphatidylsérines (Fadok et al., 1992).

Les évènements successifs de l'apoptose peuvent être subdivisés en trois étapes : une étape d'initiation réversible, suivie d'une étape d'amplification régulable et d'une étape d'exécution irréversible (Figure 23). Au cours de la phase d'initiation, il y a intégration des signaux apoptotiques au niveau de complexes protéiques spécialisés : soit le DISC (Death-Inducing Signaling Complexe) lorsque les signaux apoptotiques sont générés par les récepteurs de mort, soit l'apoptosome lors d'un stimulus nucléaire (dommage à l'ADN,…) ou cytoplasmique (stress oxydatif,…). Ces complexes activent des caspases initiatrices qui vont à leur tour activer les caspases effectrices. Ces dernières qui ont pour substrats des molécules cellulaires vitales déclenchent la phase d'exécution de l'apoptose.

Les différences entre nécrose et apoptose sont récapitulées dans le tableau 4.

	Nécrose	**Apoptose**
Tissulaire		
Distribution	Groupe de cellules	Cellules uniques
Réaction périphérique	Inflammation	Peu ou pas d'inflammation
Morphologie		
Cellule	Aspect œdémateux	Diminution de volume et perte des liaisons intercellulaires
Membrane plasmique	Perte d'intégrité	Intégrité, formation de corps apoptotiques
Organelles	Détruits ou endommagés	Intacts
Noyau	Désintégré	Condensé puis fragmenté
Mitochondrie	Non fonctionnelle	Perméable, libération de cytochrome c
Biochimie		
ADN	Fragmentation non spécifique	Clivage de l'ADN internucléosomal
Protéine	Dégradation non spécifique	Activation des caspases
Substrats	Hydrolyse non spécifique	Substrats spécifiques
Nécessité d'ATP	NON	OUI

Tableau 4 – Les différences entre nécrose et apoptose

1.2.2. L'apoptose, un phénomène conservé au cours de l'évolution

Les mécanismes impliqués dans l'apoptose sont très conservés au cours de l'évolution des procaryotes jusqu'aux mammifères. L'étude du nématode *Caenorhabditis elegans* a permis de caractériser les acteurs moléculaires de l'apoptose (figure 24). Pour le bon développement de *C.elegans*, 131 cellules sur les 1090 que compte ce nématode entrent en apoptose. Des études de mutations génétiques ont permis d'identifier les gènes impliqués dans l'apoptose.

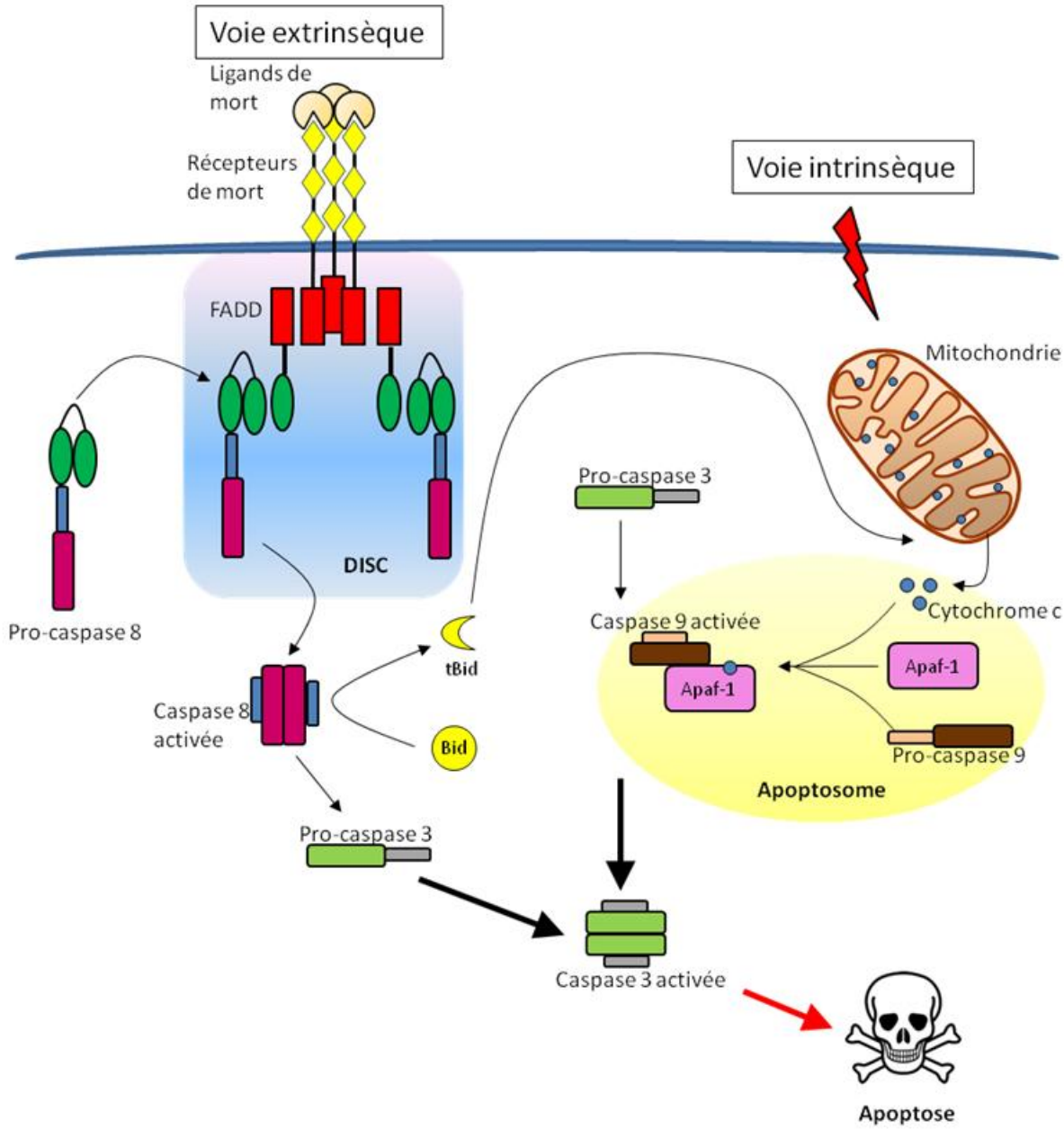


Figure 25 – Représentation des deux voies apoptotiques.
La voie extrinsèque, des récepteurs de mort, transmet le signal apoptotique par le DISC (Death Inducing Signaling Complex) qui aboutit à l'activation de la caspase 8. La voie intrinsèque, mitochondriale, transmet le signal apoptotique par la libération de cytochrome c dans le cytoplasme qui participe à la formation de l'apoptosome avec Apaf-1 et la pro-caspase 9. Ce complexe aboutit à l'activation de la caspase 9. Les caspases initiatrices 8 et 9 vont à leur tour activées la caspase effectrice 3 qui déclenche la phase finale de l'apoptose. Ces deux voies apoptotiques sont interconnectées. Bid peut être clivé par la caspase-8 pour générer un fragment plus court, tBid (Bid tronqué). Ce clivage conduit à la translocation du fragment tBid vers la mitochondrie et son insertion dans la membrane externe qui va participer à sa désorganisation.

La voie apoptotique mise en évidence chez *C.elegans* fait intervenir les gènes *ced-3* and *ced-4*, requis pour induire le programme apoptotique, et un 3è gène, *ced-9*, dont la protéine empêche l'apoptose (Hengartner et al., 1992; Hengartner and Horvitz, 1994). Ces gènes présentent de fortes homologies avec des gènes des mammifères. Ainsi, les protéines homologues de CED-3, CED-4 et CED-9 sont des membres de la famille des caspases, de Apaf-1, et de la famille Bcl-2 respectivement (White, 1996; Yuan and Horvitz, 1992; Yuan et al., 1993; Zou et al., 1997).

1.2.3. Rôle physiologique de l'apoptose

L'apoptose intervient dans de nombreux mécanismes physiologiques. Pendant l'embryogenèse, la formations des espaces interdigitaux se fait par apoptose et permet la formation des doigts. Elle est responsable du bon fonctionnement du système immunitaire, en éliminant les lymphocytes qui synthétisent des anticorps inactifs ou auto-immuns. Elle participe à l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules sénescentes ou dégénératives.
En raison de ces nombreux rôles physiologiques, des dysfonctionnements de l'apoptose peuvent causer des pathologies. Les maladies neurodégénératives comme Alzheimer seraient dues à une apoptose trop importante, alors qu'un déficit d'apoptose entraînerait des maladies auto-immunes et certains cancers (Jellinger, 2001; Olanow, 2007; Zornig et al., 2001).

2. Les voies d'induction de l'apoptose

Deux modes principaux d'action de l'apoptose ont été définis suite aux nombreuses investigations menées au cours des quinze dernières années : 1) un mode extrinsèque, en réponse à des signaux extracellulaires comme les ligands de mort (Fas Ligand, TNF-α, TRAIL) et faisant intervenir le DISC (Death Inducing Signaling Complex), où la caspase initiatrice 8 a un rôle majeur ; 2) un mode intrinsèque, en réponse à des signaux affectant la mitochondrie et permettant la formation de l'apoptosome, dans lequel la caspase initiatrice 9 a un rôle central. Dans les cellules, ces deux voies sont souvent interconnectées (figure 25).

2.1. La voie mitochondriale

La mitochondrie a longtemps été décrite comme l'organite où siège le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire, permettant la synthèse d'ATP cellulaire. A ce rôle de « centrale énergétique cellulaire » s'est ajouté une autre fonction, celle d'acteur prépondérant dans l'apoptose. Les *stimuli* extracellulaires ou intracellulaires tels que l'hypoxie, les produits du

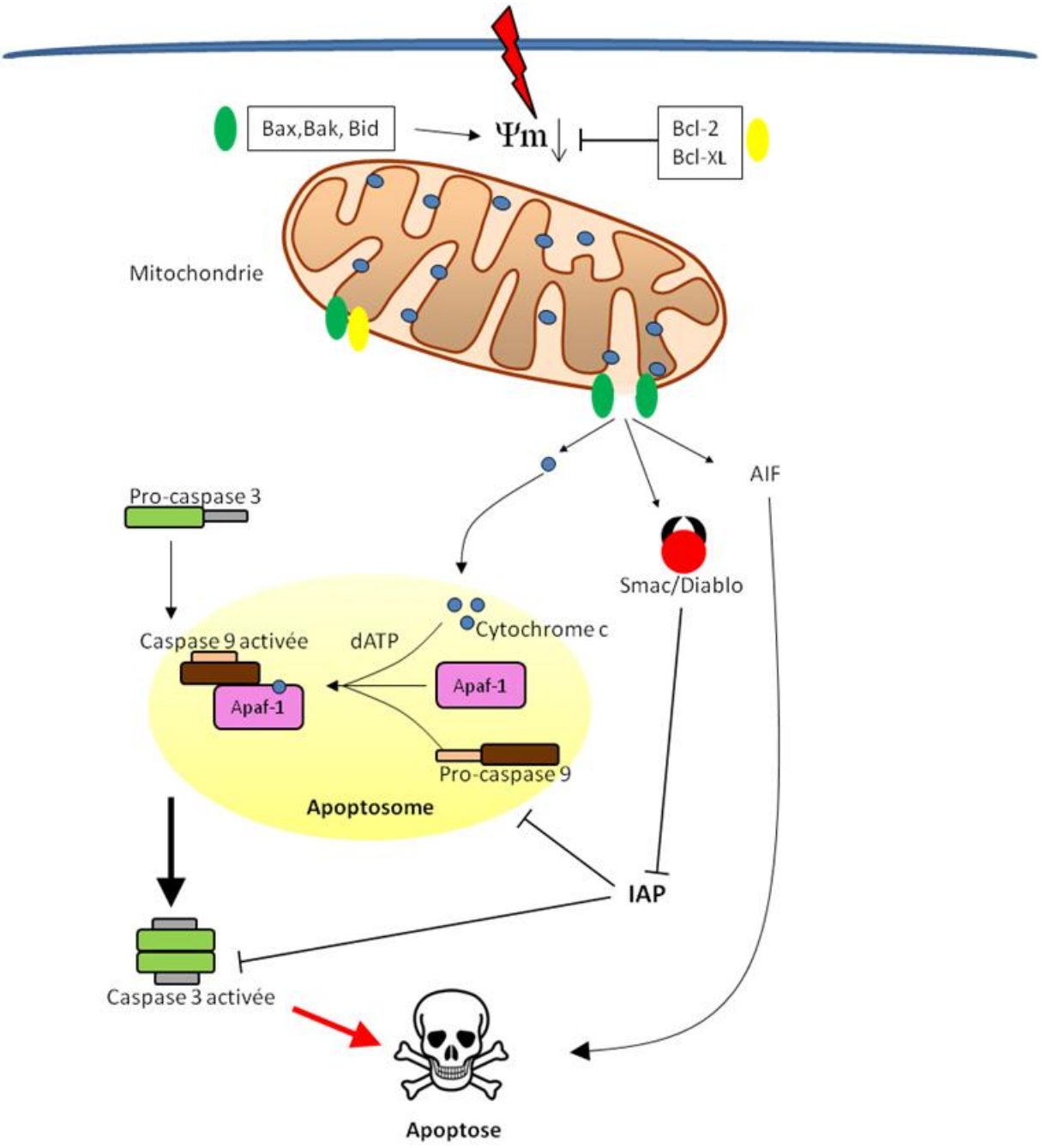


Figure 26 – La voie apoptotique mitochondriale.
La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie par les protéines de la famille Bcl-2 entraîne la libération de plusieurs molécules qui induisent l'apoptose :
-le cytochrome c qui participe à la formation de l'apoptosome,
-la protéine Smac/diablo qui neutralise l'action des IAP (Inhibitor of apoptosis protein) qui inhibent les caspases,
-AIF, qui induit l'apoptose indépendamment des caspases

stress oxydatif, les radiations gamma ou UV, l'absence de facteurs de croissance, les molécules cytotoxiques etc., peuvent enclencher une perturbation de la membrane mitochondriale qui conduit à la fragmentation de l'ADN soit par le biais des caspases soit indépendamment de celles-ci (Kim et al., 2006b; Mohamad et al., 2005). La perméabilisation soudaine de la membrane externe de la mitochondrie (PMEM) est fréquemment associée à la dissipation du potentiel de membrane interne ($\Delta\Psi m$) (Goldstein et al., 2000; Green and Kroemer, 2004). La PMEM permet la libération dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques, qui se localisent normalement dans l'espace intermembranaire mitochondrial : le cytochrome *c*, le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et la protéine Smac-DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi) (Joza et al., 2001; Schafer and Kornbluth, 2006) (figure 26). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 (Apoptosis activating factor-1) et la pro-caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, l'apoptosome à l'origine du clivage de la pro-caspase-9, et aboutissant à sa forme active (Acehan et al., 2002).
Les mécanismes de PMEM impliquent la formation de pores ou canaux dans la membrane dont l'ouverture est régulée par des molécules de la famille Bcl-2 (cf § 3.2) (figure 34 formation pores mitochondrie) (Hengartner, 2000; Korsmeyer et al., 2000; Von Ahsen et al., 2000). La rupture de la membrane externe causerait une entrée d'eau et d'ions massive provoquant le gonflement de la matrice mitochondriale. Finalement, les fonctions mitochondriales indispensables à la survie cellulaire sont perdues.

2.2. La voie des récepteurs de mort

2.2.1. Les ligands et récepteurs de la superfamille du TNF-α (figure 27)

L'apoptose peut également être induite par des cellules voisines ou distantes, par des signaux membranaires ou solubles. Le plus souvent, ces signaux sont des cytokines de la superfamille du TNF-α. Ce sont des protéines membranaires de type II (extrémité N-terminale cytosolique et extrémité C-terminale extracellulaire) dont la protéolyse par des métalloprotéases est possible libérant ainsi les cytokines sous forme soluble. Les deux formes, membranaires et solubles, sont actives. L'extrémité C-terminale contient un domaine appelé "TNF Homolgy Domain" (THD), responsable de la liaison avec les récepteurs.
Les cytokines interagissent avec des récepteurs qui sont des protéines transmembranaires de type I (extrémité N-terminale extracellulaire et extrémité C-terminale cytosolique). Néanmoins, il y a quelques exceptions notamment le récepteur DcR1 (Sheridan et al., 1997) qui est ancré à la membrane par une ancre GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol), et les

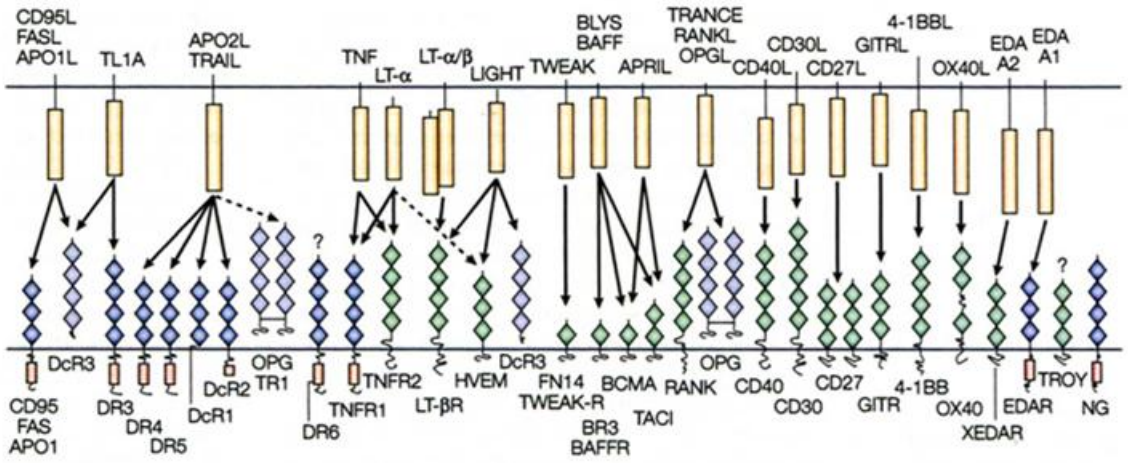


Figure 27 – Les super-familles des TNF et récepteurs au TNF (d'après Ashkenasi 2002).

Les ligands sont représentés sous leur forme transmembranaire. Les losanges représentent les domaines riches en cystéines, et les rectangles rouges les domaines de mort. Les interactions de forte affinité entre ligands et récepteurs sont représentées par les flèches pleines, et les interactions de faible affinité par des flèches en pointillées. Certains récepteurs n'ont pas de ligands connus (?).

récepteurs OPG (Ostéoprotégérine) (Emery et al., 1998) et DcR3 qui sont soluble (Pitti et al., 1998). Le domaine extracellulaire des récepteurs de la superfamille du TNF-α contient de une à six régions riches en cystéines (CRD, « Cystein Rich Domain »), impliquées dans la liaison avec le ligand (Nagata, 1997). Ils peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort, soit les deux. Ainsi, les récepteurs Fas (CD95/APO-1), TNF-RI, DR3, DR4, DR5 et DR6 sont généralement impliqués dans la mort cellulaire (Locksley et al., 2001). Ces derniers connus sous le nom de « récepteurs de mort », possèdent dans leur portion intracellulaire une région conservée appelée le « domaine de mort » (DD), un motif protéique d'environ 80 acides aminés nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs (Chaudhary et al., 1997; Nagata, 1997; Tartaglia et al., 1993).

2.2.2. Voies de signalisation

Schématiquement, la transmission du signal apoptotique passe par la fixation des ligands sous forme de trimères à leurs récepteurs de mort trimériques qui vont ensuite recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices (Banner et al., 1993; Cha et al., 2000; Hymowitz et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 1999). Ces protéines vont alors à leur tour recruter les caspases initiatrices (principalement la 8 et la 10) et induire leur activation par auto-clivage. L'ensemble de ce complexe multi-protéique est appelée le DISC. La composition du DISC n'est cependant pas définie et varie d'un récepteur de mort à l'autre, d'un type cellulaire à l'autre (Krueger et al., 2001).

Concernant les récepteurs de mort Fas et TNF-RI, ils seraient présents au niveau de la membrane plasmique sous forme d'homotrimère avant même la liaison avec leur ligand respectif, via un domaine particulier situé en N-terminal (le domaine PLAD, "Pre-Ligand Assembly Domain") (Cha et al., 2000; Locksley et al., 2001). Cela implique pour ces récepteurs que la fixation du ligand n'entraîne pas leur trimérisation mais induirait un changement de conformation permettant l'interaction des récepteurs de mort avec les protéines adaptatrices (Ashkenazi, 2002).

Le DD des récepteurs de mort permet d'assurer la liaison avec les protéines adaptatrices pourvues d'un domaine similaire, comme FADD (Fas-associated Death Domain) (Chinnaiyan 1995) et TRADD (TNFR-associated Death Domain) (Hsu et al., 1995).

Le système Fas

Dans le DISC, induit par la liaison des ligands Fas (FasL) aux récepteurs Fas, la protéine adaptatrice recrutée est le FADD (figure 28) (Chinnaiyan et al., 1995). En plus du DD, FADD

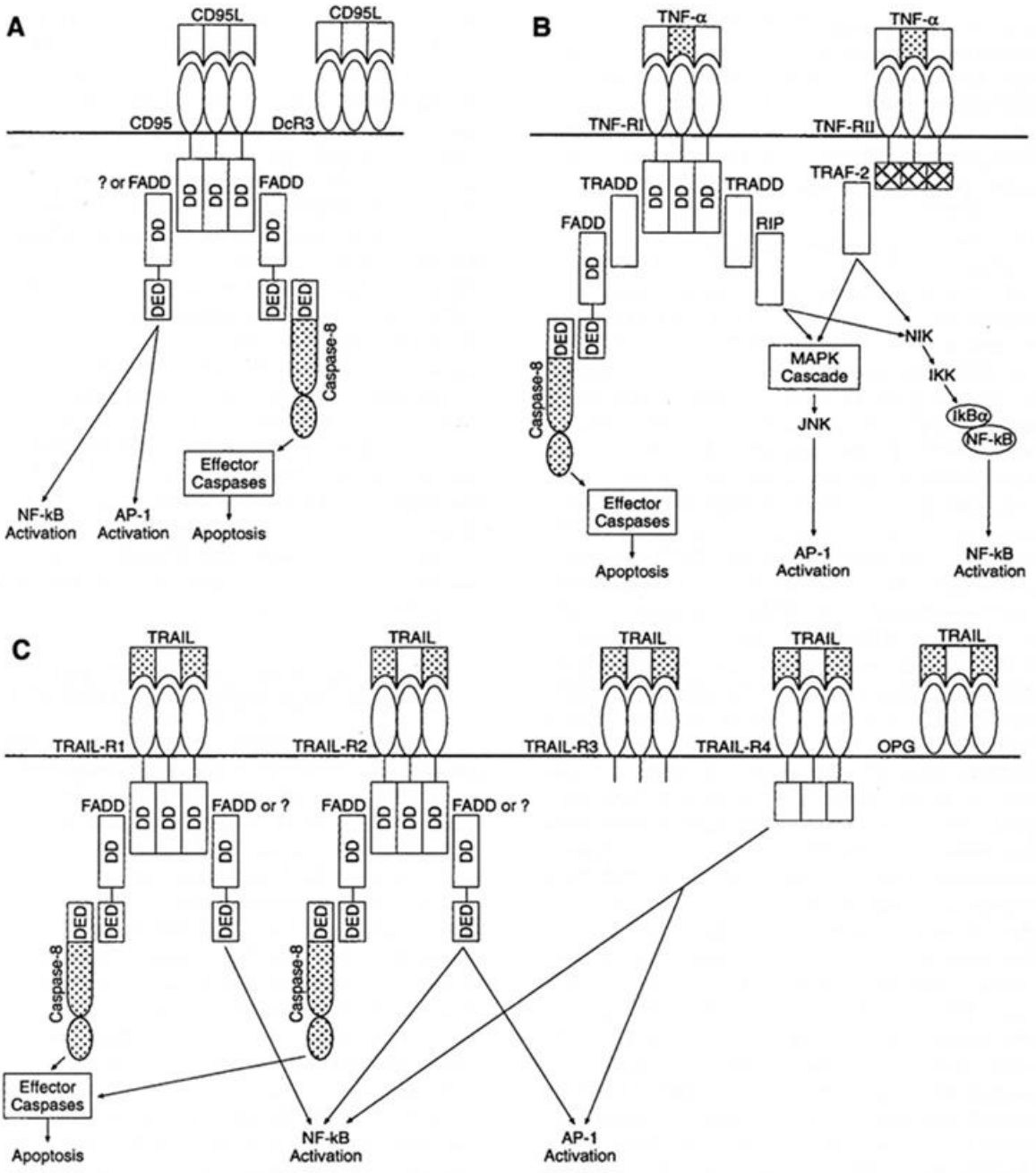


Figure 28 – Voies de signalisation induite par Fas-ligand (A), TNFα (B) et TRAIL (C)

contient un domaine effecteur de mort cellulaire (DED, "Death Effector Domain") qui va interagir à son tour avec le DED de la procaspase-8. La caspase-8 s'auto-active et va ensuite activer les caspases effectrices. Le récepteur Fas peut cependant conduire à l'activation des voies du NF-κB (nuclear factor- κB) et d'AP-1 (Guseva et al., 2004). Ce sont des facteurs de transcription régulant de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose, qui selon le type cellulaire et la situation physiologique induisent soit la voie apoptotique soit la voie de survie.
Le ligand Fas peut aussi se lier au récepteur leurre DcR3 qui ne possède pas de DD et ne peut donc pas transmettre le signal apoptotique (Roth et al., 2001; Tsuji et al., 2003).

Le système TNF-R

La liaison du TNF-α aux TNF-RI induit le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD, qui peut à son tour recruter différentes protéines (figure 28) (Hsu et al., 1995). Quand TRADD recrute FADD, c'est l'apotose qui va être déclenchée via le caspase-8 (Schneider-Brachert et al., 2004). Quand TRADD recrute d'autres protéines comme TRAFs et RIP, ce sont les voies de NF-κB et/ou AP-1 qui sont actives (Micheau and Tschopp, 2003; Wallach et al., 2002).
TNF-α peut se lier à un deuxième récepteur, TNF-RII qui n'induit pas directement l'apoptose mais jouerait un rôle dans la régulation de l'apoptose via TNF-RI et dans l'activation des voies NF-κB et AP-1 (Declercq et al., 1998; Rothe et al., 1995).

Le système TRAIL

Le ligand TRAIL peut interagir avec cinq récepteurs. DR4 et DR5 ont des DD et induisent l'apoptose par la formation d'un DISC très similaire au Fas, impliquant FADD, la caspase 8 ou 10 (figure 28). TRAIL semble pouvoir induire la formation d'homo et d'hétérotrimères de DR4 et DR5. De plus, il a été montré que DR4 et DR5 peuvent aussi induire les voies de signalisation de NF-κB et AP-1 (Jeremias and Debatin, 1998; MacFarlane, 2003) (Hu et al., 1999).
TRAIL se lie aussi à des récepteurs leurres, DcR1 qui ne possède pas de région cytoplasmique, et DcR2 qui contient un DD incomplet, ne permettant pas la transmission d'un signal apoptotique (Marsters et al., 1997; Pan et al., 1998; Sheridan et al., 1997). Les domaines extracellulaires de DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer TRAIL et sont ainsi en compétition avec DR4 et DR5 mais ne transmettent pas le signal de mort. Dans ce sens, ces récepteurs auraient un rôle d'inhibiteur de l'apoptose induite par des récepteurs de mort DR4 et DR5 (Pan et al., 1997a; Sheridan et al., 1997). DcR2 peut aussi activer les voies de signalisation de NF-κB et AP-1 (Degli-Esposti et al., 1997) (Hu et al., 1999).

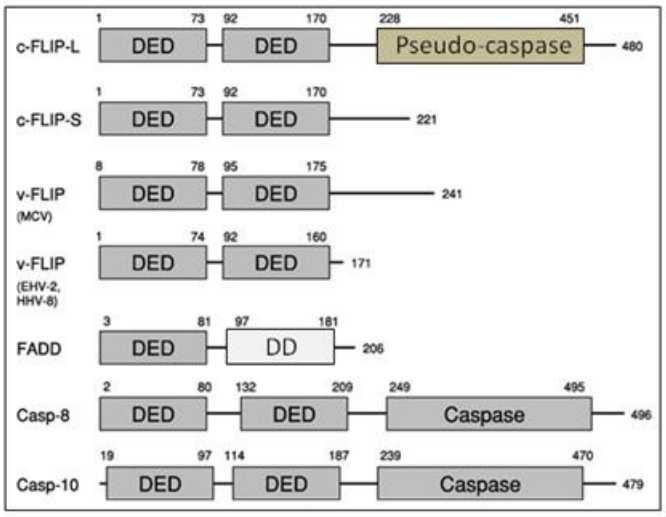


Figure 29 – Similarité de structure des molécules FLIP, FADD et caspase 8 et 10 (d'après Roth W. et Reed J.C. 2004).
DED : Death Effector Domain ; DD : Death Domain ; MCV : Molluscipoxvirus ; EHV : Equine Herpes Virus ; HHV : Human Herpes Virus.

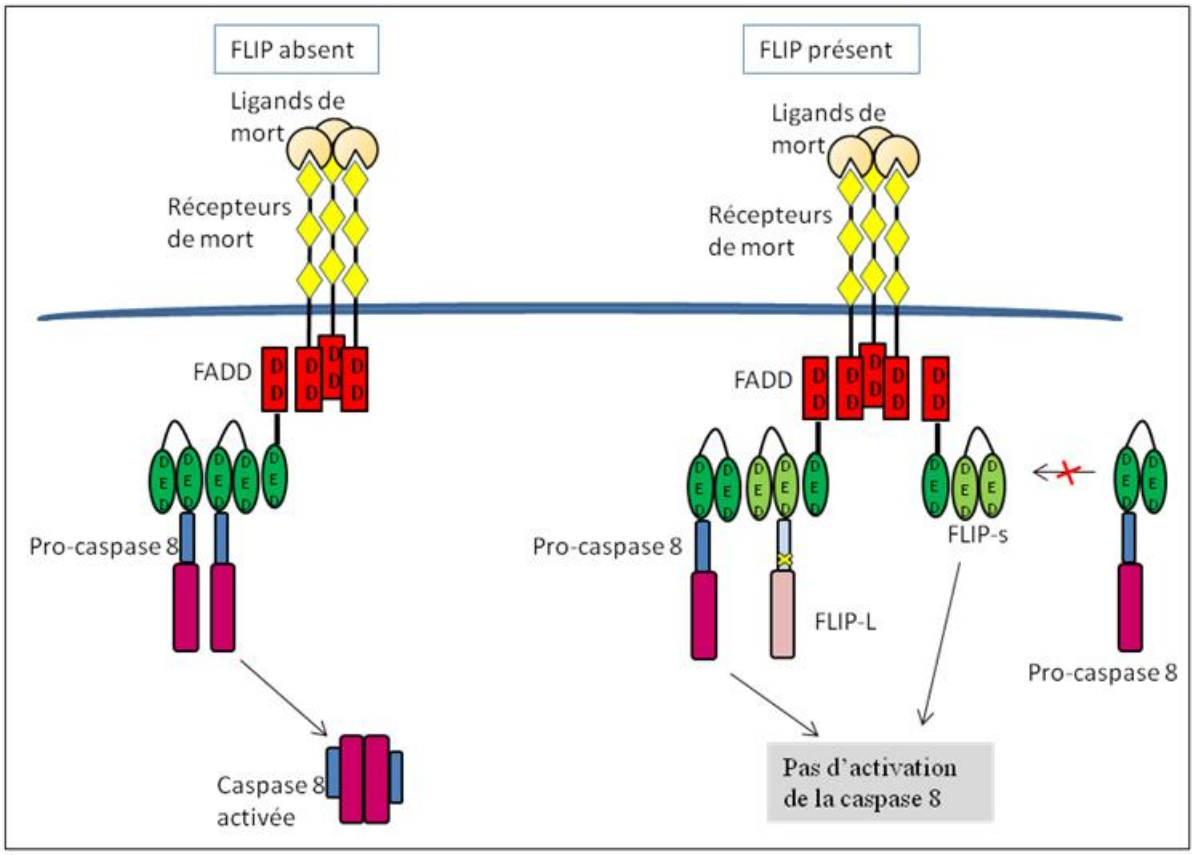


Figure 30 – Inhibition de l'activation de la caspase 8 par interaction avec FLIP-Long et FLIP-short.
La composition du DISC diffère selon l'absence (à gauche) ou la présence de FLIP (à droite). Le domaine caspase tronqué de FLIP-long (représenté par une croix orange) empêche le clivage de la caspase 8 et le relargage des sous-unités actives. FLIP-short entre en compétition avec la caspase 8 dans l'interaction avec FADD.

Enfin, l'OPG est un récepteur soluble qui peut interagir avec les ligands TRAIL (avec moins d'affinité que les récepteurs précédents) et RANK, et module ainsi leurs voies de signalisation impliquées respectivement dans la l'apoptose et la survie cellulaire (Emery et al., 1998; MacFarlane, 2003).

Régulation du signal apoptotique des récepteurs de mort par la protéine FLIP

Dans la formation du DISC, l'étape du recrutement des protéines adaptatrices par les récepteurs de mort peut être régulée par des protéines appelées FLIP (pour « Fas-associated death domain-like interleukin-1-beta-converting enzyme-inhibitory protein »). Le gène FLIP est localisé sur le chromosome 2q33-34 sur un cluster de gènes de 200 kb contenant les caspases 8 et 10, suggérant des évènements de duplication au cours de l'évolution (Irmler et al., 1997). Il existe une grande variété de transcrits de FLIP. La forme courte, $FLIP_S$, contient deux DED qui vont lui permettre de se lier aux caspases 8 ou 10, et d'empêcher leur activation au niveau du DISC (figures 29 et 30) (Bump et al., 1995; Irmler et al., 1997; Krueger et al., 2001). Le transcrit le plus long, $FLIP_L$, possède, en plus des deux DEDs, l'équivalent d'un domaine caspase inactif dépourvu des acides aminés nécessaires à l'activité des caspases notamment la cystéine du centre catalytique. $FLIP_L$ et $FLIP_S$ protègent de l'apoptose induite par plusieurs récepteurs de mort : Fas, TNF-RI, DR4 et DR5. Le rôle de $FLIP_L$ semble plus complexe que $FLIP_S$. Bien qu'il empêche le recrutement de la caspase 8 au niveau du DISC et donc son activation, $FLIP_L$ peut former un hétérodimère avec la caspase 8 résultant en une activation partielle de cette dernière (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002; Micheau and Tschopp, 2003; Rasper et al., 1998; Srinivasula et al., 1997). L'hétérodimère peut aussi recruter les protéines adaptatrices TRAF2 et RIP1 et induire l'activation de NF-κB (Budd et al., 2006).

2.2.3. Activation de la voie mitochondriale par les récepteurs de mort

Deux types de cellules ont été décrits en fonction de l'activation de la voie mitochondriale par la voie des récepteurs de mort (Scaffidi et al., 1998; Scaffidi et al., 1999). Dans les cellules de type I, le DISC induit l'activation d'une grande quantité de caspase-8 qui induit un rapide clivage des caspases effectrices et aboutit à l'apoptose. Dans les cellules de type II, le DISC se forme mais le signal apoptotique doit être amplifié par la voie mitochondriale. La caspase-8 clive Bid, un membre de la famille Bcl-2, qui va être transférer dans la mitochondrie et activer l'apoptose (figure 25) (Esposti, 2002). La mitochondrie est impliquée dans l'apoptose de ces deux types de cellules mais est strictement nécessaire dans les cellules de type II.

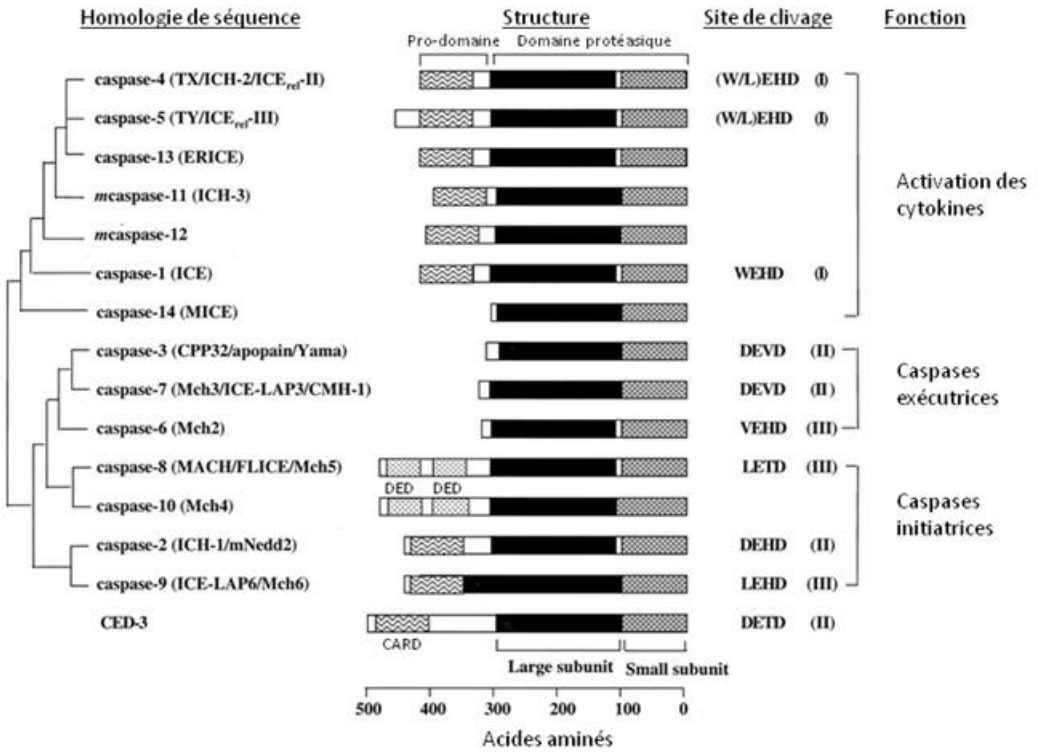


Figure 31 – Organigramme des caspases de mammifères et de C.elegans (d'après Chang et Yang, 2000)
L'analyse phylogénique est basée sur la similarité des séquences du domaine protéasique. Les caspases sont regroupées en fonction de la spécificité de la séquence peptidique reconnue.
DED : Death Effector Domain et CARD : Caspase Recruitment Domain.

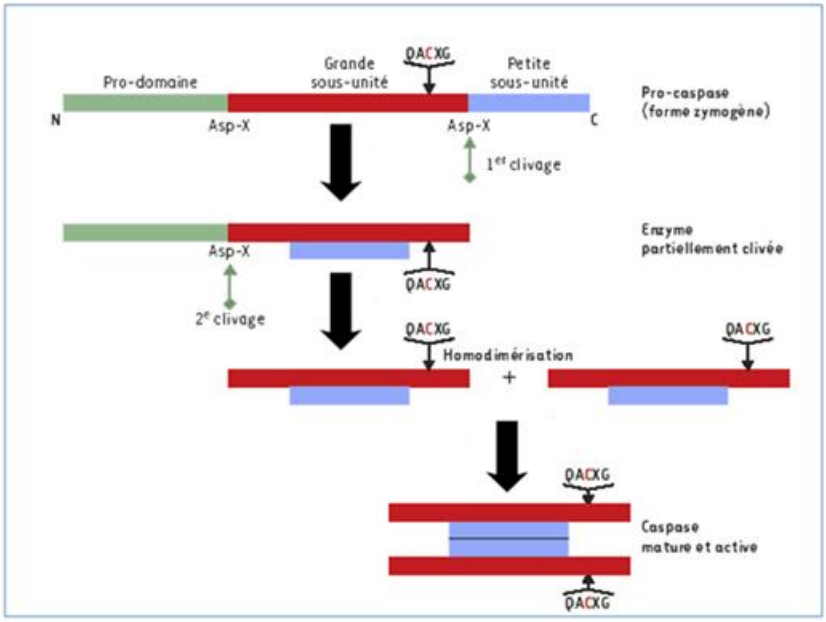


Figure 32 - Activation des caspases (d'après Couzinet et al., 2002).

3. Les acteurs moléculaires de l'apoptose

En dépit de la diversité de ces signaux, toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Cette signalisation aboutit alors à l'activation irréversible de molécules effectrices les caspases (pour cysteinyl aspartate-specific proteinases).

3.1. La famille des caspases

3.1.1. Structure

La première protéase à cystéine identifiée chez les mammifères a été ICE (Interleukin-1β processing enzyme) plus tard renommée caspase-1 homologue à CED-3 de *C.elegans* (Miura et al., 1993). Les analyses phylogéniques ont permis de former deux grandes sous-familles de caspases : (i) les caspases apparentées à la caspase 1 (caspases 1, 4, 5 et 13) intervenant dans le processus inflammatoire et (ii) les caspases apparentées à la caspase 3 (caspases 3, 6-10) spécialisées dans le processus apoptotique (figure 31) (Chang and Yang, 2000).

Les caspases possèdent un site catalytique comprenant un résidu cystéine directement impliqué dans le processus catalytique localisé dans un motif QACxG (où le résidu x est R, Q ou G). Elles reconnaissent, puis clivent des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie C-terminale de leurs substrats.

3.1.2. Activation

Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous une forme inactive (zymogène ou pro-enzyme). L'activation des pro-caspases en caspases actives nécessite deux clivages réalisés en C-terminal d'un résidu aspartique. Il y a d'abord clivage entre la petite sous-unité et la grande sous-unité permettant la libération de la petite sous-unité, puis clivage conduisant à la libération du pro-domaine. Il se forme un tétramère constitué de deux grandes et deux petites sous-unités (figure 32) (Budihardjo et al., 1999) (Couzinet et al., 2002).

En plus de leurs sous-unités actives, les pro-caspases possèdent un pro-domaine de longueur variable à leur extrémité NH2-terminale qui permet de les diviser en deux sous-groupes.

Les caspases à long pro-domaine, dites caspases d'amont ou initiatrices, contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine, tels que les domaines DED pour les caspases 8 et 10 ou CARD (« caspase recruitement domain ») pour les caspases 1, 2, 4 et 9. Ces domaines permettent leur recrutement par des protéines adaptatrices au niveau de complexes protéiques

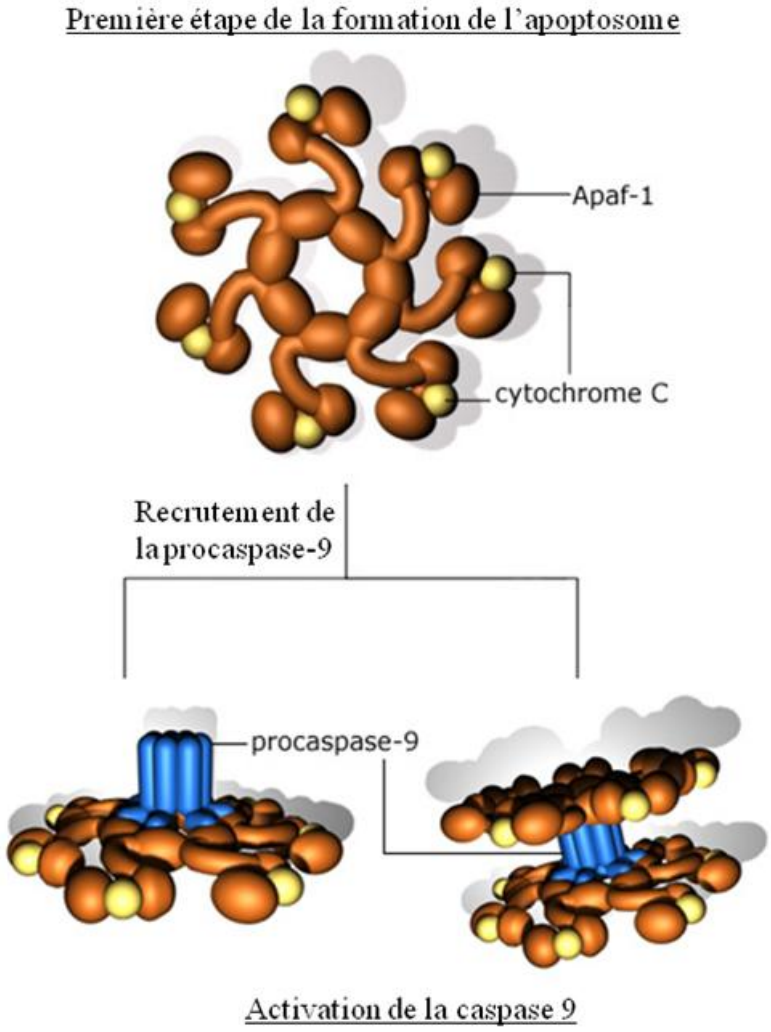


Figure 33 – Formation de l'apoptosome.
source:
http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/caspases.htm

d'initiation de l'apoptose. Le recrutement des pro-caspases initiatrices au niveau de ces sites spécifiques entraîne l'oligomérisation des pro-enzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar and Colussi, 1999).

Les caspases 3, 6, 7 et 14 possèdent quant à elles un pro-domaine plus court (10 à 40 résidus) et sont dites caspases d'aval ou effectrices. Elles ne possèdent pas de domaine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser ; elles sont activées à la suite de leur clivage par une autre caspase (à pro-domaine court ou long), ce qui aboutit à une activation en cascade. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines substrats à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose (Thornberry and Lazebnik, 1998).

Cette réaction en chaîne est à la base du processus conduisant à la mort cellulaire et peut-être initié de deux façon : (i) par le DISC pour les caspases 8 et 10 et (ii) par l'apoptosome pour la caspase 9.

L'apoptosome est le complexe multi-protéique qui permet l'activation de la pro-caspase 9 suite à la stimulation de la voie mitochondriale (figure 33). L'oligomérisation de la protéine adaptatrice Apaf-1 et du cytochrome c induit un changement dans la conformation d'Apaf-1 lui permettant de lier l'ATP (Zou et al., 1997). Apaf-1 présente un domaine de recrutement des caspases CARD rendant possible l'interaction avec la pro-caspase 9. Il se forme un complexe protéique de la taille de 700 à 1400 KDa et qui est capable d'activer la caspase 3 effectrice. L'importance de chacun de ces composants a pu être démontrée par des expériences d'invalidation génique (Cecconi et al., 1998).

3.1.3. Les substrats des caspases

De nombreux substrats des caspases ont, à ce jour, été identifiés. Le premier substrat identifié est l'enzyme poly-ADP-ribose-polymérase (PARP) dont la coupure, au niveau de la séquence DEVD-G, est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose (Lazebnik et al., 1994). Le clivage protéolytique a pour conséquences : (i) l'activation de protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose comme les pro-caspases, Bid, les endonucléases, les facteurs de transcription SREBP-1, -2 ; (ii) l'inactivation de protéines contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire comme l'actine, les lamines nucléaires, la fodrine, le facteur ICAD/DFF45 (Inhibitor Caspase-Activated DNAse/DNA Fragmentation Factor 45) ; (iii) l'inactivation de protéines régulant la réparation de l'ADN comme PARP et DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase) ; 4) l'inactivation de protéines du cycle cellulaire comme RB

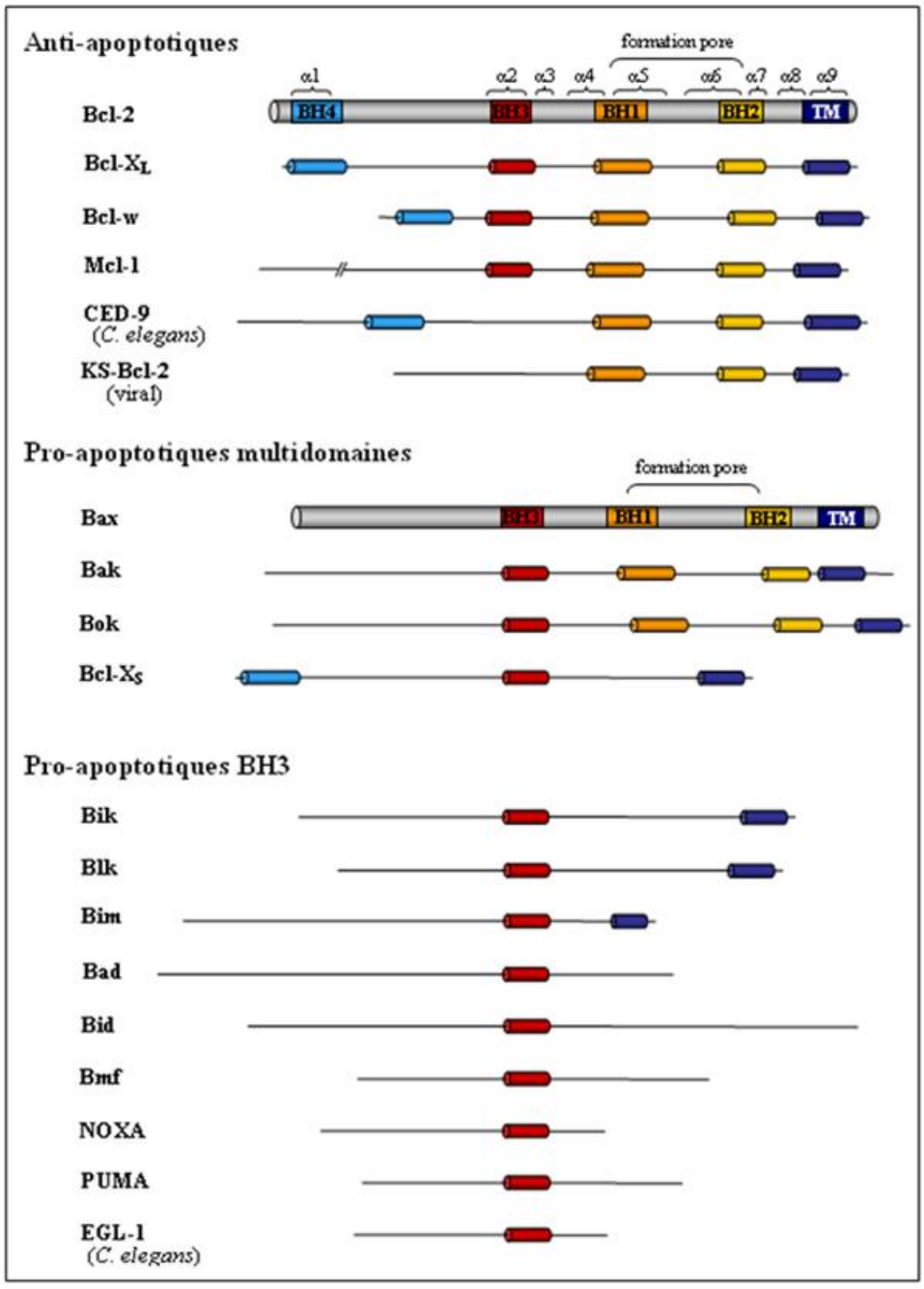


Figure 34 – Structure des molécules de la famille Bcl-2
Les membres anti-apoptotiques présentent les quatre domaines BH1 à BH4, tandis que les membres pro-apoptotiques sont divisés en deux groupes : les molécules apparentées à Bax disposant des domaines BH1 à BH3 (Bax, Bak, Bok) et les molécules possédant que le domaine BH3.

(Degterev et al., 2003; Earnshaw et al., 1999). Les substrats cellulaires des caspases sont répertoriés dans le tableau 5.

Régulation de l'apoptose	Bcl-2, Bcl-x, Bid, CrmA, IAP, p28 Bap31, p35, Pro-caspases
Régulation du cycle cellulaire	Cdc27, Cyclin A, MDM2, p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1), PITSLRE kinases, Retinoblastoma protein, Wee1 phosphatase
Cytosquelette	Actine, β-Catenine, Fodrine, Gas2, Gelsoline, Keratine-18 and -19, Lamines, Plakoglobine
Précurseurs des cytokines	Pro-IL-1β, Pro-IL-16, Pro-IL-18 (IGIF)
Métabolisme de l'ADN	Acinus, DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), DNA replication complex C (DSEB/RFC140), ICAD, MCM3 DNA replication factor, NuMA, PARP, Topoisomerase 1
Protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives	APP, Ataxin-3 (spinocerebellar ataxia type 3), Androgen receptor (Kennedy's disease), Atrophin-1 (dentarorubral pallidoluysian atrophy protein, Presenilins, Huntingtin
Métabolisme de l'ARN	Eukaryotic initiation factor 2α, Heteronuclear ribonuclear proteins C1 and C2, 70-kDa U1-snRNP
Transduction du signal	Adenomatous polyposis coli protein (APC), Akt/PkB, Calmodulin-dependent kinase IV, c-Raf, D4-GDP dissociation inhibitor, Fyn tyrosine kinase, Focal adhesion kinase, MEKK1, MST/Ksr, PAK-2/hPAK65, Protein kinase C delta, Protein kinase C theta, Protein kinase C-related kinase 2, Protein phosphatase 2A, Ras GTPase activating protein, TCR-ζ chain
Facteurs de transcription	Heat shock factor, GATA-1, IκB-α, NF-κB (p50, p65), NRF-2, Sp1, STAT1, Sterol-regulatory element-binding proteins
Autres	Calpastatin, Hsp90, Nedd4, Phospholipase A2, Rabaptin-5, Transglutaminase

Tableau 5 – Substrats cellulaires des caspases

3.2. La famille Bcl-2

Le processus de l'apoptose est contrôlé par un groupe de protéines hautement conservées au cours de l'évolution, les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia). Le gène de la protéine Bcl-2, a été le premier identifié en tant que proto-oncogène dans les lymphocytes B. Cette famille de protéines est composée de plus d'une vingtaine de composants, avec une faible homologie entre leurs séquences totales en acides aminés. En revanche, elles présentent des fortes homologies entre des régions précises, appelées domaines BH (Bcl-2 Homology), essentielles pour les interactions entre protéines (Yin et al., 1994).

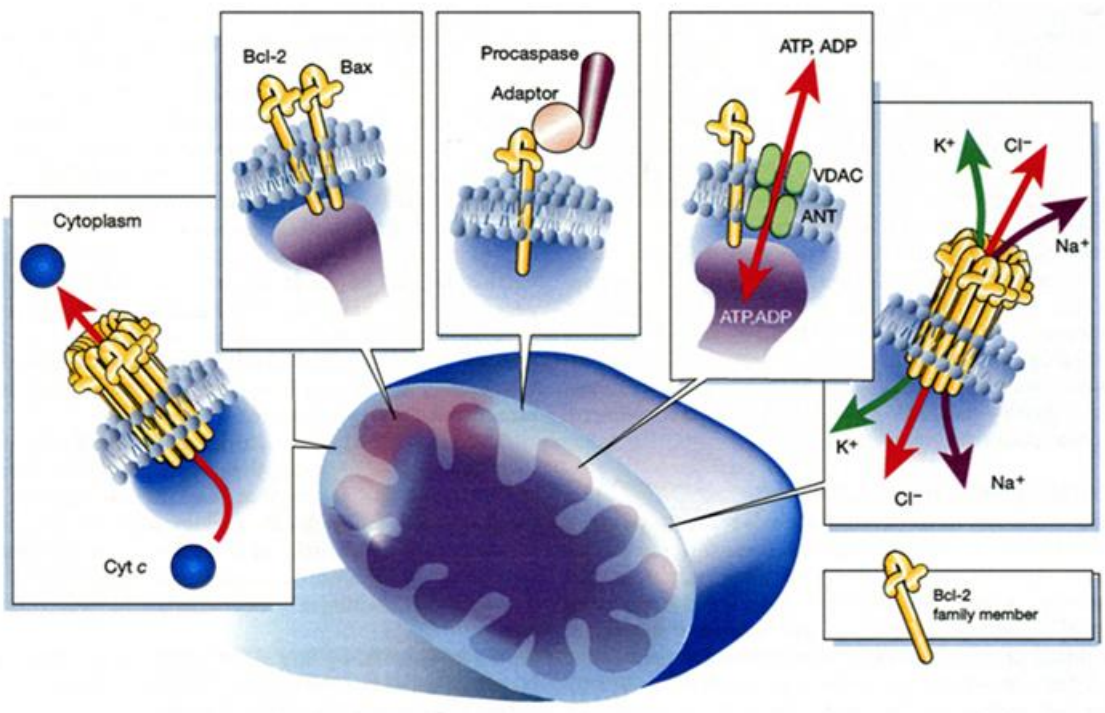


Figure 35 – Mécanismes possibles d'action des molécules de la famille Bcl-2 (d'après Hengartner 2000). De gauche à droite :
-Formation de pores par lesquels le cytochrome c et d'autres molécules peuvent s'échapper dans le cytoplasme.
-Hétérodimérisation entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille séquestrant les molécules anti-apoptotiques.
-Régulation directe des caspases via un adaptateur.
-Interactions avec d'autres protéines de la membrane mitochondriale qui génèrent des pores et modulent l'homéostasie de la mitochondrie, en ouvrant les pores de transition de perméabilité par exemple.
-Oligomérisation pour former des canaux ioniques peu sélectifs.

La famille des protéines Bcl-2 est divisée en deux groupes : les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques (Gross et al., 1999). Les protéines anti-apoptotiques présentent les 4 régions BH et sont localisées au niveau de la mitochondrie et stabilisent les membranes. Au sein du groupe pro-apoptotique, il y a deux sous groupes : les protéines à plusieurs domaines BH (″multidomains″) et les protéines qui contiennent uniquement le domaine BH3 (BH3-only). L'ensemble des protéines de la famille Bcl-2 est illustré par la Figure 34. L'importance de cette famille de protéines a été soulignée par la surexpression ou la perte de fonction de certaines protéines anti- et pro-apoptotiques qui déterminent la survie ou la mort cellulaire.

Il existe deux propriétés biochimiques majeures des protéines de la famille Bcl-2 : 1) elles ont la capacité de former des hétérodimères avec les protéines de la même famille possédant le domaine BH3 et 2) elles ont le potentiel de former des canaux ioniques à travers la membrane mitochondriale (Tsujimoto, 2003).

Les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » interviennent dans l'induction de l'apoptose par activation de protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines ou par séquestration des protéines anti-apoptotiques. Elles interviennent dans la voie intrinsèque de l'apoptose et elles peuvent mettre en relation la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Kim et al., 2006b). Les autres membres forment *in vitro* des canaux à travers les biomembranes, ce qui laisse supposer une fonction dans la formation de pores (Figure 35) (Antonsson et al., 1997).

3.3. Les inhibiteurs de l'apoptose

L'identification des IAP (Inhibitor of apoptosis protein) a été réalisée sur la base de leur homologie de séquence avec des protéines virales du baculovirus. NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) a été le premier membre identifié et est impliqué dans l'atrophie musculaire spinale (Roy et al., 1995). c-IAP-1, c-IAP-2 (Rothe et al., 1995) et XIAP (Rajcan-Separovic et al., 1996) inhibent les caspases de façon similaire mais par un processus distinct de celui de NAIP. La surexpression de XIAP a montré un rôle protecteur face aux maladies neuro-dégénératives (modèles animaux). La survivine est largement exprimée au cours de la vie embryonnaire mais absente des tissus différenciés. Son expression va être retrouvée dans les lignées tumorales et les cancers les plus courants (Ambrosini et al., 1997). La livine, quant à elle, est fréquemment surexprimée dans les cancers du colon, du poumon et des mélanomes (Kasof and Gomes, 2001; Lin et al., 2000; Vucic et al., 2000). Enfin, Ts-IAP (Testis-specific IAP) est le dernier membre identifié (Lagace et al., 2001).

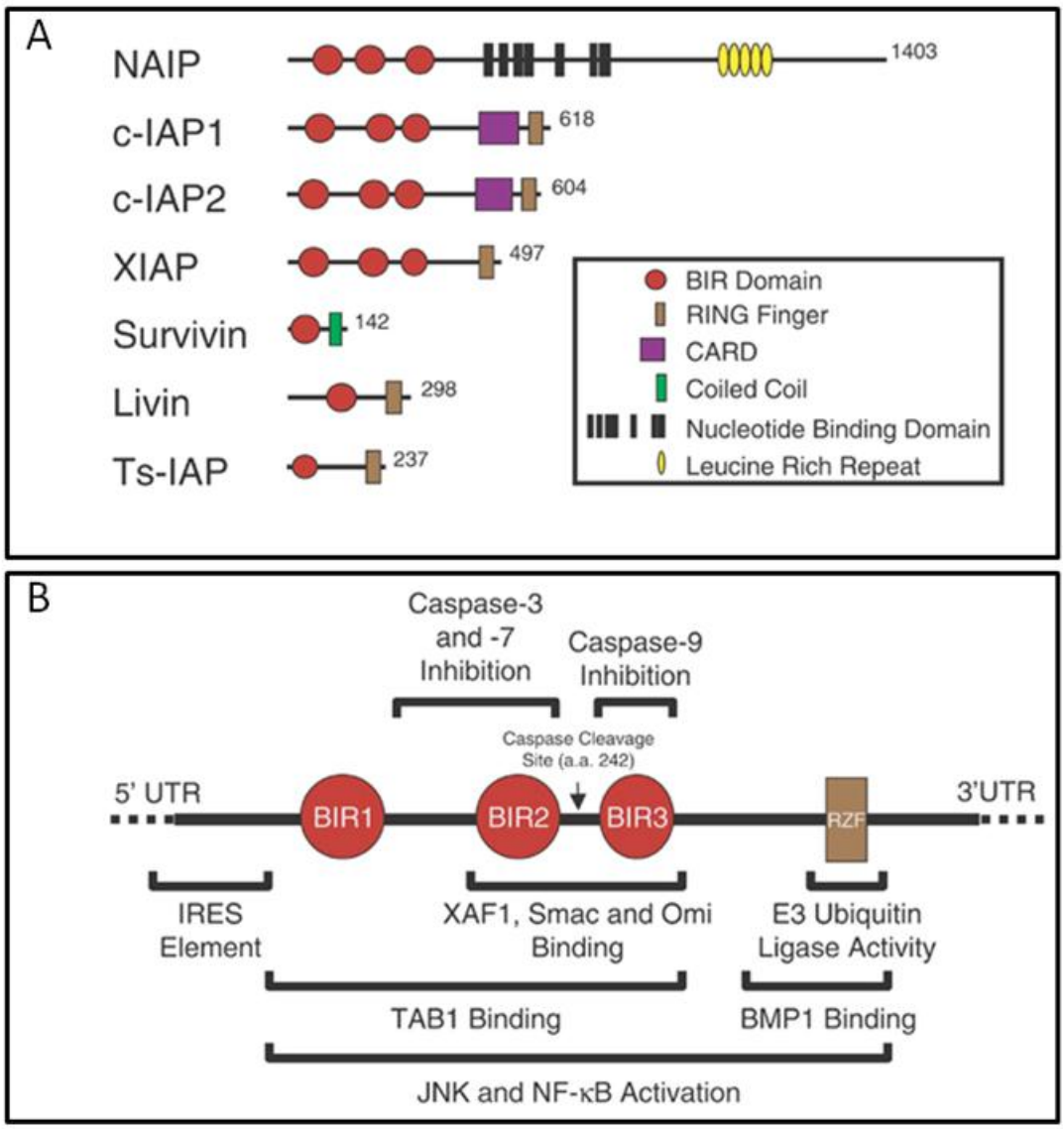


Figure 36 – Structure des IAP (d'après Liston *et al.* 2003).
A- Alignement des 7 membres de la famille des IAP montrants les différents domaines protéiques qui les composent.
BIR: baculoviral IAP repeat; CARD: caspase recruitment domain; RING: RING zinc-finger.
B- Structure détaillée de XIAP. La figure montre les domaines responsables des activités d'inhibition des caspases et des interactions avec des partenaires comme Smac.
IRES: internal ribosome entry site

Les IAP sont caractérisés par un ou plusieurs domaines BIR (Baculovirus IAP repeat) de 70-80 acides aminés, riches en cystéines et histidines. La structure des sept membres actuels est présentée dans la figure 36 (Liston et al., 2003). La capacité des IAP à inhiber les caspases se fait par l'intermédiaire de ces domaines BIR (Roy et al., 1997; Takahashi et al., 1998). Les IAP contenant plusieurs domaines BIR inhibent la caspase 9 via le troisième domaine BIR et les caspases 3 et 7 via le second. Pour les IAP ayant un seul domaine BIR, il inhibe soit la caspase 9 (Ts-IAP), soit les caspases 3 et 7 (Survivine), soit les trois (Livine). La fonction des IAP dans la cascade apoptotique est représentée dans la figure 37 (Liston et al., 2003).

Les domaines RZF (RING zing finger) présents dans c-IAP-1, c-IAP-2 et XIAP est commun aux ubuquitine-ligases et sont impliqués dans l'adressage vers le protéasome des caspases 3, 7, Smac et de TRAF2 (Li et al., 2002; MacFarlane, 2003; Suzuki et al., 2001).

Enfin, les domaines NOD (Nucleotide Oligomerization Domain) et CARD, associés respectivement à l'oligomérisation et au recrutement des caspases dans d'autres protéines, n'ont pas de fonctions définies dans le cas des IAP (Liston et al., 2003).

Les IAP peuvent être inhibés par trois protéines : XAF1 (XIAP-associated factor 1), Smac/Diablo et HtrA2/Omi (Figure 37) (Liston et al., 2003). Alors que XIAP est surexprimé dans les cellules tumorales et associé à leur chimiorésistance (Chawla-Sarkar et al., 2004), XAF1 est sous-exprimé dans la majorité de 60 lignées tumorales du NCI (National Cancer Institute) testées (Fong et al., 2000). Smac/Diablo est relargué par la mitochondrie lors d'un stimulus apoptotique et est capable d'interagir avec et d'inhiber tous les IAP avec une affinité supérieure pour les domaines BIR3 inhibant la caspase 9. Enfin, HtrA2/Omi est également relargué par la mitochondrie mais ne semble être capable d'inhiber que XIAP (Suzuki et al., 2001).

II. TRAIL et l'apoptose

1. TRAIL

1.1. Découverte du TRAIL

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) est une cytokine de la superfamille du TNF-α. Les premières observations relatant l'existence du TNF-α ont été réalisées à la fin du 19ème siècle, lorsque le médecin William Coley constata la régression tumorale de sarcomes

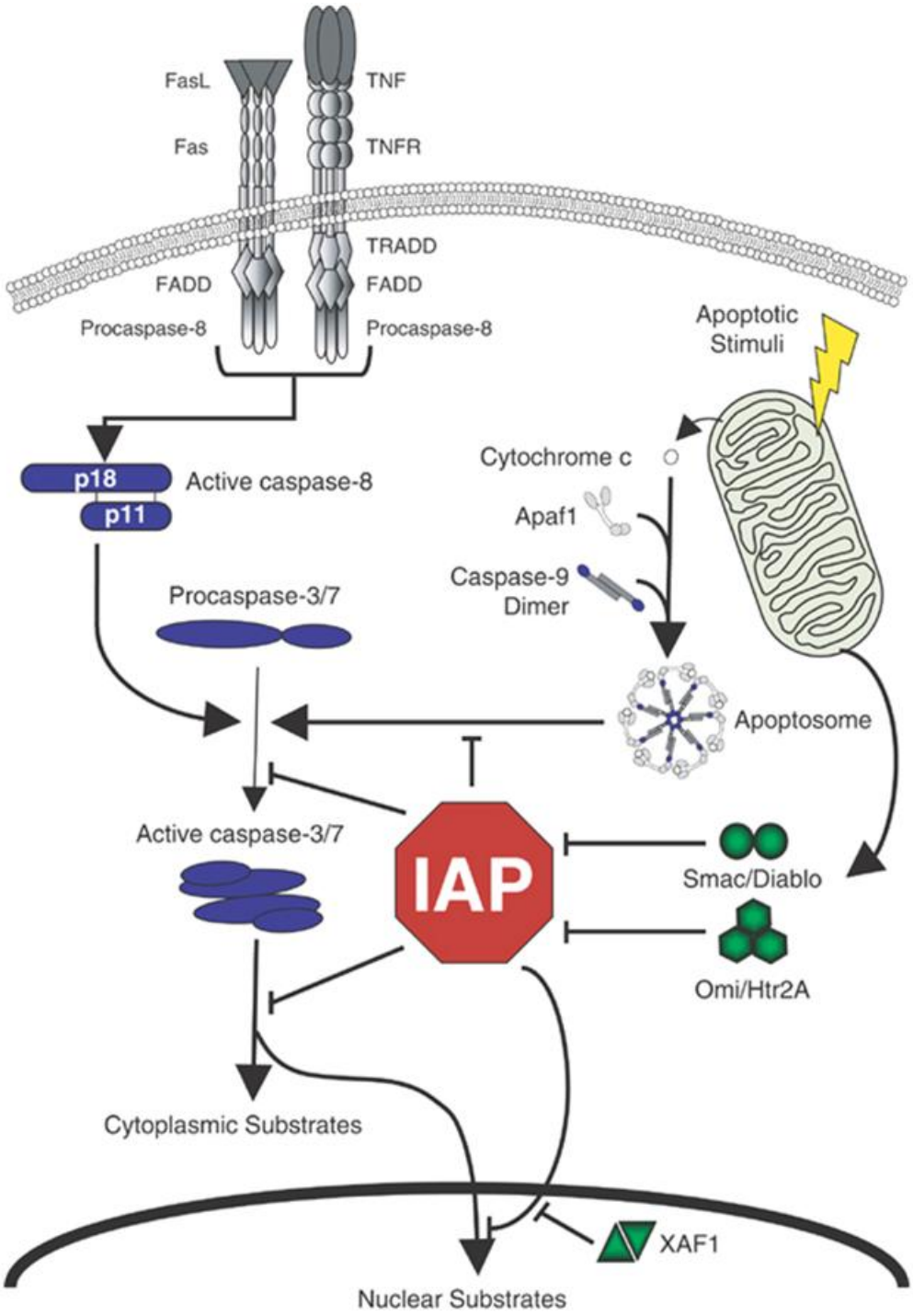


Figure 37 – Rôles des IAP dans la régulation des voies apoptotiques (d'après Liston et al. 2003).
Les caspases activées par les voies intrinsèques et extrinsèques peuvent être inhiber par les IAP. Lors de l'apoptose, le relargage des molécules mitochondriales Smac/Diablo, Omi/Htr2A lève l'inhibition exercée par les IAP. Le facteur nucléaire XAF-1 est un puissant inhibiteur d'XIAP et semble pouvoir le séquestrer dans le noyau.

de cou chez des patients atteints d'infections bactériennes. L'injection intra-tumorale de préparations d'Erysipelas permettait cette involution chez les patients survivants au choc septique provoqué (Coley, 1991). Ce n'est qu'en 1975 qu'Elisabeth Carswell identifia le facteur sérique responsable de cette activité (Carswell et al., 1975) et en 1984, Diane Pennica en clona la séquence d'ADN (Pennica et al., 1984). A présent, 18 molécules apparentées ont été identifiées ainsi que 28 récepteurs, regroupés en deux superfamilles de molécules (Ashkenazi, 2002) (Bodmer et al., 2002).

TRAIL a été découvert en 1995 en raison de sa forte homologie de séquence avec FasL et TNF-α (Wiley et al., 1995). Cependant, à l'inverse de FasL et TNF-α, TRAIL tue spécifiquement les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines, *in vitro* et *in vivo*, d'où l'intérêt sans précédent que la communauté scientifique lui porte (Ashkenazi et al., 1999; Takeda et al., 2002; Takeda et al., 2001; Walczak et al., 1999).

Depuis son identification, plus de 2700 études lui ont été consacrées dans le cadre de l'apoptose. A ce jour, chez l'homme, cinq récepteurs capables de lier TRAIL ont été identifiés. Deux d'entre eux, DR4 et DR5 sont capable d'induire l'apoptose tandis que les trois autres, DcR1, DcR2 et l'OPG, agissent comme récepteurs antagonistes (Chaudhary et al., 1997; Emery et al., 1998; Pan et al., 1997a; Pan et al., 1997b; Sheridan et al., 1997). L'étude de ces différents acteurs, ainsi que l'invalidation du gène codant pour TRAIL chez la souris ont révélé l'importance de cette cytokine dans la surveillance immunitaire anti-tumorale (Cretney et al., 2002).

L'objectif de ce chapitre est de présenter la molécule TRAIL, ses récepteurs, leurs fonctions physiologiques mais aussi leur implication dans les pathologies cancéreuses.

1.2. Aspects structuraux

TRAIL présente 28% d'homologie de séquence avec FasL (Wiley et al., 1995). Son gène est localisé sur le chromosome 3 en position q26.

TRAIL est une protéine transmembranaire de type II constituée de 281 résidus chez l'homme contre 291 chez la souris. L'architecture moléculaire de la protéine TRAIL est composée de 10 brins β nommés A, A'', B, B', C, D, E, F, G et H organisés en deux feuillets β antiparallèles (Cha et al., 1999). Le feuillet interne, formé par l'association des brins A'', A, H, C et F de chaque sous-unité permet la formation du trimère et le second feuillet β, formé par l'association des brins B', B, G, D et E est alors exposé à l'extérieur de la molécule. TRAIL présente une spécificité structurale importante : les brins A et A'' sont reliés par une boucle AA'' de longueur bien supérieure à celle des autres membres de la superfamille. Cette

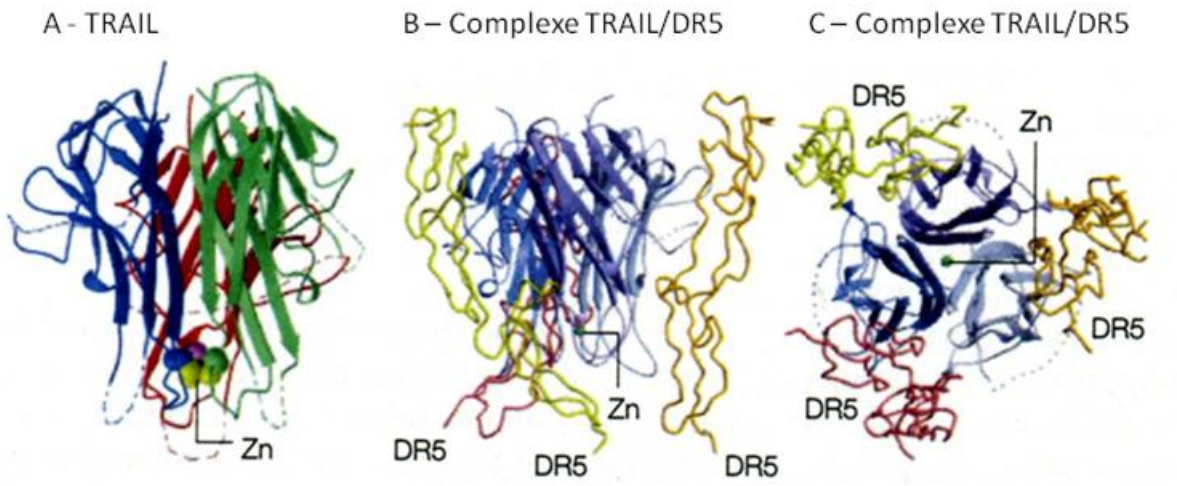


Figure 38 – Structure de TRAIL et interaction avec le récepteur DR5
(d'après Ashkenazi 2002)
A : Diagramme en rubans de TRAIL décrivant les 10 brins β de chaque monomère de couleur différente. L'atome de zinc se situe en coordination au milieu des trois cystéines en position 230 de chaque monomère (représentées par des sphères jaunes, bleues et rouge) et qui stabilise l'homotrimère. B et C : Interaction de l'homotrimère avec le récepteur DR5 (B, vue de profil et C vue de dessus). Chaque récepteur se lobe dans le sillon formé par l'interface de deux monomères de TRAIL. Chaque récepteur interagit avec TRAIL via ses deux domaines CRD (Cystein-Rich Domain). L'atome de zinc est visible en position centrale de l'homotrimère de TRAIL.

boucle pénètre dans le site de liaison au récepteur. La mutation des résidus 137 à 152 de cette boucle conduit à une forte diminution de l'affinité de TRAIL pour DR5 (Cha et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 1999).

TRAIL peut être produit sous deux formes, soluble et membranaire, en fonction du type cellulaire et du signal (Ehrlich et al., 2003). La forme membranaire peut être clivée et libérée dans le milieu environnant. Qu'il soit soluble ou membranaire, TRAIL agit sous forme de trimère qui lie trois récepteurs (figure 38) (Hymowitz et al., 1999; Mongkolsapaya et al., 1999). Un atome de zinc lié par coordination aux trois cystéines en position 230 de chaque monomère est essentiel à l'activité biochimique optimale du TRAIL (Bodmer et al., 2000), (Hymowitz et al., 2000). La mauvaise intégration de cet atome ou le changement d'une cystéine en un autre acide aminé fait perdre au ligand TRAIL toute activité apoptotique. En plus de stabiliser la forme trimérique de TRAIL, le zinc empêche l'oxydation des cystéines qui conduisent à la formation de dimères et entraînent une agrégation de TRAIL. Ceci pourrait expliquer les effets toxiques de TRAIL parfois observés sur des hépatocytes humains (Jo et al., 2000; LeBlanc and Ashkenazi, 2003).

1.3. Expression du ligand TRAIL

Le transcrit et/ou la protéine TRAIL ont été identifiés dans de nombreux tissus excepté le cerveau (Grataroli et al., 2004; Spierings et al., 2004; Wiley et al., 1995).

1.4. Rôles physiologiques de TRAIL

1.4.1. Surveillance anti-tumorale

Les souris dont le gène codant pour TRAIL a été invalidé sont viables et fertiles et ne présentent pas de défauts histologiques et hématologiques. TRAIL ne semble donc pas avoir de rôle important au cours du développement. Cependant, l'étude de ces souris KO présentent une augmentation des métastases dans le foie après infection par des cellules cancéreuses, et une formation précoce des tumeurs induites par l'agent chimique carcinogène MCA (3-Methylcholanthren) (Cretney et al., 2002; Sedger et al., 2002). De façon intéressante, ces souris présentent une diminution de la cytotoxicité des cellules NK. L'utilisation d'anticorps bloquant le TRAIL montre des résultats identiques comparables (Takeda et al., 2001). TRAIL contribue donc, via les cellules NK, à la protection contre l'initiation de tumeurs et les métastases.

Ce rôle anti-tumoral semble, en outre, sous contrôle de l'IFN-γ et est absent chez la souris invalidée pour ce gène (Ruiz de Almodovar et al., 2004; Takeda et al., 2001). Le gène de

TRAIL est en effet un des premiers gènes induit par les IFN (Gong and Almasan, 2000; Sato et al., 2001). L'expression de TRAIL est augmentée dans les monocytes stimulés par l'IFN-γ, tandis que DR5 est diminuée. Ces monocytes ont donc un pouvoir anti-tumoral supérieur et sont insensibles au TRAIL (Griffith et al., 1999).

1.4.2. Défense antivirale

Les types cellulaires impliqués dans la surveillance anti-tumorale comme les cellules NK, les cellules T, les monocytes et les cellules dendritiques, le sont aussi dans la défense anti-virale. Les interférons sont des acteurs majeurs de l'organisation de cette défense.

L'expression de TRAIL n'est pas restreinte au système immunitaire. Il est présent sous forme membranaire dans les fibroblastes tandis qu'il est synthétisé sous forme soluble par un grand nombre de lignées cellulaires cancéreuses. Des fibroblastes infectés par le cytomégalovirus (CMV) régulent positivement TRAIL et ses récepteurs de mort sous l'action des IFN, devenant ainsi plus sensibles à l'action du TRAIL. Par contre, les cellules voisines non infectées régulent négativement TRAIL et ses récepteurs (Sedger et al., 1999).

Les preuves de ce rôle anti-viral de TRAIL ont été apportées chez la souris par l'étude du virus de l'encéphalomyocardite. Dans ce modèle, les souris traitées par un anticorps antagoniste de TRAIL meurent plus tôt et présentent une charge virale supérieure aux souris non-traitées (Sato et al., 2001). Ce processus est dépendant des cellules NK.

Cependant, les virus ont développé des stratégies empêchant ou tout du moins retardant l'apoptose. Les virus Herpès par exemple produisent un homologue de c-FLIP, nommé v-FLIP qui interagit au niveau du DISC de Fas notamment (Thome et al., 1997).

1.4.3. Rôle dans la prévention de l'inflammation auto-immune

Chez la souris, l'arthrite auto-immune provoquée par l'administration de collagène de type II est inhibée par TRAIL (Hilliard et al., 2001; Song et al., 2000). Dans ce processus, TRAIL bloque la production de cytokines (IFN-γ), d'anticorps et la prolifération de lymphocytes T sans induire d'apoptose. Les souris invalidées pour TRAIL montrent un défaut d'apoptose des thymocytes et une augmentation des maladies auto-immunes (Lamhamedi-Cherradi et al., 2003).

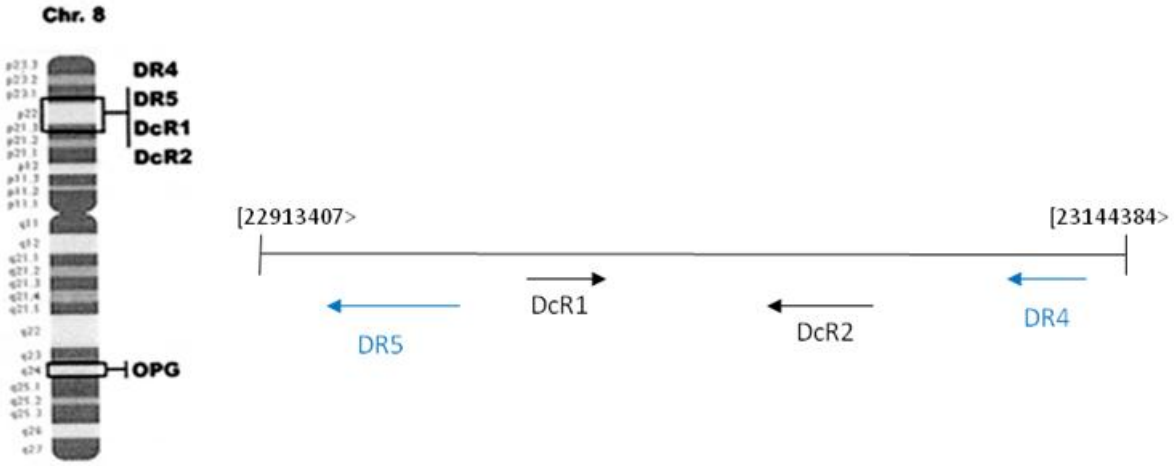


Figure 39 – Localisation des gènes récepteurs au TRAIL.
Les gènes *dr4, dr5, dcr1* et *dcr2* sur le chromosome 8 en position p22-21. A droite, les flèches représente le sens de transcription des gènes. Le Gène *opg* est en position 8q24.

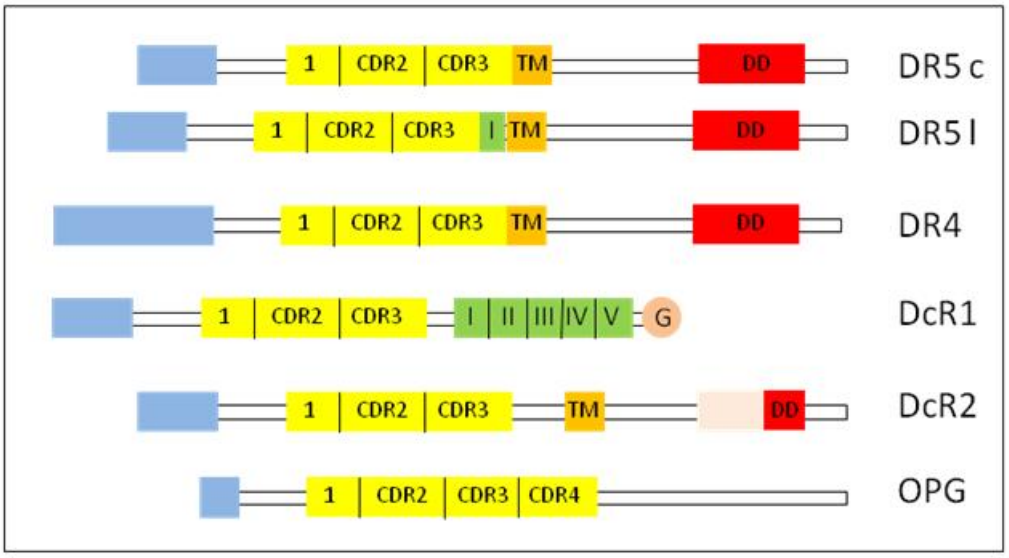


Figure 40 – Structure des récepteurs au TRAIL.
Le domaine bleu représente le peptide signal. Les domaines jaunes représentent les régions riches en cystéine (CDR : Cystein Rich Domain) numérotées par analogie au TNF-RI. Le domaine 1 est homologue au CDR1 de TNF-RI et Fas. Le domaine transmembranaire sont noté TM en orange. Les domaines de mort (DD) apparaissent en rouge; celui de DcR2 est tronqué et DcR1 n'en a pas. Il contient cependant cinq pseudo-répétitions dans son domaine extracellulaire, et se lie à la membrane par une ancre glycophosphatidylinositol (G). La forme longue de DR5 (DR5 l) contient une cinq des pseudo-répétitions de DcR1.

2. Les récepteurs de TRAIL

L'interaction de TRAIL avec cinq récepteurs différents (2 récepteurs de mort et 3 récepteurs leurres) est un modèle unique au sein de la superfamille du TNF-α et pose des questions sur leur raison d'être et le mode fonctionnement de cet ensemble. En se liant à DR4 et DR5, TRAIL est capable d'induire l'apoptose, tandis que les récepteurs leurres DcR1, DcR2 et OPG protègent les cellules de ce processus. L'affinité de TRAIL pour ces récepteurs est variable. La constante de dissociation est respectivement de 2, 70, 200 et 400 nM pour DR5, DR4, DcR1 et OPG (Truneh et al., 2000).

2.1. Aspects structuraux

Les gènes codant pour les cinq récepteurs au TRAIL sont situés sur le chromosome 8 en position p22-21 pour *dr4, dr5, dcr1* et *dcr2* et en position q24 pour le gène *opg* (figure 39).

DR4 a été le premier récepteur de TRAIL identifié (figure 40). La séquence d'ADN isolée code pour une protéine de 468 résidus mais dont la forme mature n'en compte que 444 du fait de l'excision du peptide signal (Pan et al., 1997b). Il est composé de domaines riches en cystéine, CRD2 et CRD3 par analogie à ceux de TNF-RI, et d'un domaine de mort présentant 30% d'homologie avec celui de TNF-RI et seulement 19% avec celui de Fas.

DR5 a été découvert par plusieurs groupes simultanément (Chaudhary et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Sheridan et al., 1997). La protéine initiale est formée de 411 résidus, la forme mature de 358. DR5 comporte deux CRD ayant 55% d'homologie de séquence avec DR4, et possède 64% des acides aminés de son DD identiques à DR4. Par ailleurs, Sreaton *et al.* ont identifié deux formes distinctes de DR5, une forme courte et une forme longue qui possède 29 résidus en plus entre les domaines CRD3 et transmembranaire (Screaton et al., 1997).

DcR1 est le premier récepteur leurre identifié. Le précurseur protéique contient 259 résidus contre 233 pour la forme mature. DcR1 contient également deux domaines CRD. Ne possédant pas de domaine transmembranaire, DcR1 est relié à la membrane plasmique par une ancre lipidique (groupement GPI).

DcR2 est homologue à 67% à DcR1. Le précurseur contient 386 résidus et la forme mature qui en compte 331, est dotée de deux domaines CRD, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine de mort intracellulaire tronqué. Il ne contient pas les résidus indispensables à l'activité du domaine de mort de TNF-RI qui sont par ailleurs conservés sur DR4 et DR5 (Marsters et al., 1997).

Enfin, le récepteur **OPG** était connu initialement pour ses fonctions dans la régulation de la masse osseuse (Simonet et al., 1997). Le précurseur protéique comporte 401 résidus tandis que la forme mature en compte 380. OPG contient quatre domaines CRD et est dépourvu de domaine transmembranaire ce qui implique qu'il est exclusivement soluble. De plus, deux DD juxtaposés de fonction inconnue sont présents en position C-terminale, un domaine de liaison à l'héparine et une cystéine (Cys400) indispensable à la dimérisation de l'OPG, forme extracellulaire prépondérante.

2.2. Expression des récepteurs au TRAIL

Comme pour le ligand TRAIL, les récepteurs DR4, DR5, DcR1et DcR2, sont exprimés dans un grand nombre de tissus sains (Marsters et al., 1997; Sheridan et al., 1997).

Van Noesel *et al.* ont montré l'absence d'expression des récepteurs DcR1 et DcR2 dans 80% et 70% des lignées neuroblastomes et neuro-ectodermales testées alors que les tissus sains correspondants expriment ces récepteurs leurres (van Noesel et al., 2002). Cette diminution d'expression est associée à l'hyperméthylation des régions promotrices de ces gènes. L'hyperméthylation de gènes *dcr1* et *dcr2* a été observée dans 60% des cancers de la prostate, 61% des cancers du sein, 31% des cancers du poumon, 42% des cancers de la vessie, 100% des cancers du col de l'utérus, 43% des cancers ovariens, 41% des lymphomes, 26% des leucémies et 56% des mélanomes multiples alors que les gènes *dr4* et *dr5* ne sont pas ou très peu hyperméthylés (Shivapurkar et al., 2004).

2.3. La signalisation par les récepteurs de TRAIL

2.3.1. Apoptose induite par DR4 et DR5

La cascade de signalisation induite par la liaison du TRAIL à DR4 et DR5 est très semblable à celle du récepteur Fas. La liaison de TRAIL provoque la trimérisation intracellulaire des récepteurs et le recrutement rapide de FADD et de la caspase 8 et 10 (Sprick et al., 2000). L'activation de la caspase 10 a été mise en évidence dans des cellules déficientes en caspase 8 (Kischkel et al., 2001). Cette caspase semble jouer un rôle majeur dans l'apoptose des lymphocytes auto-immuns induite par TRAIL et FasL. En effet, les patients atteints d'un syndrome lymphoprolifératif auto-immun de type II ont une déficience en caspase 10 active et présentent un défaut d'apoptose des lymphocytes T et des cellules dendritiques (Wang et al., 1999).

Comme pour Fas, l'activation de la caspase 3 intervient soit directement, soit par l'intermédiaire du clivage de Bid et de l'activation de la voie mitochondriale selon les cellules.

2.3.2. Invalidation du gène TRAIL-R

Chez la souris, un unique récepteur de mort a été identifié, TRAIL-R, montrant des homologies avec les récepteurs humains DR4 et DR5, et qui est capable d'induire l'apoptose via FADD et la caspase 8. Deux récepteurs leurres murins ont aussi été identifiés par homologies avec l'homme : mDcTRAILR1 qui possède un ancre GPI et mDcTRAILR2 qui existe sous deux formes, sécrété et transmembranaire (Schneider et al., 2003). En plus de ces 3 récepteurs murins spécifiques au TRAIL, l'OPG est aussi capable de lier le TRAIL et d'agir comme un récepteur leurre soluble comme chez l'homme (en plus du ligand RANK).

L'invalidation de TRAIL-R chez la souris entraîne une stimulation de la réponse immunitaire innée (Diehl et al., 2004). En effet, suite à l'infection des souris KO par le cytomégalovirus murin, l'expression de TRAIL et la production de cytokines comme IFN-γ est supérieure par rapport aux souris sauvages. Ces résultats montrent que TRAIL-R a un rôle régulateur négatif de synthèse de cytokines dans la réponse immunitaire innée. Très récemment, deux études montrent que les souris invalidées pour TRAIL-R développent plus de tumeurs et métastases que les souris contrôles et présentent une augmentation du processus inflammatoire (Finnberg et al., 2008; Grosse-Wilde et al., 2008). Le récepteur TRAIL-R agit donc comme protecteur de l'organisme contre la formation des tumeurs et métastases.

2.3.3. Rôles de récepteurs leurres

Mérino *et al.* ont montré que DcR1 et DcR2 inhibent l'apoptose induite par TRAIL de façon différente (Merino et al., 2006). DcR1 agit comme compétiteur de liaison du TRAIL aux dépends des récepteurs de mort, empêchant ainsi l'assemblage du DISC alors que DcR2 est co-recruté avec DR5 dans le DISC où il inhibe l'activation des caspases initiatrices. De plus, DcR2 empêche le recrutement de DR4 dans la formation du DISC induite par DR5. Une autre étude a montré que la formation du complexe DcR2-DR5 se fait par interaction des domaines PLAD présents dans le premier domaine CRD de chaque récepteur (Clancy et al., 2005). La formation de ce complexe est indépendante de la liaison avec le ligand TRAIL et régule la sensibilité des cellules T à l'apoptose du TRAIL.

2.3.4. Voie de signalisation de NF-κB

Comme FasL et TNF-α, TRAIL peut induire l'activation de la voie de signalisation de NF-κB. Ce rôle positif de TRAIL sur la survie et la prolifération cellulaire a été montré sur des cellules normales (lymphocytes et cellules endothéliales) et des cellules cancéreuses (tumeurs et métastases initialement résistantes à l'apoptose due au TRAIL) (Di Pietro and Zauli, 2004; Ehrhardt et al., 2003; Trauzold et al., 2006).

Les activations de NF-κB et de c-Jun N-terminal Kinase (JNK) peuvent être induites par DcR2 et par DR4 et DR5 via le recrutement de TRADD, TRAF2 et RIP, et indépendamment de l'activation des caspases 8 et 10 (Chaudhary et al., 1997; Degli-Esposti et al., 1997; Muhlenbeck et al., 1998; Schneider et al., 1997).

NF-κB est un facteur de transcription qui une fois activé va dans le noyau médier soit la survie cellulaire soit l'apoptose selon le type cellulaire et la situation physiologique. Parmi les gènes anti-apoptotiques, NF-κB régule positivement les gènes cIAP 1 et 2, TRAF1 et 2, FLIP et Bcl-$_{xl}$ (Di Pietro and Zauli, 2004). Ce double rôle de NF-κB dans la survie ou l'apoptose induites par TRAIL dépend de l'expression relative de deux de ses sous-unités, RelA et c-Rel (Chen et al., 2003). L'inhibition de RelA induit, alors que l'inhibition de c-Rel bloque, l'apoptose due au TRAIL.

3. Applications thérapeutiques

L'utilisation de TRAIL ou de ses voies de signalisation dans les thérapies anticancéreuses présente un intérêt certain, étant donné ces différents rôles et sa non-toxicité.

3.1. Action des drogues sur la signalisation du TRAIL

Certaines drogues permettent l'augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses au TRAIL en augmentant les expressions des récepteurs de mort. C'est le cas de la 8-chloro-adénosine, un agent anti-cancéreux qui stimule l'activité anti-tumorale du TRAIL sur une lignée hépatocytaire (BEL-7402) en augmentant DR5, diminuant DcR1 et en inactivant la voie NF-κB (Wang et al., 2004). De même, le paclitaxel, la vincristine, la vinblastine, l'étoposide, la camptothécine et la doxorubicine sensibilisent les cancers de prostate à TRAIL à la fois *in vitro et in vivo* en augmentant l'expression de DR4 et DR5, mais aussi de Bax et Bak (Nimmanapalli et al., 2001; Shankar et al., 2004). De même, l'expression de FLIP peut-être régulée induite par TRAIL (El-Zawahry et al., 2005).

L'actinomycine D, un agent bloquant la transcription des gènes, permet la diminution rapide de XIAP dans les cellules cancéreuses de prostate LNCaP (Ng and Bonavida, 2002). L'implication d'XIAP dans la résistance au Taxol de ces mêmes cellules ou dans la résistance au cysplatine des cellules hormono-indépendantes DU145 suggère l'importance du ciblage thérapeutique de cette molécule (Amantana et al., 2004; Nomura et al., 2003).

De plus, la combinaison de TRAIL et des thérapies conventionnelles, irradiation et chimiothérapie, a montré des effets synergiques *in vitro* et *in vivo* qui pourraient limiter l'apparition de formes cancéreuses résistantes incurables (El-Zawahry et al., 2005). Des tumeurs mammaires greffées chez la souris répondent de façon synergique au traitement combiné par TRAIL et des radiations (Chinnaiyan et al., 2000).

Enfin, les inhibiteurs des histones désacétylases ont un effet inducteur d'apoptose spécifique aux cellules leucémiques et pas des cellules normales via l'augmentation des expressions de TRAIL, DR5, FasL et Fas (Insinga et al., 2005). Ces molécules sont prometteuses dans la thérapie anticancéreuse.

3.2. Utilisation du TRAIL en thérapie anticancéreuse

L'absence de toxicité systémique chez le rongeur et le primate non humain, son rôle physiologique de surveillance tumorale et sa potentialisation par de nombreuses molécules chimio-thérapeutiques et l'irradiation, sont autant d'arguments permettant d'envisager des résultats positifs sur les formes cancéreuses les plus avancées.

L'évaluation *in vitro* et *in vivo* du potentiel thérapeutique de TRAIL a nécessité la production de molécules recombinantes actives. La forme la plus active correspond aux acides aminés 114 à 281 et est dénuée de toute séquence exogène ajoutée. Sa production a été optimisée pour assurer une bonne intégration du zinc indispensable à sa solubilité et son activité. Ce peptide recombinant favorise la formation de trimères (99%) et semble dénué totalement de toxicité à la fois *in vitro et in vivo* (Kelley et al., 2001). Les hépatocytes et kératinocytes, décrits comme sensibles à la forme de TRAIL poly-histidine, sont insensibles à cette molécule (Ashkenazi et al., 1999; Lawrence et al., 2001). Enfin, cette forme n'a montré aucune toxicité lors de son injection chez le primate non humain (Kelley et al., 2001). L'injection intra-tumorale d'un adénovirus délivrant cette forme trimérique de TRAIL réduit considérablement la croissance tumorale de gliomes humains chez la souris nude (Kim et al., 2006a).

Il est également possible de cibler la voie de signalisation du TRAIL par utilisation d'anticorps agonistes qui ciblent spécifiquement DR4 ou DR5. Leur fonctionnalité a été démontrée sur des souris immunodéficientes, soit par action agoniste pur soit par agrégation

des récepteurs qui conduit à l'apoptose (Ichikawa et al., 2001). MacFarlane *et al*. soulignent l'importance de déterminer la voie apoptotique la plus efficace (passant par DR4 ou DR5) selon le type de cellules primaires, afin d'optimiser la thérapie au TRAIL (AC spécifique de DR4 ou DR5) (MacFarlane et al., 2005). L'anticorps monoclonal agoniste de DR4 appelé Mapatumumab, a récemment été testé dans une étude clinique de phase I et ne montre pas de toxicité hépatique (Tolcher et al., 2007). Bien que l'activité anti-tumorale ne fût pas la priorité de l'étude, aucune réponse clinique n'a été observée. A la suite de cette publication, plusieurs scientifiques ont lancé un appel à la prudence concernant les thérapies potentielles ciblant la voie de signalisation du TRAIL (Dyer et al., 2007; Gajewski, 2007). Ils estiment que le passage aux études cliniques est prématuré et néglige les problèmes biologiques et cliniques liés aux mécanismes de résistance au TRAIL.

Tout d'abord, si les lignées cellulaires sont en grande partie sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, de nombreuses cellules cancéreuses primaires se révèlent résistantes bien qu'elles expriment les récepteurs au TRAIL (Dyer et al., 2007). D'autre part, il a été observé que des lignées cellulaires initialement sensibles à l'apoptose induite par TRAIL *in vitro*, deviennent résistantes *in vivo*, mettant en cause le rôle des cellules stromales ou des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (Muerkoster et al., 2004; Trauzold et al., 2006). Enfin, le TRAIL a montré un effet inverse, stimulant la croissance tumorale et métastatique via la signalisation de NF-κB dans certaines conditions (Malhi and Gores, 2006; Trauzold et al., 2006).

En raison des nombreuses possibilités de résistances à l'apoptose induite par TRAIL (récepteurs leurres, FLIP, IAP, NF-κB), plusieurs scientifiques s'accordent sur l'importance de combiner les traitements. Actuellement, Mapatumumab est en essai clinique de phase II, combiné à un inhibiteur du protéasome, le Bortezomib, qui empêche l'activation de NF-κB (Malhi and Gores, 2006). Enfin, Gajewski pose la question trouver un moyen de sélectionner les patients pour enrichir la population qui répond à l'apoptose induite par TRAIL afin d'éviter les effets stimulateurs du TRAIL sur des tumeurs résistantes (Gajewski, 2007).

III. Apoptose dans la prostate normale et pathologique - Implication du TRAIL

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les androgènes ont un rôle primordial dans le développement et la croissance de la prostate. Depuis la découverte de Huggins qui a utilisé la privation androgénique pour traiter les patients ayant des cancers prostatiques avancés, la compréhension du rôle des androgènes dans le développement, la progression et le traitement du cancer prostatique est indispensable, particulièrement concernant les mécanismes d'apoptose.

1. La prostate normale

Chez le rat, la castration qui induit une régression de la prostate ventrale par apoptose est corrélée avec une augmentation de l'expression de Fas (de la Taille et al., 1999). Cependant, cette régression prostatique a lieu également dans les souris castrées invalidées pour Fas comme dans les souris normales, montrant que Fas n'est pas essentiel dans ce processus apoptotique et est probablement remplacé par d'autres acteurs apoptotiques. L'apoptose dans la prostate ventral de rat induite par la castration est corrélée à l'augmentation de l'expression et de l'activation des caspases effectrices 3 et 6 mais pas de la caspase 8, et à une diminution de l'expression de FLIP (Nastiuk et al., 2003; Omezzine et al., 2003b). Le promoteur du gène Flip contient plusieurs éléments de réponse aux androgènes et les androgènes stimulent son expression (Cornforth et al., 2008; Gao et al., 2005).

2. Le cancer de la prostate

2.1. Le rôle des androgènes dans l'apoptose induite par les ligands de la famille du TNF-α

Etant donné que la privation androgénique induit l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-sensibles, un des rôles des androgènes est d'exercer une protection des cellules contre l'apoptose par différents mécanismes. Les androgènes inhibent l'activation des caspases, l'expression de Bax et le clivage de Bid par les traitements des cellules au TNF-α et FasL (Kimura et al., 2001). Rokhlin et al. ont montré que les androgènes favorisent la formation du DISC par TRAIL. (Rokhlin et al., 2002). Dans cette étude, les androgènes stimulent les expressions de DR4 et DR5 ainsi que leur recrutement dans le DISC.

Les recrutements de FADD et de la caspase 8 dans le DISC nécessaires à l'induction d'apoptose, sont amorcés par l'ajout de TRAIL dans le milieu, uniquement en présence d'androgènes.

2.2.Les modifications d'expressions

In vitro, les androgènes régulent l'expression de DR4 et DR5 dans la lignée LNCaP bien qu'aucun élément de réponse aux androgènes n'ai été trouvé sur les promoteurs des gènes correspondants (Rokhlin et al., 2002).

In vivo, une hyperméthylation de Fas corrélée à une perte d'expression a été observé dans les tumeurs prostatiques, alors que l'expression de FasL est stimulée dès le stade du PIN (O'Kane et al., 2006). De façon surprenante, l'hyperméthylation de promoteurs corrélée à 70-100% avec une perte d'expression des protéines correspondantes, des gènes *dcr1* et *dcr2* est très fréquente dans les cancers prostatiques (60%) mais rare concernant les récepteurs de mort DR4 et DR5 (Shivapurkar et al., 2004). Cependant, deux études récentes réalisées par le même groupe montrent que l'augmentation de DcR2 est corrélée à un score de Gleason élevé, à la récurrence du PSA ainsi qu'à une diminution de la survie (Koksal et al., 2008; Sanlioglu et al., 2007b). Inversement, une forte expression du ligand TRAIL est corrélée à une augmentation de la survie des patients.

Les expressions d'autres protéines anti-apoptotiques comme FLIP, Bcl-$_{XL}$ et XIAP sont stimulées dans les cancers prostatiques participant ainsi à la résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par TRAIL entre autres (O'Kane et al., 2006).

L'OPG est exprimée par les cellules cancéreuses prostatiques *in vitro* et plusieurs études ont montré qu'elle augmente la survie de cellules tumorales. Néanmoins, les modèles animaux de cancer prostatique ne montrent pas que l'OPG affecte la croissance tumorale (Holen and Shipman, 2006). L'analyse du sérum révèle cependant que l'OPG est plus élevée chez les patients ayant des métastases dans les os et pourrait être utilisée comme marqueur pronostic et informer sur la récurrence de la maladie (Eaton et al., 2004).

2.3.Les mécanismes de résistance cellulaires à l'apoptose induite par TRAIL

Un grand nombre de mécanismes moléculaires peuvent participer à la résistance de l'apoptose du TRAIL dans le cancer prostatique. Ils sont représentés dans la figure 41 (Bucur et al., 2006). Sont mis en cause une élévation de l'activité d'Akt, une perte de PTEN, une activation constitutive de NF-kappaB, la privation androgénique, une augmentation des expressions de

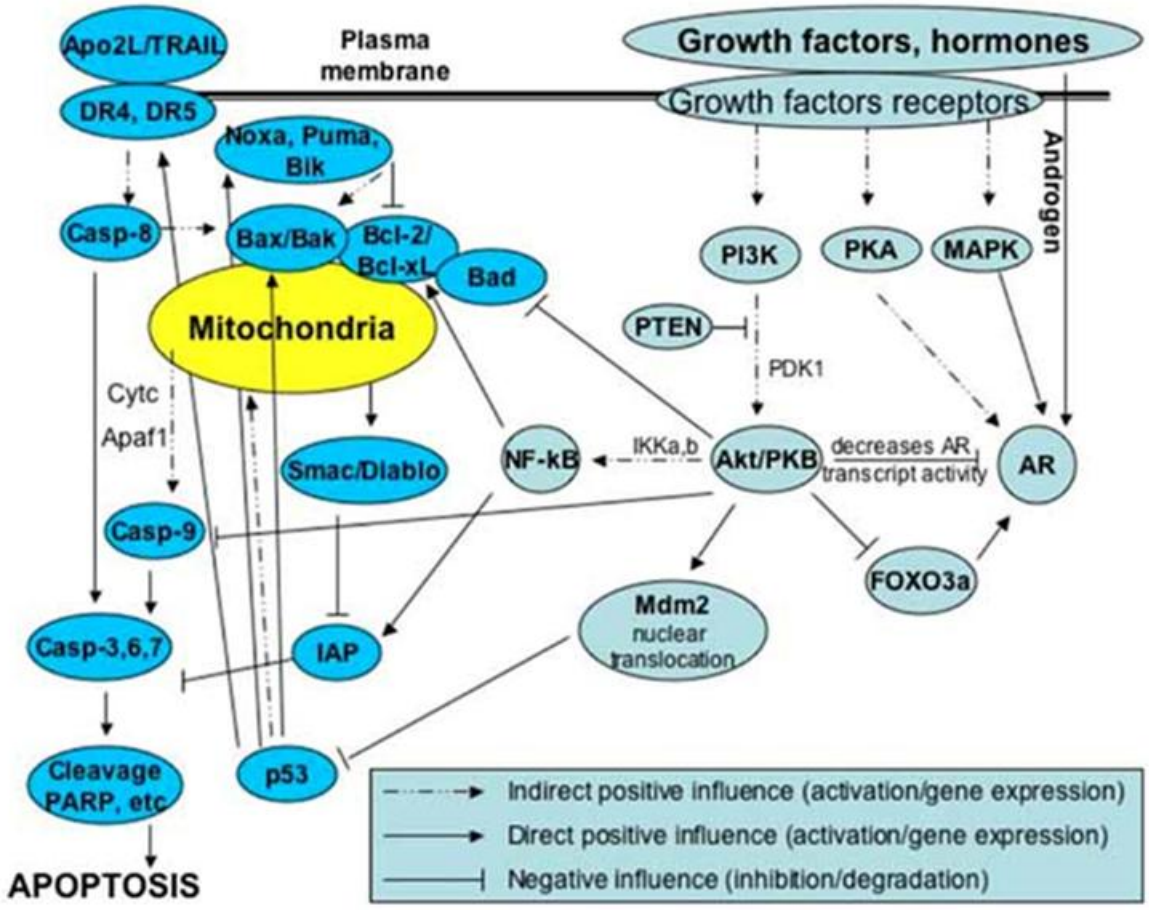


Figure 41 – Modulation de l'apoptose induite par TRAIL par les facteurs de survie (d'après Bucur *et al.* 2006).
Akt diminue l'activité transcriptionnelle du RA et son expression en inhibant le facteur de transcription FOXO3a et en stimulant la phosphorylation du RA qui conduit à son ubiquitination et sa dégradation. Par contre, la stimulation de MAPK stimule la transcription du RA et la PKA active le RA en absence d'androgènes. Akt inhibe l'apoptose en phosphorylant Bad et la pro-caspase 9. NF-kappaB augmente l'expression de gènes de survie comme les IAP, Bcl-2 et Bcl-xL. PTEN inhibe l'activité de la PIK/AKT donc le taux d'Akt.

FLIP, XIAP, Bcl-2 et Bcl-xL, l'activation de c-jun N-terminal kinase et les taux de PKCeta et de l'OPG.

Nous avons vu précédemment que les traitements à court terme du bicalutamide sur les cellules cancéreuses prostatiques induisent l'apoptose entre autres via une augmentation de l'expression de DR4 (chapitre I, §6.4). Par contre, plusieurs mécanismes de résistance à l'apoptose au bicalutamide se développent suite à des traitements effectués sur du long terme. Récemment, Mitterberger et al. ont montré que la sous-lignée LNCaP-Bic, traitées de façon chronique au bicalutamide, est plus résistante à l'apoptose induite par TRAIL que la lignée parentale. Aucun changement d'expression des récepteurs au TRAIL n'a été mis en évidence ; en revanche, le traitement au TRAIL des cellules LNCaP-Bic augmente l'expression de Bcl-2 de 50%, vraisemblablement responsable de l'inhibition de l'activation des caspases 8 et 9 (Mitterberger 2007). Cette étude suggère que suite au traitement hormonal par bicalutamide, les cellules de cancer prostatiques développent des mécanismes de résistance au TRAIL, normalement impliqué dans la surveillance tumorale.

2.4.Sensibilisation à l'apoptose induite par TRAIL

Fréquemment, la combinaison des traitements avec TRAIL est utilisée pour sensibiliser et potentialiser l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (voir § II 3.). Concernant les tests effectués sur les cancers de la prostate, des molécules chimiothérapeutiques comme la doxorubicine à concentration subtoxique, l'irradiation, et des composants comme le sélénium et le curcumin ont montré des effets synergiques avec le TRAIL sur l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Kang et al., 2005; Shankar et al., 2008; Shankar et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005). En effet, les récepteurs de mort DR4 et DR5 sont surexprimés avec les traitements ainsi que des protéines de la voie mitochondriale (Bax, Bak). Par contre, les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, FLIP et NF-κB sont sous-régulées et par conséquence, les caspases sont activées (El-Zawahry et al., 2005). Parmi toutes ces publications, une seule montre une abolition complète des tumeurs (PC3) *in vivo* et utilise un traitement séquentiel de l'irradiation puis du TRAIL (Shankar et al., 2004).

A noter que l'application du ligand TRAIL sur des cellules épithéliales prostatiques humaines normales a montré qu'elles sont résistantes à l'apoptose induite par le ligand (Ashkenazi and Dixit, 1999; Hesry et al., 2006; Shankar et al., 2005; Tong and Li, 2004).

-III-
RESULTATS

-III-RESULTATS

~

Le ligand TRAIL suscite de nombreux intérêts d'un point de vue thérapeutique anticancéreuse. Néanmoins il existe des différences de sensibilité entre cellules cancéreuses en fonction de leur origine et de leur agressivité. Concernant le cancer de la prostate, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'apoptose hormonodépendante paraît nécessaire pour combattre plus efficacement ce cancer et offrir aux patients de nouvelles possibilités de traitements.

Le but de ma thèse a été d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par les androgènes dans la prostate normale et pathologique.

Dans notre premier et second travail, nous avons étudié la régulation par les androgènes de l'expression de TRAIL et ses récepteurs dans la prostate ventrale de rat et dans la lignée LNCaP de cancer prostatique humain androgénosensible. Nous avons également modulé l'expression de certains de ces récepteurs pour étudier leur implication dans l'apoptose des cellules LNCaP induite par TRAIL.

Dans notre troisième travail, nous avons utilisé un modèle animal de cancer prostatique humain hormonosensible dans le but d'étudier la régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par la privation androgénique *in vivo*. La majeur partie de dernier travail a consisté à comprendre l'action de l'anti-androgène bicalutamide dans notre modèle.

1- Régulation du ligand TRAIL et de ses récepteurs par les androgènes dans la prostate ventrale de rat

Le développement, la maintenance et la fonction de la prostate requièrent la présence des androgènes. La privation androgénique entraîne donc une régression de la prostate par apoptose. Précédemment, nos travaux ont identifié la présence de TRAIL et ses quatre récepteurs dans la prostate ventrale de rat. L'objectif de cette étude est d'analyser l'expression de TRAIL et ses récepteurs au cours de l'apoptose de la prostate ventrale de rat induite par la privation hormonale soit par castration physique, soit par castration chimique (flutamide).

La castration physique induit une diminution du poids des prostates ventrales de 50% après trois jours de privation androgénique ainsi qu'une augmentation significative du nombre de cellules épithéliales en apoptose. La supplémentation en testostérone immédiatement après la castration empêche la diminution du poids des prostates ventrales et l'augmentation des cellules épithéliales apoptotiques. Les lobes prostatiques craniaux et dorsolatéraux qui ne sont pas sensibles aux androgènes ne présentent aucune variation de masse ni du nombre de cellules en apoptose. L'expression du récepteur DcR2 diminue significativement dans la prostate ventrale de rat après la castration alors que les expressions de TRAIL et des autres récepteurs ne varient pas. Pour confirmer et affiner ces résultats, nous avons utilisé le flutamide, un anti-androgène non-stéroïdien à 50 mg/kg/j pendant 1, 2, 3 et 4 jours de traitement. Comme pour la castration physique, seule l'expression du récepteur DcR2 diminue significativement dans la prostate ventrale dès le premier jour de traitement au flutamide.

La privation androgénique induite par castration physique ou chimique qui entraîne une apoptose massive de la prostate ventrale de rat est corrélée à une diminution de l'expression du récepteur DcR2. Ce récepteur contient un domaine de mort tronqué et ne peut pas transmettre le signal apoptotique contrairement aux récepteurs DR4 et DR5. Ces résultats suggèrent l'hypothèse selon laquelle une diminution du récepteur leurre DcR2 rend le ligand TRAIL plus disponible pour ses récepteurs fonctionnels, induisant ainsi l'apoptose due à ce système.

JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 206:709–717 (2006)

TNF-α-Related Apoptosis-Inducing Ligand Decoy Receptor DcR2 Is Targeted by Androgen Action in the Rat Ventral Prostate

DAVID VINDRIEUX,[1] MARIE RÉVEILLER,[1] ANNE FLORIN,[1] CÉCILE BLANCHARD,[1] ALAIN RUFFION,[1,2] MARIAN DEVONEC,[1,2] MOHAMED BENAHMED,[1] AND RENÉE GRATAROLI[1]*

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Communications Cellulaires en Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Oullins Cedex, France*

[2]*Service d'Urologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, Oullins Cedex, France*

The apoptotic cell death process in the prostate is known to be under the control of androgens. Tumor necrosis factor-α (TNF-α)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a member of the TNF-α family of cytokines, known to induce apoptosis upon binding to its death domain-containing receptors, DR4/TRAIL-R1 and DR5/TRAIL-R2. Two additional TRAIL receptors, DcR1/TRAIL-R3 and DcR2/TRAIL-R4, lack functional death domains and act as decoy receptors for TRAIL. In this study, we examined whether TRAIL and cellular receptors expression was targeted by androgens during the apoptotic cell death process in the hormone sensitive ventral prostate. The role of androgens was investigated using two sets of experiment. (1) Androgen deprivation associated with an apoptotic process resulted in a decrease in DcR2 mRNA and protein expression in the ventral prostate 3 days after castration. Testosterone administration to castrated adult rats prevented the decrease in DcR2 mRNA and protein levels in the ventral prostate. In contrast, DcR2 expression was modified, neither in the dorsolateral nor in the anterior prostate following castration. No changes were observed in DR4, DR5, DcR1, and TRAIL mRNA and protein levels in prostate after castration. (2) A specific decrease in DcR2 expression was observed in the ventral prostate after treatment of rats with the anti-androgen flutamide. Together, the present results suggest that testosterone specifically controls DcR2 expression in the adult rat ventral prostate. Androgen withdrawal, by reducing DcR2 expression, might leave the cells vulnerable to cell death signals generated by TRAIL via its functional receptors. J. Cell. Physiol. 206: 709–717, 2006. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Ligands and receptors of the tumor necrosis factor-α (TNF-α) family trigger cell growth, differentiation, activation, and apoptosis and are mainly involved in the maintenance and function of the immune system (Smith et al., 1994). The best characterized ligands, Fas ligand, TNF-α, and TNF-α-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), are type II transmembrane proteins, which can induce apoptosis in susceptible cells (Nagata, 1997) after binding to type I transmembrane receptors containing cytoplasmic " death domains " leading to activation of the caspase cascade. TRAIL (APO-2 ligand) (Wiley et al., 1995; Pitti et al., 1996) and five TRAIL receptors have been identified. TRAIL-R1 (DR4) (Schneider et al., 1997; Pan et al., 1997b) and TRAIL-R2 (DR5) (Mac Farlane et al., 1997; Pan et al., 1997a) contain a cytoplasmic death domain and transmit an apoptotic signal in response to TRAIL, whereas TRAIL-R3 (DcR1) (Degli-Esposti et al., 1997; Sheridan et al., 1997) is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein lacking an intracellular domain and TRAIL-R4 (DcR2) (Masters et al., 1997; Pan et al., 1998) contains a truncated death domain. TRAIL binding to DcR2 does not lead to activation of the apoptotic machinery and seems to antagonize the signaling of the death domain-containing TRAIL receptors. Finally, osteoprotegerin, a regulator of osteoclastogenesis, has been reported to be a soluble receptor for TRAIL (Emery et al., 1998). Although DR4 and DR5 transcripts and TRAIL mRNA are expressed in many tissues, most normal cells are resistant to apoptosis induction by this ligand (Ashkenazi and Dixit, 1999; Walczak et al., 1999), it has, therefore been suggested that DcR1 and DcR2 receptors may contribute to the physiological resistance to TRAIL. In contrast, several tumor cell lines express DR4 and DR5, but little DcR1 and DcR2 proteins, suggesting that cancer cells may be more sensitive to the TRAIL apoptotic signal. The idea of targeting specific death receptors to induce apoptosis in tumor is attractive and it is particularly intriguing to understand why/how a complex family of death and decoy receptors modulates TRAIL function. In mammalian cells, besides the exogenous " death ligands and death receptors pathway" (Ashkenazi, 2002), effector caspases may be also activated by the endogenous " mitochondrial pathway" (Thornberry and Lazebnik, 1998), which is thought to be triggered by translocation into the mitochondria of proapoptotic members of the Bcl-2 family (Reed, 1998).

We have identified TRAIL and its receptors in adult rat hormone sensitive ventral prostate (Vindrieux et al., 2002) but the factors involved in their expression remain to be investigated. Androgen deprivation by castration induces cell death in the ventral but not in the

Contract grant sponsor: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Contract grant sponsor: Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP); Contract grant sponsor: Ligue Contre Le Cancer: Comité de l'Ardèche.

*Correspondence to: Renée Grataroli, INSERM U-407, Communications Cellulaires en Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine Lyon-Sud, B.P. 12, F-69921 Oullins Cedex, France.
E-mail: gratarol@lsgrisn1.univ-lyon1.fr

Received 18 April 2005; Accepted 1 August 2005

DOI: 10.1002/jcp.20520

© 2005 WILEY-LISS, INC.

dorsolateral or anterior prostate (Kyprianou and Isaacs, 1988; Banerjee et al., 1995; Kwong et al., 1999) and Omezzine et al. (2003b) reported that caspase-3 and -6 expression and activation are targeted by hormone action in castrated rat ventral prostate during the apoptotic cell death process. Many results support the involvement of death receptor pathway in prostatic cell apoptosis (Suzuki et al., 1996; Rokhlin et al., 1997; Liu et al., 1998; Woolveridge et al., 1998; De la Taille et al., 1999). In the present study, we examined whether TRAIL or its true or decoy receptors expression was specifically targeted by androgens during the apoptotic cell death process in prostate. By using two set of experiments, we measured ligand and receptor mRNA and protein levels in ventral prostate (1) from castrated adult rats treated (or not) with androgen and (2) from adult rats exposed to flutamide. The drug flutamide (4′-nitro-3′-trifluoromethyl-isobutyranilide) and its active metabolite hydroxyflutamide are non-steroidal synthetic chemicals able to inhibit the action of androgens at the receptor level (Peets et al., 1974; Omezzine et al., 2003a).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Forty male Sprague–Dawley rats (age, 3 months), composing four groups of 10 animals, were purchased from IFFA CREDO (l′Arbresle, France), housed in controlled conditions, and castrated as previously described (Omezzine et al., 2003b). Control rats were anesthetized with pentobarbital (75 mg/kg body weight) and killed after 3 days by CO_2 inhalation. The castrated group was killed 3 days after surgery. Two other groups of 10 castrated animals, respectively, received s.c. testosterone heptylate (17β-hydroxy-4-androsten-3-one, Theramex, Monaco) at a dose of 1.6 mg/kg, s.c. after castration and daily during 3 and 7 days. The second protocol was related to exposure to the anti-androgen flutamide (Aldrich Chemical Co. Mannheim, Germany) during the adulthood and was designed from previous study (Omezzine et al., 2003a). Twenty four rats (six rats per treatment condition) were administered vehicle control or flutamide (50 mg/kg.d) by daily gavage during 24, 48, 72, or 96 h. One group of six animals exposed to vehicle control was killed at the same time as the 96-h flutamide-treated group. Ventral, dorsal, and lateral prostatic lobes were removed from rats via abdominal route. Each lobe was weighed and divided into two parts. One part was stored in liquid nitrogen for RT-PCR and for Western blotting analysis. The other part of each lobe was fixed in Bouin's fluid, dehydrated in alcohol baths, and embedded in paraffin, for terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry, as previously described (Vindrieux et al., 2002). All studies on animals were conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee.

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL)

To quantify the number of apoptotic cells in prostatic lobes, the TUNEL technique was used as described previously (Omezzine et al., 2003b).

Immunohistochemistry

Tissue sections were treated as described earlier (Vindrieux et al., 2002) and incubated overnight in a humidified chamber at 4°C with the non-immune rabbit or goat sera used as controls or with the following primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA): rabbit polyclonal antibodies raised against human TRAIL and DR4,and goat polyclonal antibodies raised against human DR5, DcR1, and DcR2. According to the manufacturer, anti-TRAIL, anti-DR4, and anti-DcR2 cross-react with rat proteins. The same antibodies have been previously used in the rat testis (Grataroli et al., 2002) and prostate (Vindrieux et al., 2002). Primary antibodies were diluted (TRAIL: 1:100, DR4: 1:250, DR5: 1:300, DcR1: 1:500, DcR2: 1:200) with antibody diluent (Dako Corp., Trappes, France). Secondary antibodies, anti-rabbit or anti-goat immunoglobulins, were attached to a peroxidase-conjugated polymer backbone or biotinylated (respectively, in Envision + kit and LSAB + kit, Dako).

Western blotting analysis

Whole prostate protein extracts were homogenized in five volumes of cold lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF) supplemented with a cocktail of protease inhibitors (Sigma, Isle d'Abeau, France). Protein concentration was determined by the Bradford's method. Protein samples were resolved by 12% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted onto a nitrocellulose membrane treated as described earlier (Vindrieux et al., 2002). The same primary antibodies were used for the Western blotting and immunohistochemical study and they were diluted at 1:1,000. Secondary antibody, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Covalab, Lyon, France), or donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) were diluted at 1:2,000 or at 1:3,000, respectively. The protein loading was checked by reprobing the blot with a rabbit IgG anti-actin antibody (1/500) (Sigma). Whole HeLa cell lysate was used as positive protein control (Santa Cruz Biotechnology). Bound antibodies were detected using the chemiluminescence Western blotting detection kit (Covalab). The Biomax MR films (Eastman Kodak Company, Rochester, NY) were scanned on Gel doc 2000 apparatus (Biorad, Marnes-la-Coquette, France), quantitation was realized with Quantity one Software Biorad.

Isolation of RNA and RT-PCR

Total RNAs were prepared using TRIzol® reagent (Life Technologies, Eragny, France), and the amount was estimated by spectrophotometry at 260 nm. Human HeLa cell total RNA was used as positive control (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Semi-quantitative RT-PCR assays were performed as described earlier (Grataroli et al., 2004) using the primers shown in Table 1. Complementary DNAs were simultaneously

TABLE 1. PCR amplification

Target gene (GeneBank no.)	Primer sequence	Amplified product size (bp)	Temperature (°C)	Number of cycles
TRAIL (NM-003810)	F: GTGTACTTTACCAACGAG R: TTGCTCAGGAATGAATGC	392	55	35
DR4 (NM-003844)	F: CGATGTGGTCAGAGCTGGTACAGC R: GGACACGGCAGAGCCTGTGCCATC	217	55	27
DR5 (NM-147187)	F: GGGAGCCGCTCATGAGGAAGTTGG R: GGCAAGTCTCTCTCCCAGCGTCTC	182	60	30
DcR1 (NM-003841)	F: GCTGAAGAGACAATGAAC R: ACGATCACAAGGAGGAAG	432	50	40
DcR2 (NM-003840)	F: AGCTGTGGTTGTGGTTGG R: GGGTCAAGTACTGGACTG	584	50	28
β-Actin (NG-000840)	F: TTGCTGATCCACATCTGCT R: GACAGGATGCAGAAGGAGAT	146	55/60/50	35/27/30, /40/28

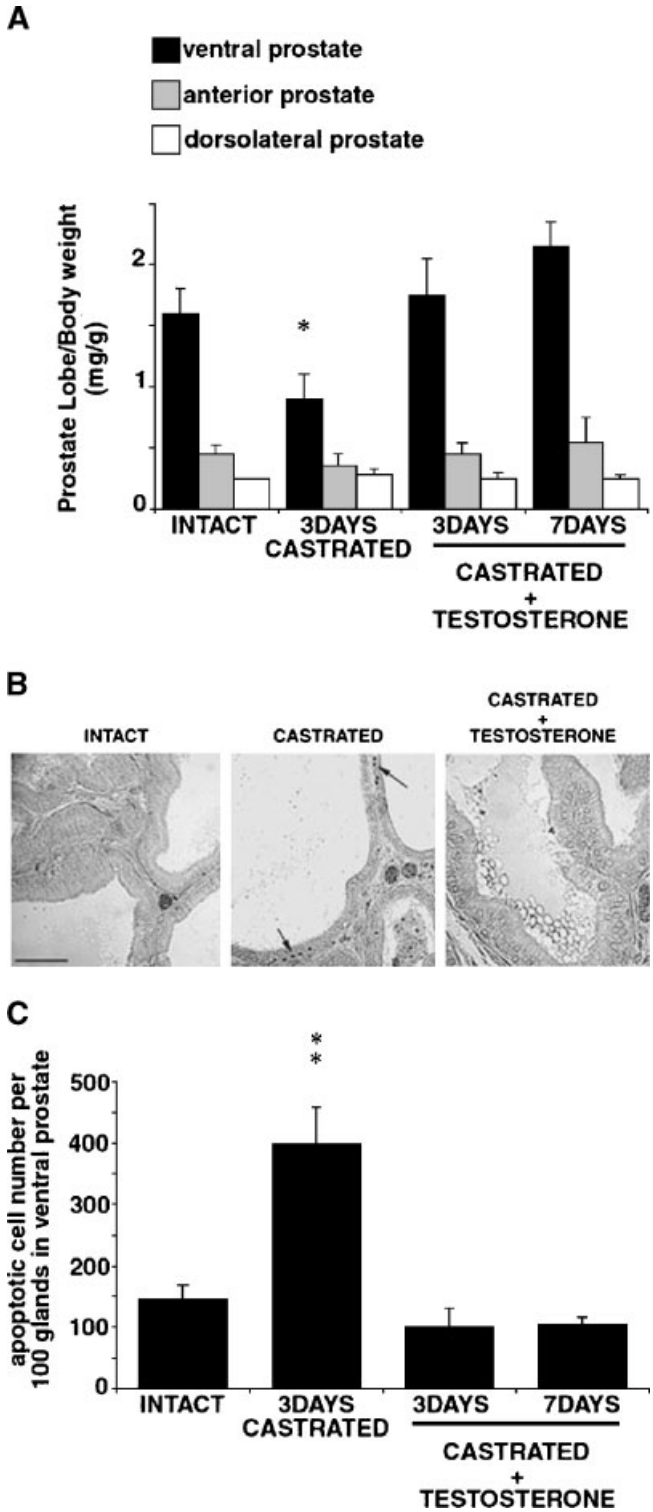


Fig. 1. Effects of castration and testosterone supplementation in adult rats on prostate weight and apoptotic cell death. Histograms show the effects of castration of adult rats treated (or not) with testosterone on (**A**) the weight of ventral, anterior, and dorsolateral prostate and (**C**) the number of apoptotic epithelial cells per 100 glands of ventral prostate. The values are expressed as the mean ± SD determined from ten different animals from different litters. $^{*}P < 0.0005$ versus other animal groups. $^{**}P < 0.001$ versus other animal groups. **B**: Visualization of apoptotic cell death in the ventral prostate using the TUNEL approach in intact rats, at 3-day postcastration, and at 3-days postcastration with testosterone substitution. Scale bars: 220 μm (insert).

amplified in the same conditions with specific or with β-actin oligonucleotide primers in separate tubes. PCR products were separated on an 8% polyacrylamide gel. Dried gels were exposed to phosphor screens (Packard, Meriden, CT). Intensity of bands was estimated by densitometric scanning using the Cyclone Storage Phosphor scanner (Packard). Dried gels were exposed to Biomax MR films, and the autoradiographs were used for the figures. Primers, used in previous studies (Vindrieux et al., 2002; Grataroli et al., 2004), were designed from human sequences and inside separate exons to avoid any bias due to residual genomic contamination. The PCR amplified products were checked by sequence analysis on the ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Data analysis

Data are expressed as the mean ± SD. Immunohistochemistry was performed with five animals per treatment, RT-PCR and Western blot analysis were performed with 6 or 10 animals per treatment. All analyses were performed three times with three independent experimentations. For statistical analysis, one-way ANOVA was performed to determine whether there were differences among all groups ($P < 0.05$), and then the Newman–Keuls post-test was performed to determine the significance of the differences between the pair of groups. A P-value less than 0.05 was considered to be significant. The statistical tests were performed on StatView software (version 5.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC) on a Macintosh computer (Apple, Cupertino, CA).

RESULTS

Validity of the experimental model

In order to investigate the effect of testosterone on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 immunolocalization and expression in the rat prostate, we used castrated adult rats as a model (Omezzine et al., 2003b). These rats were treated, or not, with testosterone. As expected, in a first set of experiments, we observed that castration induces a significant ($P < 0.0005$) loss (−40%) of ventral prostate weight 3 days after castration (Fig. 1A). Testosterone supplementation to the castrated rats for 3 and 7 days allowed the complete ventral prostate weight to be retained. The dorsolateral and anterior prostate lobe weights were not affected in adult rats by castration, or by castration and testosterone replacement (Fig. 1A).

The ventral prostate weight loss was related to a cell death process, as shown by the TUNEL method. TUNEL-positive (i.e., apoptotic) cells were exclusively observed in prostatic epithelial cells (Fig. 1B). Low basal levels of apoptotic prostate cells (−1 apoptotic cell per gland) were observed in the ventral prostate from intact and castrated rats treated by testosterone (3 and 7 days), whereas apoptotic cell numbers increased fourfold ($P < 0.001$) in the ventral prostate from 3-day postcastrated rats (Fig. 1C). No TUNEL-positive cells were observed in anterior and dorsolateral prostate lobes after castration, with or without testosterone replacement (data not shown).

Effect of testosterone on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 immunolocalization and protein levels in rat ventral prostate

In the next experiments, TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 immunostaining was observed in the most androgen responsive ventral lobe of the rat prostate (Fig. 2). Immunostaining of the five proteins was performed in ventral prostate from intact rats, castrated rats, and castrated rats with 3 days (and 7 days, data not

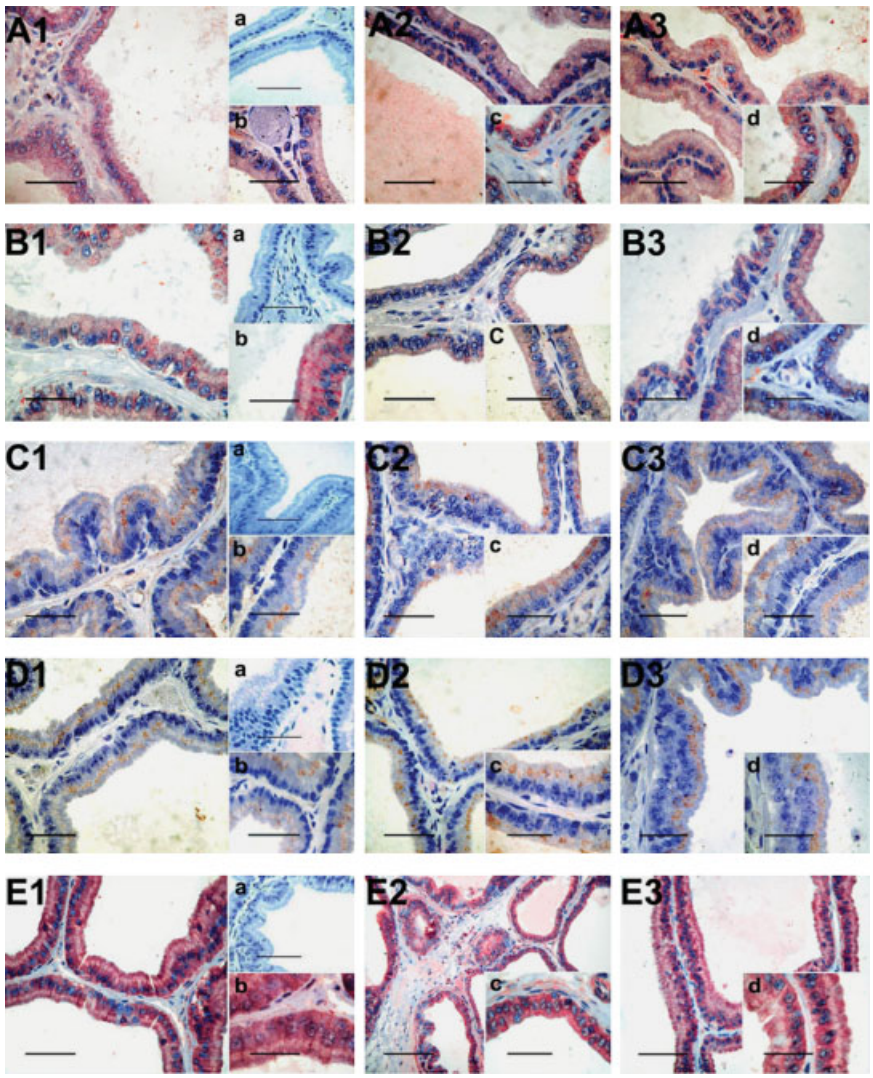


Fig. 2. Effect of castration on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 immunostaining in ventral prostate of adult rats treated (or not) with testosterone. Tissues were fixed, sectioned, and treated with anti-TRAIL (**A1–A3**), anti-DR4 (**B1–B3**), anti-DR5 (**C1–C3**), anti-DcR1 (**D1–D3**), and anti-DcR2 (**E1–E3**) primary antibodies (corresponding magnifications b, c, and d). Immunostaining was performed on ventral prostate from intact rats (A1, B1, C1, D1, and E1), from 3-day postcastrated rats (A2, B2, C2, D2, and E2), and from 3-day postcastrated rats with testosterone substitution (A3, B3, C3, D3, and E3). Ventral prostate negative controls (a) were obtained with nonimmune serum or with buffer instead of primary antibody. Scale bars: 27 μm (A, B, C, D, and E), 50 μm (a), and 11 μm (b, c, and d).

shown) testosterone supplementation. Results confirmed that TRAIL and DR4 proteins are localized in the cytoplasm of prostate epithelial cells, whereas DR5, DcR1, and DcR2 immunostaining was detected in its particular punctiform aspect (Vindrieux et al., 2002). Receptors may be expressed on the cell surface and within the cell as intracellular pools of TRAIL receptors, and it is generally assumed that this punctiform immunolocalization could be related (although not exclusively) to a sublocalization to the Golgi apparatus. No variations of immunostaining intensity and immunolocalization were observed between the different groups of rats for TRAIL and DR4, DR5, DcR1, and DcR2 receptors, however, androgen withdrawal induced a regression of prostatic tissue and cytoplasm, generating an impression of a more dense punctiform staining in castrated rat (Fig. 2A–E).

Ligand and receptors protein levels were evaluated by Western blot analysis in rat ventral prostate (Fig. 3). TRAIL (Fig. 3A) and DR4 (Fig. 3B), DR5 (Fig. 3C), and DcR1 (Fig. 3D) protein levels were similar in the rat ventral prostate from intact rats and castrated rats treated (or not) with testosterone. In contrast, DcR2 protein levels (Fig. 3E) in ventral prostate were tenfold lower in castrated rats ($P < 0.001$) than in intact or castrated rats with testosterone supplementation.

Effect of testosterone on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 mRNA expression in rat ventral prostate

TRAIL and receptors mRNA expression was evaluated by RT-PCR analysis in rat ventral prostate (Fig. 4). No significant variations were observed in TRAIL (Fig. 4A), DR4 (Fig. 4B), DR5 (Fig. 4C), and DcR1 (Fig. 4D) mRNA levels in the ventral prostate from intact rats, castrated rats, and castrated rats with testosterone supplementation, whereas DcR2 mRNA levels (Fig. 4E) showed a significant change. DcR2

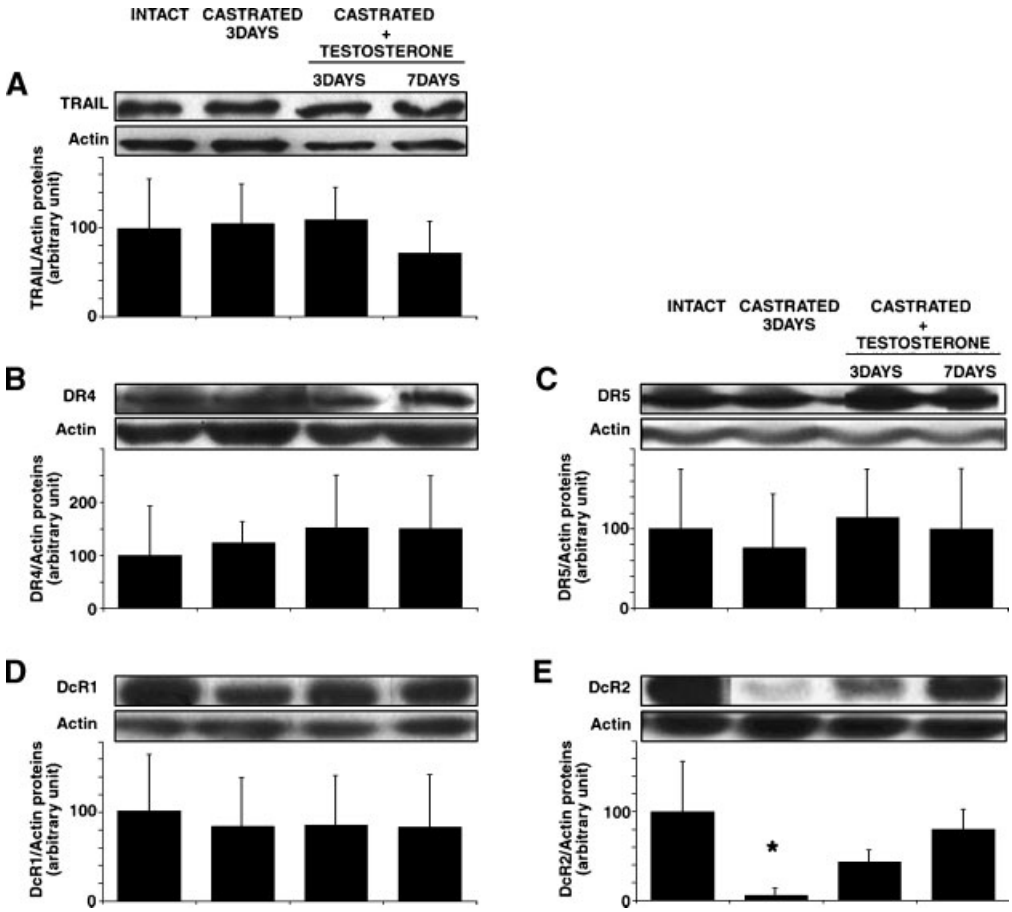


Fig. 3. Effect of castration and testosterone supplementation on TRAIL and TRAIL-receptor proteins expression in the rat ventral prostate. TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 protein levels were determined in ventral prostate from intact rats, from 3-day postcastrated rats and from 3- and 7-day postcastrated rats with testosterone substitution. Histograms represent TRAIL (**A**), DR4 (**B**), DR5 (**C**), DcR1 (**D**), and DcR2 (**E**) protein levels. The values represent the mean ± SD determined from ten different animals from different litters. In the upper parts are shown representative autoradiographs. *$P < 0.001$ compared with intact animal group.

mRNA (Fig. 4E) levels decreased in ventral rat prostate from castrated rats (7.5-fold, $P < 0.001$), whereas mRNA levels from castrated rats treated with testosterone were similar to those observed in control rats.

Effect of testosterone on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 expression in rat anterior and dorsolateral prostate

The expression of TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 mRNA and protein levels were investigated in anterior and dorsolateral prostate lobes. No changes were observed in DcR2 mRNA and proteins levels in anterior and dorsolateral prostate after castration and castration plus testosterone treatment (Fig. 5). As expected, no changes in TRAIL, DR4, DR5, and DcR1 mRNA and proteins levels were observed in anterior and dorsolateral prostate of castrated rats supplemented (or not) with testosterone (data not shown).

Effect of an anti-androgen treatment by flutamide on TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 expression in rat ventral prostate

To confirm the specificity of androgen action on the TRAIL pathway, TRAIL and TRAIL receptors mRNA and protein levels were measured in ventral prostate from adult rats exposed to the anti-androgen flutamide (50 mg/kg · day) for different times (24, 48, 72, and 96 h). As expected, no significant changes in TRAIL, DR4, DR5, and DcR1 (Fig. 6A–H) expression were observed, whereas DcR2 mRNA and protein levels (Fig. 6I, J) were decreased by 1.5- and 4-fold, respectively. This decrease was significant ($P < 0.01$) as early as 1 day of treatment and evidenced during all treatment times. The treatment induced a significant ($P < 0.05$) loss of prostate ventral weight (−38% at 72 h and −42% at 96 h, data not shown), related with a cell death process at 72 and 96 h, observed by the TUNEL (data not shown).

DISCUSSION

The present study reports the expression of TRAIL and its receptors, including DR4, DR5, DcR1, and DcR2 in the rat prostate during androgen deprivation and replacement. In the model of castrated rats, ventral prostate weight decreased after castration, whereas it was unchanged in castrated rats treated with testosterone. Also, testosterone supplementation to castrated rats prevented the increase in TUNEL–positive cell numbers in the ventral prostate. Anterior and dorsolateral prostates were unaffected by androgen deprivation. These results are in accordance with those reported in the literature (Wright et al., 1996; Avila et al., 1998; Omezzine et al., 2003b). In hormone-sensitive ventral rat prostate, the immunolocalization of TRAIL and its

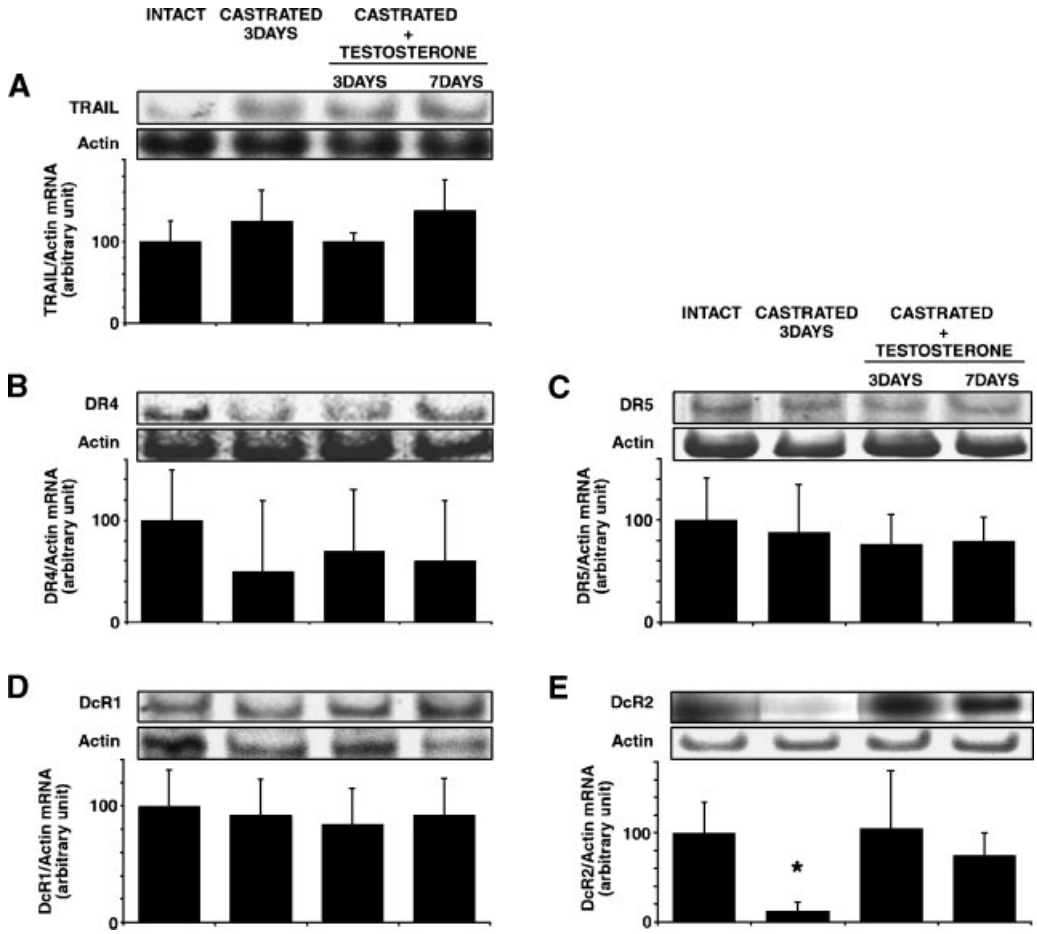


Fig. 4. Effect of castration and testosterone supplementation on TRAIL and TRAIL-receptor mRNAs expression in the rat ventral prostate. TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 mRNA levels were determined in ventral prostate from intact rats, from 3-day postcastrated rats and from 3- and 7-day postcastrated rats with testosterone substitution. Histograms represent TRAIL (**A**), DR4 (**B**), DR5 (**C**), DcR1 (**D**), and DcR2 (**E**) mRNA levels. The values represent the mean ± SD determined from ten different animals from different litters. In the upper parts are shown representative autoradiographs. $^*P < 0.001$ compared with intact animal group.

receptors was unchanged in different experimental conditions. mRNA and protein expressions of TRAIL, death receptors DR4 and DR5, and decoy receptor DcR1 were also unaffected, whereas DcR2 mRNA and protein levels were decreased after androgen deprivation. Testosterone administration to castrated rats prevented this decrease. DcR2 expression was unaffected in anterior and dorsolateral prostate. In ventral prostate of anti-androgen-treated animals, the variations in weight, in apoptotic cell number, and the decrease in DcR2 expression are in accordance with those found in previous models. Together these results support a relationship between testosterone level and DcR2 receptor expression during the apoptotic cell death process in the hormone-sensitive ventral prostate. Because the downregulation of DcR2 receptor expression affected mRNA and protein levels, we could suggest that this event occurs at the transcriptional level. As, for the moment, no androgen responsive elements have been reported in TRAIL and TRAIL-receptors promoters, the regulation by an (as yet unidentified) androgen-dependent transcription factor is possible. Two recent studies performed in multiple tumor types including prostate (Van Noesel et al., 2002; Shivapurkar et al., 2004) reported a downregulation of TRAIL-decoy receptors, DcR1 and DcR2 mRNAs, associated with dense promoter hypermethylation; however, a relationship with androgen level was not investigated. Androgen deprivation induces a drastic reduction in blood flow to the rodent prostate and causes an ischemic process preceding the onset of apoptosis of epithelial cells (Lekas et al., 1997; Shabsigh et al., 1999). Subsequently Fas/CD-95 expression is upregulated (Suzuki et al., 1996; De la Taille et al., 1999). However, in the present study, the ischemia/hypoxia process does not seem to be involved in DcR2 receptor level because its expression is downregulated and the expression of DR4, DR5 and DcR1 receptors is unchanged.

Despite several investigations, the mechanisms of apoptosis initiation by TRAIL remain unclear. The intracellular C-terminal portion of the death receptors, termed the "death domain," is a protein-protein interaction module, the DISC (Death-Inducing Signaling Complex), responsible for the transduction of cytotoxic death signals via the initiator caspases-8 or -10 (Kischkel et al., 2000; Almasan and Ashkenazi, 2003) and ultimately the effector caspases-3, -6, and -7 (Degterev et al., 2003). In hormone-sensitive prostate apoptosis, some data support a relationship between death receptor pathway activation and testosterone level. Indeed, although the initiator caspase-8 expression was unaffected after castration in the rat ventral prostate (Omezzine et al., 2003b), Nastiuk et al. (2003) it was reported, in the same model, that mRNA, encoding

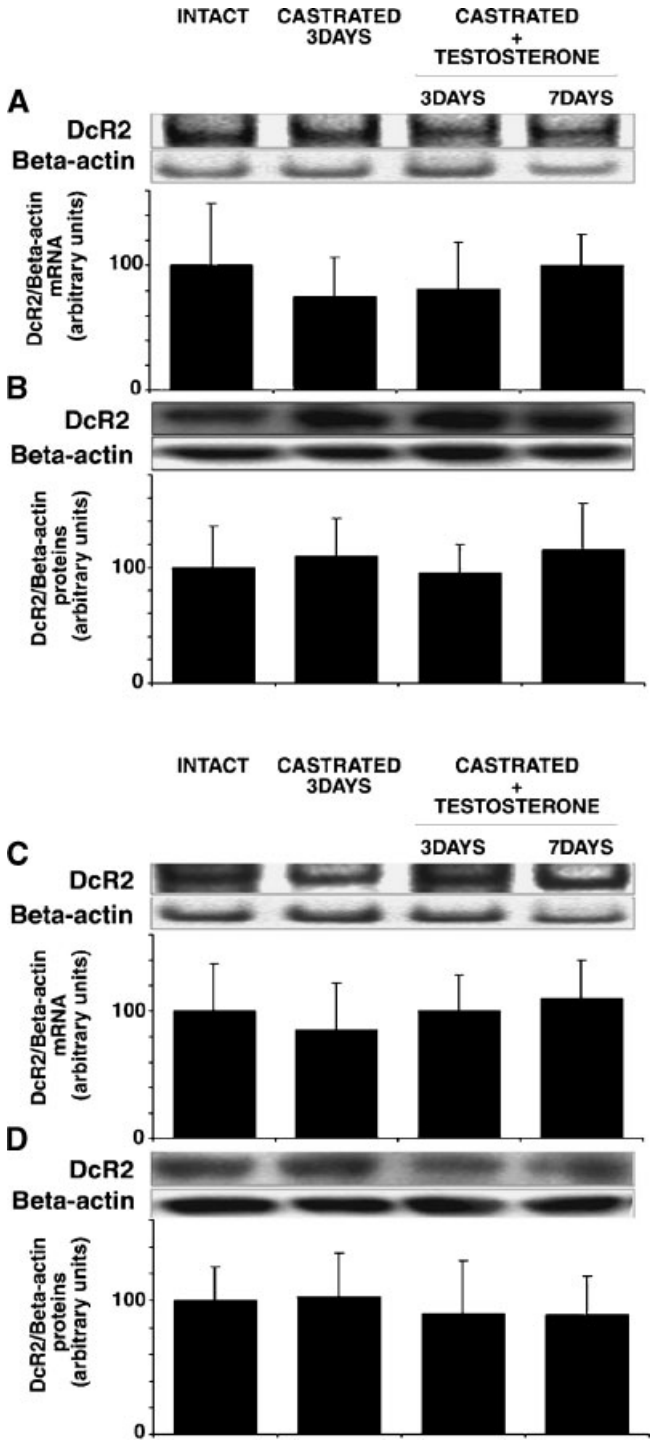


Fig. 5. Effect of castration and testosterone supplementation on DcR2 expression in anterior and dorsolateral prostate. DcR2 mRNA and protein levels were determined in anterior (**A**, **B**) and dorsolateral (**C**, **D**) prostate from intact rats, from 3-day postcastrated rats and from 3- and 7-day postcastrated rats with testosterone substitution. Histograms represent DcR2 mRNA (A) and (C) and DcR2 protein (B) and (D) levels. The values represent the mean ± SD determined from ten different animals from different litters. In the upper parts are shown representative autoradiographs.

a FLICE (FADD-like IL1β converting enzyme)-like inhibitor protein (FLIP), decreases during the first day following castration, and androgen administration restores FLIP mRNA to normal levels. However, as caspase-8 is the principal target of FLIP inhibition, it may be involved in normal prostate apoptosis via FLIP hormone regulation. In the human prostatic carcinoma cell line LNCaP, Rokhlin et al. (2002) reported that TRAIL-mediated apoptosis and the recruitment of FADD and caspase-8 for the TRAIL-DISC formation are androgen-dependent but, in contrast to our results achieved with normal rats in vivo, LNCaP cells showed a decreased level of DR4 and DR5 proteins in androgen-free conditions. Taken together, all these results suggest that in hormone sensitive normal or pathological prostate, androgens play a role in TRAIL-death/decoy receptor expression and TRAIL-DISC formation. Concerning the mitochondrial pathway, a raise in the Bax:Bcl-2 ratio (Perlman et al., 1999) and in Bax expression (Asamoto et al., 2001; Banerjee et al., 2002) has been reported, suggesting the involvement of the Bcl-2 family proteins expression in the prostate apoptotic cell death process induced by androgen deprivation. However, the androgen-(in)dependent resistance to many apoptotic stimuli can be overcome in human prostate cancer LNCaP cells by the addition of Bcl-2 antisense oligonucleotides (Lin et al., 2001; Gleave et al., 2002). The conflicting results, related to the androgen control in the death receptor and in the mitochondrial pathways, could be explained by differences in androgen sensitivity between species (rat/human), in experimental conditions (in vivo/in vitro) and in the cellular physiological state (normal/pathological), because the needs and aim of a normal cell differ with those of a cancer cell. Indeed normal prostatic cells need hormones to maintain their biological function, whereas an androgen-sensitive carcinoma cell line needs hormones to proliferate.

One could suggest from this study that the decrease in DcR2 mRNA and protein expression during the days following androgen deprivation, in the most apoptotically responsive ventral lobe of the rat prostate, might leave the normal cells vulnerable to cell death signals generated by TRAIL via its true receptors. The androgen regulation of human decoy receptors expression in pathological conditions is not known but we can hypothesize that the variation of DcR2 receptor expression levels may play a role as an inhibitor/inductor of apoptosis in human prostate. Thus the TRAIL apoptotic signal could become activated when DcR2 expression is downregulated as a consequence of androgen withdrawal. Therefore, if the downregulation of decoy receptors plays a role in the apoptosis of prostate pathological cells after the onset of androgen ablation, it is conceivable that androgen-independent cancer cells might arise as a subpopulation that has acquired the capacity to upregulate the expression of decoy receptors (and may be other anti-apoptotic proteins) and therefore to escape the anti-tumor surveillance by immune cells. Furthermore, identification of drugs or experimental methods (downregulation by siRNAs) that decreases Trail decoy receptors expression for a long time after androgen deprivation may prove to be therapeutically useful. Ultimately, such functional studies may provide insight into the mechanisms of normal and cancer prostate epithelial cell death induced by TRAIL/TRAIL-receptors under androgen control and may lead to novel therapies for the treatment of prostate cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Contard and N. Riu for their technical assistance. A fellowship was awarded to D.V. by Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la

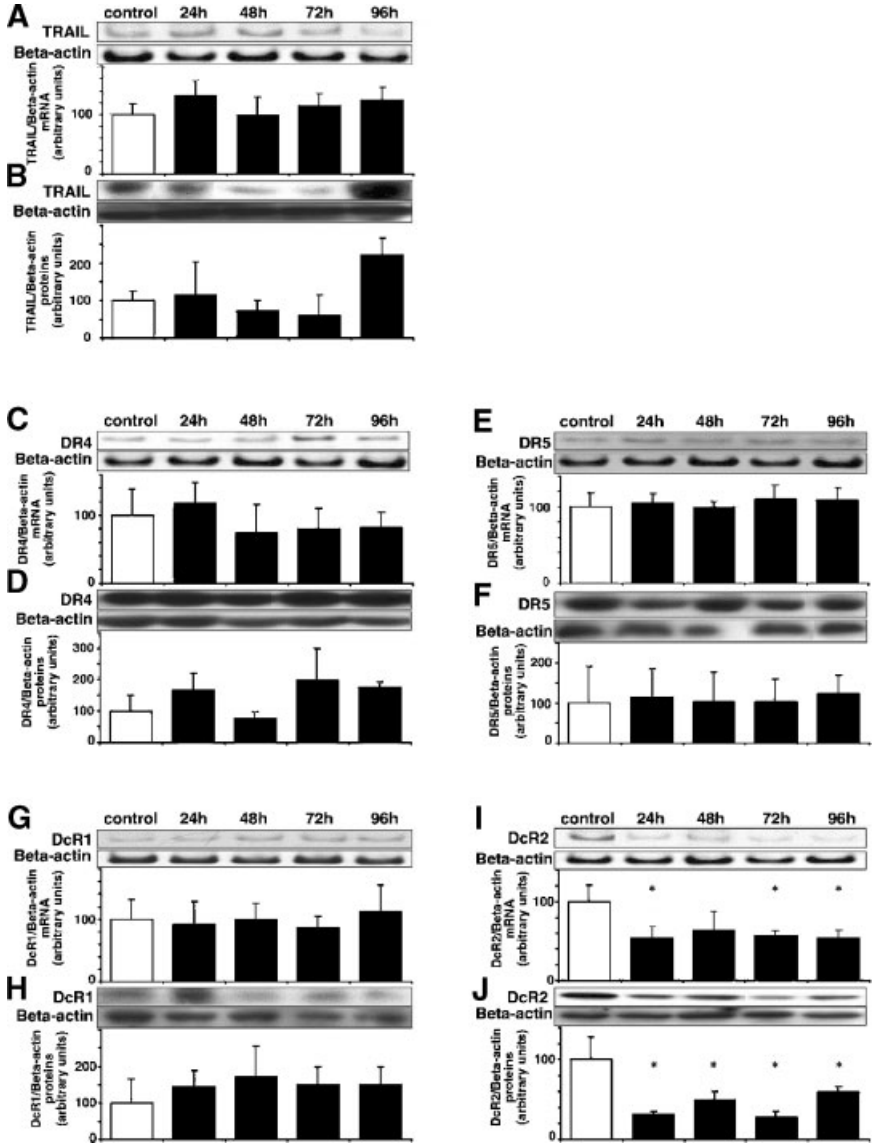


Fig. 6. Effect of flutamide exposure on TRAIL and TRAIL-receptors expression in the rat ventral prostate. TRAIL, DR4, DR5, DcR1, and DcR2 mRNA and protein levels were determined in ventral prostate from control rats and from rats treated during 24, 48, 72, and 96 h with 50 mg/kg · day of flutamide. Histograms represent TRAIL (**A**), DR4 (**C**), DR5 (**E**), DcR1 (**G**), and DcR2 (**I**) mRNA and TRAIL (**B**), DR4 (**D**), DR5 (**F**), DcR1 (**H**), and DcR2 (**J**) protein levels. The values represent the mean ± SD determined from at least six different animals from different litters. In the upper parts are shown representative autoradiographs. (I, J), $^*P < 0.01$ compared with control group.

Prostate (ARTP), and Ligue Contre Le Cancer: Comité de l'Ardèche supported R.G.

LITERATURE CITED

Almasan A, Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL: Apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev 14:337–348.

Asamoto M, Hokaiwado N, Cho YM, Takahashi S, Ikeda Y, Imaida K, Shirai T. 2001. Prostate carcinoma developing in transgenic rats with SV40 antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. Cancer Res 61:4693–4700.

Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev/Cancer 2:420–430.

Ashkenazi A, Dixit VM. 1999. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol 11:255–260.

Avila DM, Fuqua SA, George FW, McPhaul MJ. 1998. Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and finasteride traitment. J Endocrinol 159:403–411.

Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR. 1995. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. Endocrinology 136:4368–4376.

Banerjee PP, Banerjee S, Brown TR. 2002. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobes. Endocrinology 143:1825–1832.

De la Taille A, Chen MW, Shabeigh A, Bagiella E, Kiss A, Buttyan R. 1999. Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. Prostate 40:89–96.

Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. 1997. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. J Exp Med 186:1165–1170.

Degterev A, Boyce M, Yuan J. 2003. A decade of caspases. Oncogene 22:8543–8567.

Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem 273:14363–14367.

Gleave ME, Zellweger T, Chi K, Miyake H, Kiyama S, July L, Leung S. 2002. Targeting anti-apoptotic genes upregulated by androgen wthdrawal using antisens oligonucleotides to enhance androgen- and chem-sensitivity in prostate cancer. Invest New Drugs 20:145–158.

Grataroli R, Vindrieux D, Gougeon A, Benahmed M. 2002. Expression of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in rat testis during development. Biol Reprod 66:1707–1715.

Grataroli R, Vindrieux D, Selva J, Felsenheld C, Ruffion A, Decaussin M, Benahmed M. 2004. Characterization of tumour necrosis factor-α-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. Mol Hum Reprod 10:123–128

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. Immunity 12:611–620.

Kwong J, Choi HL, Huang Y, Chan FL. 1999. Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration. Cell Tissue Res 298:123–136.

Kyprianou N, Isaacs JT. 1988. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. Endocrinology 122:552–562.

Lekas E, Johansson M, Widmark A, Bergh A, Damber JE. 1997. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. Urol Res 25:309–314.

Lin SL, Chuong CM, Ying SY. 2001. A novel mRNA-CDNA interference phenomenon for silencing bcl-2 expression in human LNCaP cells. Biochem Biophys Res Commun 281:639–644.

Liu QY, Rubin MA, Omene C, Lederman S, Stein CA. 1998. Fas ligand is constitutively secreted by prostate cancer cells in vitro. Clin Cancer Res 4:1803–1811.

Mac Farlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem 272:25417–25420.

Masters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL countains a truncated death domain. Curr Biol 7:1003–1006.

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88:355–365.

Nastiuk KL, Kim JW, Mann M, Krolewski JJ. 2003. Androgen regulation of FLICE-like inhibitory protein gene expression in the rat prostate. J Cell Physiol 196:386–393.

Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, Bars R, Benahmed M. 2003a. Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. Endocrinology 144:648–661.

Omezzine A, Mauduit C, Tabone E, Nabli N, Bouslama A, Benahmed M. 2003b. Caspase-3 and -6 expression and activation are targeted by hormone action in the rat ventral prostate during the apoptotic cell death process. Biol Reprod 69:752–760.

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu GL, Gentz R, Dixit VM. 1997a. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science 277:815–818.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. 1997b. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science 276:111–113.

Pan G, Ni J, Yu GL, Wei YF, Dixit VM. 1998. TRUNDD: A new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. FEBS Lett 424: 41–45.

Peets EA, Henson MF, Neri R. 1974. On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide (α-α-α-trifluoro-2-methyl-4′-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. Endocrinology 94:532–540.

Perlman H, Zhang X, Chen MW, Walsh K, Buttyan R. 1999. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelialcell apoptosis. Cell Death Differ 6:48–54.

Pitti RM, Masters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 271:12687–12690.

Reed JC. 1998. Bcl-2 family proteins. Oncogene 17:3225–3323.

Rokhlin OW, Bishop GA, Hostager BS, Waldschmidt TJ, Sidorenko SP, Pavloff N, Kiefer MC, Umansky SR, Glover RA, Cohen MB. 1997. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines. Cancer Res 57:1758–1768.

Rokhlin OW, Taghiyev AF, Guseva NV, Glover RA, Syrbu SI, Cohen MB. 2002. TRAIL-DISC formation is androgen-dependent in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. Cancer Biol Ther 1:631–637.

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-κB. Immunity 7:831–836.

Shabsigh A, Tanji N, D'Agati V, Burchardt M, Rubin M, Goluboff ET, Heitjan D, Kiss A, Buttyan R. 1999. Early effects of castration on the vascular system of the rat ventral prostate gland. Endocrinology 140:1920–1926.

Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WL, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 277:818–821.

Shivapurkar N, Toyooka S, Toyooka KO, Reddy J, Miyajima K, Suzuki M, Shigematsu H, Takahashi T, Parikh G, Pass HI, Chaudhary PM, Gazdar AF. 2004. Aberrant methylation of TRAIL decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. Int J Cancer 109:786–792.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. 1994. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. Cell 76:959–962.

Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T. 1996. Down regulation of bcl-2 is the first step in fas-mediated apoptosis of male reproductive tract. Oncogene 13: 31–37.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. Science 281:1312–1316.

van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voûte PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. 2002. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. Cancer Res 62: 2157–2161.

Vindrieux D, Devonec M, Benahmed M, Grataroli R. 2002. Identification of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in adult rat ventral prostate. Mol Cell Endocrinol 198:115–121.

Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat Med 5:157–163.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 3:673–682.

Woolveridge I, Taylor MF, Wu FC, Morris ID. 1998. Apoptosis and related genes in the rat ventral prostate following androgen ablation in response to ethane dimethanesulfonate. Prostate 36:23–30.

Wright AS, Thomas LN, Douglas RC, Lazier CB, Rittmaster RS. 1996. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. J Clin Invest 98:2558–2563.

2- Régulation de l'apoptose induite par TRAIL par les androgènes dans la lignée LNCaP

Notre précédente étude a montré que suite à la castration, l'apoptose dans la prostate ventrale de rat est corrélée à une diminution de l'expression du récepteur leurre DcR2. Les autres récepteurs, DR4, DR5 et DcR1 ainsi que le ligand TRAIL sont exprimés dans la prostate ventrale de rat mais leurs expressions ne sont pas modifiées. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'équilibre entre récepteurs de mort et récepteurs leurres est modifié par la privation androgénique en faveur des récepteur de mort et donc de l'induction d'apoptose par le ligand TRAIL.

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié la régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par les androgènes dans la lignée LNCaP, ainsi que l'apoptose induite par ce ligand. Les cellules LNCaP (Lymph Node Cancer Prostate) sont issues d'une métastase de cancer prostatique de ganglions lymphatiques d'un patient. Elles constituent un modèle d'hormonosensibilité de cancer humain prostatique couramment utilisé dans la littérature.

Premièrement, nous avons étudié l'expression du système TRAIL dans ces cellules en fonction de la concentration en androgènes. Pour cela, nous avons utilisé un analogue de la dihydrotestostérone, le R1881. Comme décrit dans la littérature, la croissance des cellules LNCaP en fonction de la concentration en R1881 décrit une courbe « en cloche » avec un pic de prolifération maximal à 0,1 nM. Au-delà de cette concentration, le cycle cellulaire des LNCaP est partiellement bloqué. Les expressions des récepteurs DR5 et DcR2 sont stimulées à partir de 1 nM de R1881. Il semblerait donc que l'expression de DcR2 est régulée par les androgènes dans la lignée LNCaP, comme dans la prostate normale de rat. Afin de confirmer l'implication du récepteur aux androgènes (RA) dans la régulation de ces deux récepteurs au TRAIL par les androgènes, nous avons montré que l'utilisation de l'anti-androgène bicalutamide sur les cellules LNCaP inhibe leur prolifération et empêche l'augmentation des expressions de DR5 et DcR2 par le R1881. De plus, les cellules PC3, qui ne contiennent pas de RA, expriment ces récepteurs mais leurs expressions ne sont pas modifiées suivant les concentrations en R1881.

Deuxièmement, nous avons montré que la sensibilité des cellules LNCaP à l'apoptose induite par TRAIL dépend de la concentration en androgènes. Nous avons pour cela utilisé la

technique du DAPI qui est un intercalant des bases de l'ADN. Par microscopie à fluorescence, les noyaux des cellules sont visibles, et notamment les noyaux fragmentés qui témoignent du processus apoptotique en cours dans la cellule. Ainsi, nos résultats montrent que les cellules LNCaP ont une meilleure sensibilité à l'apoptose due au TRAIL en présence de 0,1 nM de R1881 (8%). A 10 nM, l'apoptose induite par TRAIL est très faible (1%), et inférieure au contrôle sans R1881 (6%). A cette forte concentration de 10 nM en R1881, le cycle cellulaire et les voies de signalisation de l'apoptose sont partiellement bloqués, et les expressions de DR5 et DcR2 sont augmentées par rapport à 0,1 nM, où la croissance et l'induction du signal apoptotique par TRAIL sont optimales. Selon les lignées cellulaires, la sensibilité à l'apoptose due au TRAIL varie et est appréciée de manière subjective par les auteurs en fonction du pourcentage d'apoptose. Pour résumer, les cellules LNCaP sont souvent décrites comme résistantes (apoptose inférieure à 10-15%), mais il est important de noter que cette sensibilité au TRAIL varie en fonction de la présence ou non des androgènes sur ces cellules (paramètre peu pris en compte dans les publications) (Bucur 2006). Les cellules DU145 ont été décrites comme résistantes ou sensibles selon les études, alors que les PC3 sont largement décrites comme sensibles (apoptose supérieure à 50%). On remarque que la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par TRAIL n'est pas reliée à leur hormonosensibilité.

Troisièmement, afin d'évaluer l'implication de DR5 et DcR2 dans l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules LNCaP, nous avons utilisé la technique d'inhibition d'expression par siRNA (interférence par petits ARN). Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de DcR2 sensibilise les cellules LNCaP à l'apoptose due au TRAIL à 0,1 nM et à 10nM de R1881. La présence du récepteur DcR2 agit comme une protection pour les cellules LNCaP à l'apoptose induite par TRAIL. A l'inverse, l'inhibition de l'expression du récepteur DR5 diminue le nombre de cellules en apoptose confirmant son rôle pro-apoptotique. Une étude récente a publié des résultats comparables aux nôtres montrant que l'inhibition de DcR2 combiné à l'action du TRAIL diminue la viabilité des cellules LNCaP et DU145 (Sanlioglu et al., 2007a).

Ainsi, nous avons montré que les expressions des récepteurs DR5 et DcR2 sont régulées par les androgènes dans les cellules LNCaP. Concernant DcR2, ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus dans la prostate ventrale de rat. En effet, chez le rat, la privation androgénique induit une diminution de l'expression de DcR2, alors que dans les cellules LNCaP, une augmentation des concentrations en androgènes induit une augmentation de l'expression de

DcR2. Concernant le récepteur DR5, on peut expliquer la différence de régulation de son expression entre les deux modèles par la différence d'espèce (rat/homme) et la différence de statut prostatique (sain/tumoral). Nous avons ensuite démontré le rôle protecteur du récepteur DcR2 à l'apoptose induite par TRAIL dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines favorisant vraisemblablement la liaison de TRAIL sur les récepteurs de mort, et induisant l'apoptose des cellules. Etant donné que de nombreux cancers humains sont résistants à l'apoptose induite par TRAIL, la modulation de l'expression des récepteurs au TRAIL paraît être une solution intéressante pour sensibiliser les cellules cancéreuses. Plusieurs tests effectués sur des modèles de cancers de la prostate utilisant des molécules chimiothérapeutiques, l'irradiation, et des composants comme le sélénium et le curcumin ont montré des effets synergiques avec le TRAIL sur l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Shankar 2004, Kang 2005, Yamaguchi 2005, Shankar 2008). Ces molécules sensibilisent les cellules au TRAIL en surexprimant les récepteurs de mort, DR4 et DR5, et les protéines de la voie mitochondriale (Bax, Bak). De plus, les protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, FLIP et NF-κB sont sous-régulées, et par conséquence les caspases activées. Récemment, deux études ont montré que l'augmentation de DcR2 dans les cancers prostatiques par rapport au tissu sain est corrélée à un score de Gleason élevé, à la récurrence du PSA ainsi qu'à une diminution de la survie des patients (Koksal et al., 2008; Sanlioglu et al., 2007b). Le ciblage du récepteur DcR2 par la technique du siRNA combiné au TRAIL pourrait être envisagé pour le traitement des cancers prostatiques.

Parmi toutes ces publications, une seule étude montre une abolition complète des tumeurs (PC3) *in vivo* et utilise un traitement séquentiel de l'irradiation puis du TRAIL (Shankar 2004).

Downregulation of DcR2 Sensitizes Androgen-Dependent Prostate Cancer Cells LNCaP to TRAIL-Induced Apoptosis

Journal:	*The Prostate*
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	VINDRIEUX, David; INSERM REVEILLER, Marie; INSERM CHANTEPIE, Jacqueline; INSERM YAKOUB, Sadok; INSERM DESCHILDRE, Catherine; INSERM RUFFION, Alain; Centre Hospitalier Lyon Sud, Urologie DEVONEC, Marian; Centre Hospitalier Lyon Sud, Urologie BENAHMED, Mohamed; INSERM GRATAROLI, Renée; INSERM
Key Words:	TRAIL, DcR2, Prostate Cancer, Apoptosis, Androgen

Downregulation of DcR2 Sensitizes Androgen-Dependent Prostate Cancer Cells LNCaP to TRAIL-Induced Apoptosis

DAVID VINDRIEUX 1**, MARIE REVEILLER** 1**, JACQUELINE CHANTEPIE** 1**, SADOK YAKOUB** 1**, CATHERINE DESCHILDRE** 1**, ALAIN RUFFION** 2**, MARIAN DEVONEC** 2**, MOHAMED BENAHMED** 1**, and RENEE GRATAROLI** 1*

1- Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM U-407, Communications Cellulaires en Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Université Lyon 1, B.P. 12, F-69921 Oullins Cedex, France

2- Service d'Urologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69921 Oullins Cedex, France.

*Correspondence to : Dr R.Grataroli, INSERM U-407, Faculté de Médecine Lyon-Sud, B.P. 12, F-69921 Oullins Cedex, France

Telephone: 33 4 26 23 59 36

Fax: 33 4 26 23 59 00

e-mail: Renee.Grataroli@inserm.fr

Running title: DcR2 REGULATES TRAIL -MEDIATED APOPTOSIS

Keywords: TRAIL, DcR2, Prostate Cancer, Apoptosis, Androgen

Text figures : 6.

This work has been funded by INSERM

Contract grant sponsor: Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), fellowship to DV.

Contract grant sponsor: Ligue Contre Le Cancer : Comité de l'Ardèche & Comité de la Drôme, to RG.

David Vindrieux and Marie Réveiller equally contributed to this work.

Authors declare that they have not conflict of interest in the present study

For Peer Review

ABSTRACT

BACKGROUND. Misregulation of many apoptotic related genes and androgens play a critical role in the development, progression, and treatment of prostate cancer. The differential sensitivity of tumor cells to TRAIL-induced apoptosis may be mediated by the modulation of surface TRAIL receptor expression which one could be related to androgen concentration. Then in this study, we evaluated the regulation of apoptosis induction by TRAIL related to their death and decoy receptor expression and to hormonal concentration in Androgen-sensitive prostate cancer human cells, LNCaP.

METHODS. Cell cycle profiles and distributions of LNCaP cells were determined by flow cytometry and the TRAIL-receptor expression related to androgen concentration was analyzed by real-time quantitative RT-PCR and western blot. The silencing of the hormone-sensitive DcR2 protein expression was performed by siRNA method and apoptosis-TRAIL-induced was estimated by 4', 6'-diamidino-2 phenylindole staining (DAPI).

RESULTS. Hormone sensitivity of decoy (DcR2) and death (DR5) receptor expression is correlated to TRAIL-induced apoptosis. The silencing of androgen-sensitive DcR2 protein expression by siRNA method leads to a significant increase of TRAIL-mediated apoptosis related to androgen conditions in LNCaP cells.

CONCLUSION. Our data support that hormone modulation of DcR2 expression plays a role as a regulator of TRAIL-induced apoptosis in androgen-sensitive prostate carcinoma cell line LNCaP and provide insight into cell death induction in apoptosis resistant hormone-sensitive tumor cells like prostate cancer. TRAIL action and DcR2 expression modulation could be of potential clinical value for advanced tumor treatment.

For Peer Review

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most commonly diagnosed malignancy in men and remains the second leading cause of cancer-related deaths [1]. Inhibition of apoptosis appears to be a critical pathophysiological factor that contributes to the onset and progression of prostate cancer but the exact molecular mechanisms are unknown. Therefore, understanding the mechanism(s) of apoptosis misregulation could be the bases for developing more effective therapeutic approaches to induce cell death in apoptosis-resistant tumor cells like prostate cancer [2].

It has been suggested that treatment with apoptosis-inducing ligands belonging to Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) family would be an effective strategy for cancer treatment [3, 4].The best characterized ligands, Fas ligand, TNF-α, and TNF-α-related apoptosis -inducing ligand (TRAIL, also known as Apo2L) [5, 6]are type II transmembrane proteins. They can induce apoptosis in susceptible cells after binding them to type I transmembrane receptors containing cytoplasmic "death domains" which further interacts with downstream death domain-containing adapter proteins FADD or TRADD (for Fas- or TNFR-associated death domain respectively), leading to the activation of caspases initiator (like caspase 8) and effector (like caspase 3) and apoptotic cell death [7]. Unfortunately, TNF-α and Fas ligand have severe systemic cytotoxic effects, limiting their use as systemic agents [8]. Unlike TNF-α and FasL, TRAIL has been used effectively in systemic animal trials and has the unique feature of inducing apoptosis in cancer cells and sparing normal cells [9, 10]. Therefore, TRAIL may be a new promising candidate for treatment of cancer.

The transcripts of TRAIL [5, 6], have been detected in many human tissues such as spleen, thymus, prostate, and lung. To date, at least four type I transmembrane receptors for human TRAIL have been identified, including DR4 (TRAIL-R1) [11], DR5 (TRAIL-R2) [12], DcR1 (TRAIL-R3) [13, 14] and DcR2 (TRAIL-R4) [15, 16]. Ligation of TRAIL to DR4 or DR5

For Peer Review

induces trimerization of the receptor leading to the activation of the apoptotic pathway. In contrast to DR4 and DR5, DcR1 and DcR2 act as decoy receptors for TRAIL. DcR1 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein lacking an intracellular domain and DcR2 contains a truncated death domain and they have been reported to prevent TRAIL-induced apoptosis, presumably by competing with DR4 and DR5 for binding to TRAIL [12, 14]. Finally, osteoprotegerin, a regulator of osteoclastogenesis, has been reported to be a soluble receptor for TRAIL [17]. The idea of targeting specific death receptors to induce apoptosis in tumor is attractive and it is particularly intriguing to understand why/how a complex family of death and decoy receptors modulates TRAIL function. Although DR4 and DR5 transcripts and TRAIL mRNA are expressed in many tissues, most normal cells are resistant to apoptosis induction by this ligand [9, 10]. It has, therefore, been suggested that DcR1 and DcR2 receptors may contribute to the physiological resistance to TRAIL. In contrast, several tumor cell lines express DR4 and DR5, but little DcR1 and DcR2 proteins, suggesting that cancer cells may be more sensitive to the TRAIL apoptotic signal. However recent finding indicate that some tumor cells are or can acquire resistance to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating decoy receptor expression [18]. Androgens play a critical role in the development, progression, and treatment of prostate cancer [19]. Currently a major therapy for the treatment of localized and metastatic prostate cancer is androgen ablation, which induces extensive apoptosis of androgen-dependent prostate cancer cells, resulting in tumor regression and improved prognosis [20, 21]. Androgen deprivation by castration induces cell death in the hormone sensitive rat ventral prostate [22] and caspase-3 and –6 expression and activation are targeted by hormone action in this process [23]. Many results support the involvement of death receptor pathway in ventral prostate apoptosis [24, 25, 26]. In a previous study we reported that testosterone specifically controls DcR2 mRNA and protein expression in the normal adult rat ventral prostate and we concluded that androgen withdrawal, by reducing

For Peer Review

DcR2 expression, might leave the cells vulnerable to cell death signal generated by TRAIL via its functional receptors [27].

The androgen regulation of human TRAIL receptors expression in pathological conditions is not known but, on the basis of our previous results, we can hypothesize that the hormonal variation of DcR2 receptor expression levels may play a role as an inhibitor/inductor in TRAIL induced prostate cancer cells apoptosis. Thus, to evaluate the role of decoy receptor DcR2 in apoptosis induction by TRAIL in human prostate cancer, we investigated this study in androgen-sensitive prostatic carcinoma cell line, LNCaP.

At first, we studied the dose-dependent effects of androgen on TRAIL system expression and we report that hormone sensitivity of DcR2 and DR5 expression is correlated to the TRAIL-induced apoptosis. Then in second part, we performed the silencing of DcR2 protein expression by siRNA method to evaluate its downregulation consequence on the TRAIL-induced apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells, LNCaP.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and PC-3 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD). The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 7.5% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Sigma, Isle d'Abeau, France), 20 µg/ml streptomycin, 20 U/ml penicillin (Invitrogen), and 50 U/ml Nystatin (Sigma). LNCaP and PC3 cells were used between the passages 50-60 and 18-24 respectively. 17β-hydroxy-17-methyl-estra-4,9,11-trien-3-olone (R1881/testosterone analogous) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Bicalutamide (Casodex, [(2RS)-4'-cyano-3-(4-

For Peer Review

fluorophenylsulphonyl)-2-hydroxy-2-methyl-3'-trifluoromethyl propioanilide] was a gift from AstraZeneca (Alderly House, Cheshire, England).

Cell numeration, proliferation assay and treatment

LNCaP cells (5.10^4) were plated in triplicate per well in 24-well plates (Corning Incorporated, Corning, NY) in steroid-depleted media containing 2.5% charcoal-stripped FCS (HyClone, Logan, UT) for the numeration. Cells of each well were counted in duplicate with a Coulter Z1 counter (Beckman Coulter, CA). For [^{3}H]Thymidine incorporation , cells were plated in 12-well plates at a density of 12.10^4 cells/well and were incubated with 0.5 µCi/ml [^{3}H]thymidine (Du Pont-New England Nuclear, Les Ulis, France) in medium for 4h before harvesting. The cells were washed twice with ice-cold PBS and the DNA precipitated with 5% trichloracetic acid. The DNA precipitate was determined in 0.4 ml of 0.25 M NaOH and incorporated [^{3}H]thymidine was determined by liquid scintillation counting. Each time point was determined in triplicate. For western-blotting and real-time PCR analysis LNCaP cells were seeded in 10 cm disk (22.10^5 cells) and 6 cm disk (8.10^5 cells) respectively, with 5 disks per condition. Cells were allowed to attach 24h and treated with various concentrations of R1881 at day 0. All the cells, including the control cells, were cultured in the presence of the same ethanol concentration.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometry was used to assess the sub-G1 DNA population of cells undergoing apoptosis. LNCaP cells were seeded at 8.10^5 cells in 6-cm dishes. After 4 days of culture with or without R1881, cells were collected by trypsinization and fixed in 1 % paraformaldehyde for 30 minutes at + 4°C, then in 70% ethanol/30% PBS (phosphate buffer saline) 2h at –20°C. Fixed cells were washed with PBS, treated with 30 µg/ml Rnase A in PBS for 60 minutes at 37°C, and then propidium iodide in PBS (10 µg/ml) was added. For positive controls, LNCaP were incubated with etoposide (Merck S.A. Nogent-sur-Marne,

For Peer Review

France) diluted with DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma). Cell cycle profiles and distributions were determined using a BD Facscan flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Cell cycle distribution was analyzed using Modfit LT software (Verity Software House, Topsham, ME).

Western-blotting analysis

Cells protein extracts were prepared by direct addition of five volumes of cold lysis buffer as previously described [28]. Protein concentration was determined by Bicinchoninic acid assay reagent (Sigma, Isle d'Abeau, France) and by using a bovine serum albumine as standard. Protein samples (15 µg / well) were resolved by 12% SDS-polyacrylamide gels electrophoresis and electroblotted as described earlier [28]. Nitrocellulose blots were treated and incubated with the following primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA): rabbit polyclonal antibodies raised against human TRAIL or DR4 (1:1,000) and goat polyclonal antibodies raised against human DcR1 or DcR2 (1:1,000) and secondary antibodies, horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000) or donkey anti-goat IgG (1:5,000) as written before [27]. The primary antibody anti human DR5 was obtained from AnaSpec, Incorporated (San Jose, CA) and was used at dilution 1:1000. The protein loading was checked by reprobing the blot with a rabbit IgG anti-β actine antibody (1/500) (Sigma).

Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR

Total RNAs were extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Eragny, France) and the amount was estimated by spectrophotometry at 260 nm. Single-strand cDNAs were obtained from the reverse transcription (RT) of 1µg total RNA in 20 µl of reaction volume, as described earlier [27]. Human HeLa cell total RNA was used as positive control.

For real-time PCR, 1 µl of cDNAs were diluated with 9 µl of nuclease free water. The quantitative real-time PCR using the LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim,

For Peer Review

Germany) and the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Basel, Switzerland) were performed on diluted RT mix (1/10). Each reaction volume (20 µl) contained 5 µl cDNA 1/10, 15 µl of PCR Master Mix (containing HotStarTaq DNA Polymerase, buffer, dNTPs and 1 µl of each 10 µM primer). The amplification program consisted in initial activation of HotStart Taq DNA Polymerase for 15 min at 95 °C, followed by 60 cycles in three steps: 15 s at 95 °C, 20 s at Tm °C, and 10 s at 72 °C. The presence of a unique amplicon was verified for each primer by observing the melting curve. A dilution serie of the purified target amplicon (or β actine) was submitted to PCR to check the PCR efficiency and to be used as standard curves for the quantification analysis. The cDNA was amplified using the following primers: human Actine SSP (Tm: 54°C) : 5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3' (sense primer) and 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3' (antisense primer); human DR5 (Tm: 58°C): 5'-GAGCTGCCTTTTTAGGG-3' (sense primer) and 5'-GGCTGAAATGGTTACTGAG-3' (antisens primer); human DcR2 (Tm: 53°C): 5'-GCCCCAACAAACTCCTAC-3' (sense primer) and 5'-CTGGGATTACAGGCATGA-3' (antisense primer). The concentration of cDNA in each experimental condition was determined by using the software RealQuant 1.0 (Roche Molecular Biochemicals) .

Apoptosis assessment with 4', 6'-diamidino-2 phenylindole staining (DAPI)

The LNCaP cells undergoing apoptosis were evaluated by chromatin condensation, nuclear shrinkage, and formation of apoptotic bodies, all visualized with DAPI staining [29]. After various designated treatments, medium was removed and cells were fixed with ethanol/acetic acid (3:1, vol./vol.) at room temperature for 10 minutes. Cells were washed with NaCl 0.9% and stained with 0.4 µg/ml DAPI (in NaCl 0.9%) at room temperature for 30 minutes and visualized under an inverted fluorescence microscope and photographed.

Small Interfering RNA

For Peer Review

The siRNAs (sense and antisense strands) were purchased from Ambion, Inc. (Austin, TX). The sense strands sequences were the following: DR5, 5'-GGACUAUAGCACUCACUGGtt-3'; DcR2, 5'-GGGUGUGGAUUACACCAUUtt-3'; siRNA control is a non specific random scrambled sequence. *In vitro* transfections were performed using lipofectamine reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Cells were cultured in 12-well plates, 1ml/well of 2.5% charcoal-stripped FCS medium. Cells were allowed to attach 24h and the culture medium was removed and replaced by serum-free RPMI (200 µl). Cells were treated with gene-specific siRNAs and the control siRNAs (0.5 µg), plus reagent (2 µl), lipofectamine reagent (1 µl) and 50 µl of RPMI for 4h at 37°C under 5% CO_2. Thereafter, 750 µl of 2,5% charcoal-stripped FCS-containing medium were added. Then cells were collected or treated with TRAIL peptide (PeproTech, Levallois Perret, France) 48h later. Silencing of targeted proteins was estimated by western-blotting analysis with corresponding antibodies.

Colorimetric caspase-3 activity assay

The enzymatic activity of caspase-3 was assayed according to the manufacturer's protocol with the Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Alexis Biochemicals, Switzerland). To evaluate the activity of caspase-3, cells lysates were prepared after their respective treatment. Assays were performed by incubating 200 µg protein of cell lysate per sample in 100 µl of reaction buffer containing DEVD-pNA substrate (200 µM final concentration) at 37°C for 2 h in the dark. Absorption was measured at 405 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SD. Unless mentioned in the figure legends, the different analysis were performed three time with three replicate cultures and were investigated at least three times on cells with different passages. TRAIL-induced apoptosis experiments included five samples per treatment condition.

For Peer Review

Statistical analysis were carried out by ANOVA and post hoc Bonferroni/Dunn test excepted in figure 3 where significant differences were obtained with the Student-Newman-Keuls post-test, (StatView Software; SAS Institute Inc., Cary, NC). Differences are accepted as statistically significant at $P<0.05$. A representative experiment of each series is presented.

RESULTS

Sensitivity of LNCaP Cells to Androgen Concentration

In order to investigate the effect of testosterone on TRAIL, DR4, DR5, DcR1 and DcR2 expression in hormone-sensitive prostate cancer cells, we used human hormone-sensitive LNCaP cells as a model. As expected, LNCaP displayed a bell-shaped growth curve in response to increasing doses (1 pM- 10 nM) of R1881 (Fig.1A). R1881 concentrations, in the pM range, induce cell proliferation, with a significant maximum at 0.1 nM (3H incorporation 4.25-fold, $P < 0.002$, and cells number 1.9-fold higher than in control, $P < 0.05$), whereas doses in nM range impede cell growth. DNA content was assessed by flow cytometry (Fig. 1B). In the best conditions of cell proliferation (R1881, 0,1 nM) DNA fragmentation percentage is smaller ($P < 0.005$) than in all other concentration conditions (Fig. 1C) and, globally, in comparison with control cells the absence of significant increase in DNA fragmentation percentage in all conditions indicates the absence of cell apoptosis. Cell incubation in R1881 10 nM showed the highest level of cells in G0-G1 stage (+ 28 %, $P < 0.005$) and the lowest level of cells in G2-M stage (- 50 %, $P < 0.005$) in comparison with control (Fig. 1D), confirming this concentration the worst for cell growth. Except in positive control Etoposide and accordingly with the absence of apoptosis in all other conditions, no changes were observed in cleaved caspase-3 protein level (data not shown).

For Peer Review

Androgen Action on TRAIL System Expression in LNCaP

Cells were cultured with increasing concentrations of R1881 between 1 pM and 10 nM. Ligand and receptors protein levels were evaluated by Western blot analysis (Fig. 2). No significant variations were observed in TRAIL (present as a doublet), DR4 and DcR1 protein levels (Fig. 2A) whereas DcR2 and DR5 protein levels showed a significant increase in nanomolar range in comparison with control (1.6-fold, $P = 0.002$, and 5.6-fold, $P = 0.003$, respectively at R1881 1 nM) (Fig. 2B). The analysis of corresponding mRNA expression by real time quantitative RT-PCR showed that DR5 mRNA levels increased significantly in nanomolar range (3.7-fold at R1881 1nM, $P = 0.0027$) whereas DcR2 mRNA expression was unsignificantly affected in comparison with control (data not shown).

For the moment, no androgen responsive elements have been reported in TRAIL receptor promoters. However, next experiments show the regulation of DcR2 and DR5 expression may be done via the androgen receptor. LNCaP incubated simultaneously with R1881 and a specific anti-androgen receptor, bicalutamide 25 µM, resulted significantly ($P < 0.05$) in the invalidation of the increase in DcR2 and DR5 protein expression observed at R1881 10 nM conditions (Fig. 3A, 3B). In the same way, after R1881 incubation, DcR2 and DR5 expressions are not significantly modified in prostatic cancer cells devoided of androgen receptor as PC3 (Fig. 3C, 3D).

Androgen Regulates Apoptosis Induction by TRAIL in LNCaP cells

To investigate TRAIL-mediated cell death related with androgen concentration in hormone-sensitive LNCaP, cells were cultured four days with R1881 0.1 nM or 10 nM, then treated (or not) with increasing TRAIL ligand concentration from 10 ng to 1 µg during 24 and 48 hours and cell death was measured with DAPI staining (Fig. 4A). 0.1 and 10 nM androgen concentrations were chosen because they were the best and the worst cell growth conditions respectively (Fig.1) and because the variations in DcR2 and DR5 expression (Fig. 2). In

For Peer Review

comparison with androgen free condition (Fig. 4B), in presence of R1881 0,1 nM, the percentage of fragmented nuclei increased significantly between 10 and 200 ng of TRAIL per milliter (+ 28 % and + 38 % for TRAIL 100 ng and 200 ng, respectively $P < 0.005$) to reach a plateau from 300 to 1000 ng/ml. TRAIL-induced apoptosis was not assessed at R1881 10 nM. Results obtained after 48 hours of treatment were slightly increased than of 24 hours (data not shown). In the next experiments, to be in the best TRAIL-induced apoptosis conditions, cell death will be assayed with TRAIL 100 ng during 24 hours.

DcR2 Protein Expression is Correlated with the TRAIL-Sensitivity in Prostate Cancer Cells LNCaP

In previous study [27] we reported a correlation between androgen status, apoptosis and DcR2 expression in rat prostate. We have postulated that the DcR2 decoy receptor expression may be directly related to TRAIL-induced apoptosis resistance in prostate cancer cells, then the downregulation of DcR2 protein expression might reverse the resistance to TRAIL-induced cell death. In LNCaP cells, DcR2 and DR5 expressions are androgen sensitive (Fig.2) then to test the previous hypothesis in this cell, we used suppression of DcR2 gene expression by small interfering RNA (siRNA) in LNCaP cells (Fig.5). In the same way, we investigated the role of DR5 to control its function and the silencing method efficiency. As shown in Fig. 5, DcR2 (Fig. 5 A) and DR5 (Fig. 5 B) proteins were knocked down after transfection with corresponding siRNA and followed by 48 hours of incubation in R1881 0.1 nM (- 98 % and - 92 % respectively in comparison with controls, $P < 0.005$). The silencing of protein is less efficient after incubation 96 hours than 48 hours because of the decreasing of siRNA strands and the exhausting of medium. After DAPI staining, no significant variations were observed in fragmented nuclei per thousand cells treated with siDcR2 or siDR5 alone and with the different transfection reagents (Fig. 5 C).

For Peer Review

The silencing of DcR2 Protein, followed by treatment with TRAIL leds to a significant increase of fragmented nuclei (2.13-fold, $P < 0.002$) in LNCaP transfected in comparison with untransfected control cells (Fig. 6*A*). This is confirmed by a significant increase in caspase 3 activity in DcR2 siRNA transfected cells and treated with TRAIL (+ 26%, $P < 0.005$) in comparison with siO or control + TRAIL, (Fig. 6B). As expected the silencing of DR5 protein resulted in a significant reduction in TRAIL-induced cell apoptosis in comparison with untransfected control cells (- 54 %, $P < 0.002$), and no significant variation in caspase 3 activity (Fig. 6A and B respectively). When LNCaP were cultured in R1881 10 nM, we reported the absence of apoptosis without (Fig. 1C) or with TRAIL peptide (Fig. 4B) and an increase in DcR2 protein level (Fig. 2B). The experiment reported in Fig. 6C shows that the silencing of DcR2 protein at R1881 10 nM results in partial recovering of TRAIL-induced apoptosis in comparison with untransfected control cells and with si0 transfected cells (3.1-fold and 3.8-fold respectively, $P < 0.005$) accompanied by a significant increase in caspase 3 activity in comparison with siO transfected cells (+ 59 %, $P < 0.05$) (Fig. 6D). These results suggest that DcR2 surrexpression contributes to render LNCaP cells resistant to TRAIL-mediated apoptosis and that the downregulation of DcR2 protein can improve TRAIL-induced apoptosis.

DISCUSSION

In pathological prostate, the physiological regulation of apoptosis induction by TRAIL related to their death and decoy receptor expression and hormonal concentration is unknown. Our previous results [27] reported that androgen deprivation associated with an apoptotic process are related to a decrease in DcR2 expression in the normal adult rat hormone sensitive / ventral prostate, then we suggested that the downregulation of DcR2 expression following

For Peer Review

androgen deprivation might leave androgen sensitive cells vulnerable to cell death signal induced by TRAIL via its pro-apoptotic receptors.

To study this hypothesis in pathological conditions, the role of decoy receptor DcR2 in apoptosis process related with androgen concentration is evaluated "in vitro" in androgen-dependent human cells, LNCaP.

As expected, in presence of R1881 between 1 pM and 10 nM, LNCaP displayed a characteristic bell-shaped growth curve with a peak at 0.1 nM. In these experimental conditions, TRAIL, DR4 and DcR1 protein expressions were unaffected whereas DR5 and DcR2 protein expression increased in nanomolar range. Now, no androgen responsive elements have been reported in TRAIL-receptors promoters, however several experimental arguments are in favour of a genomic regulation of DR5 and DcR2 expression by the androgens like their inhibition by the antiandrogen, bicalutamid, and receptor expression unmodified in PC3 cells incubated with androgen. However, the regulation by an (as yet unidentified) androgen-dependent transcription factor is possible, and the increased DcR2 protein level in LNCaP may be due to the regulation by an (as yet unidentified) androgen-dependent translational factor.

In LNCaP, TRAIL-induced apoptosis is maximum in presence of R1881 0.1 nM. The increase of DR5 and DcR2 receptors expression at R1881 concentration up to 0.1 nM may be related to an impossibility of TRAIL induced apoptosis in situation of weak cell proliferation. The silencing of hormonsensitive receptors by siRNA method shows that at R1881 0.1 nM, when DcR2 protein expression is silenced by corresponding siRNA, TRAIL-induced apoptosis is increased, factor 2, in comparison with control. In contrast and as expected, the apoptosis can be reduce of a half when DR5 is downregulated, because the pro-apoptotic receptor DR4 expression. DcR2 is so a regulator of TRAIL induced apoptosis in the best hormonal concentration for cell growth. Moreover, preliminary results show that the silencing of DcR2

For Peer Review

receptor allows a partial restoration of TRAIL induced apoptosis in the apoptosis resistant cells, at androgen R1881 10 nM.

Previously, the results of Rokhlin *et al*. [30], showed that the expression level of the DR4 and DR5 receptors in LNCaP incubated with fetal calf serum or dihydrotestosterone 100 nM was clearly superior to the control condition without androgen whereas corresponding mRNA expression was respectively unchanged and weak and the decoil receptors expression isn't given. On an other hand, if these authors, like other ones [31], have before, observed a resistance of LNCaP cell to the TRAIL-induced apoptosis, interestingly their results also show that in LNCaP, the FADD and caspase 8 recruitment for the TRAIL-DISC formation and the cell death induced by TRAIL ligand are androgen-related [30, 32]. These results and ours together support that LNCaP sensitivity to the TRAIL ligand is androgen- regulated and related to the expression of its receptors (decoil and pro-apoptotic) and to the DISC formation [30, 32]. In contrast, in our conditions, no significant variations for DR4 expression are observed with concentration of R1881 under 10 nM. This may proceed from some differences in experimental conditions (androgen concentration, timing of treatment, presence of PI3K/Akt pathway inhibitor…). Our results suggest that, in LNCaP, androgens play a role in the apoptosis sensitivity, and the resistance of the cells to TRAIL-induced apoptosis is more linked to the upregulation of the decoil receptor DcR2 expression than a downregulation of pro-apoptotic receptors.

Considering the context of the pathological and hormone-sensitive prostate, these results like other ones [33] show that the resistance of these tissues to apoptosis would be more linked to an increased expression of apoptosis inhibitors than a decreased expression of pro-apoptotic proteins. This hypothesis is strenghtened by the works of Chawla-Sarkar *et al*. [34] that show that silencing of Bcl2, FLIP or IAPs (XIAP and survivine) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis. A recent work [35] showed that the sensitivity

For Peer Review

to the TRAIL ligand is related with the tumoral progression (LNCaP, DU 145, PC3) and that the TRAIL-induced cell death is only linked with the DR5 receptor. In this study, DcR1 receptor expression was not detected whereas DcR2 was significantly more abundant in tumor cells than in non-neoplastic ones and may contribute to partial resistance to TRAIL in some prostate tumor cells like LNCaP and DU 145. Interestingly, another study [36] reported that combination treatment of prostate cancer cells (LNCaP and PC3) with TRAIL and chemotherapeutic agents overcomes their resistance by triggering caspase activation.

In vivo, in prostate cancer treatment, if androgen withdrawal decreases anti-apoptotic genes expression as DcR2 in androgen-dependent cells, this could induce onset of apoptosis resulting in prostate tumor reduction . On a middle term, after the onset of androgen withdrawal , it is conceivable that androgen-independent cancer cells might arise as a subpopulation that has acquired the capacity to upregulate the expression of decoy receptors and may be other anti-apoptotic proteins like XIAP [37] and therefore to escape the anti-tumor surveillance by immune cells. In these conditions, up-regulation of anti-apoptotic proteins will be independent of androgene deprivation. Furthermore, identification of drugs or experimental methods (downregulation by siRNAs) that decrease TRAIL decoy receptors expression for long time after androgen ablation may prove to be therapeutically useful alone or in combination with other therapeutic approaches (other molecular/protein target, chemotherapeutic agents) to induce apoptosis as treatment of prostate cancer or in otherwise resistant cancer cells.

For Peer Review

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Contard and N. Riu-Muzet for their technical assistance.

The authors thank AstraZeneca (Alderly House, Cheshire, England) for bicalutamide gift.

REFERENCES

1. Sarma AV, Schottenfeld D. Prostate cancer incidence, mortality, and survival trends in the United States: 1981-2001. Semin Urol Oncol 2002;20(1):3-9.

2. Guseva NV, Taghiyev AF, Rokhlin OW, Cohen MB. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. J Cell Biochem 2004;91:70-99.

3. Zornig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochem Biophys Acta 2001;1551:F1-F37.

4. Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer 2002;2:420-430.

5. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity 1995;3:673-682.

6. Pitti RM, Masters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 1996;271:12687-12690,.

7. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol 1999;11**:**255-260.

8. Zhang X, Jin TG, Yang H, DeWolf WC, Khosravi-Far R, Olumi AF. Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. Cancer Research 2004;64:7086-7091.

9. Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z, Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest 1999;104:155-62.

For Peer Review

10. Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis -inducing ligand in vivo. Nat Med 1999;5:157-63.

11. Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N, Tschopp J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-κB. Immunity 1997;7:831-836.

12. Pan G, Ni J, Wei YF, Yu GL, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science 1997;277:815-818.

13. Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. J Exp Med 1997b;186:1165-1170.

14. Sheridan JP, Masters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science 1997;277:818-821.

15. Masters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL countains a truncated death domain. Curr Biol 1997;7:1003-1006.

16. Pan G, Ni J, Yu GL, Wei YF, Dixit VM. TRUNDD : a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling. FEBS Lett 1998;424:41-45.

17. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin Is a Receptor For the Cytotoxic Ligand TRAIL. J Biol Chem 1998;273**:**14363-14367.

For Peer Review

18. Riccioni R, Pasquini L, Mariani G, Saulle E, Rossini A, Diverio D, Pelosi E, Vitale A, Chierichini A, Cedrone M, Foa R, Lo Coco F, Peschle C, Testa U. TRAIL decoy receptors mediate resistance of acute myeloid leukemia cells to TRAIL. Haematologica 2005;90:612-624.

19. Taplin ME, Ho SM. The endocrinology of prostate cancer. J Clin Endocr Metab 2001;86: 3467-3477.

20. Yu R, Mandlekar S, Ruben S, Ni J, Kong A-N.T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in androgen-independent prostate cancer cells. Cancer Res 2000;60:2384-2389.

21. Isaacs JT, Lundmo PI, Berges R, Martikainen P, Kyprianou N, English HF. Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. J Androl 1992;13:457-464.

22. Banerjee PP, Banerjee S, Tilly KI, Tilly JL, Brown TR, Zirkin BR. Lobe-specific apoptotic cell death in rat prostate after androgen ablation by castration. Endocrinology 1995;136: 4368-4376.

23. Omezzine A, Mauduit C, Tabone E, Nabli N, Bouslama A, Benahmed M. Caspase-3 and –6 expression and activation are targeted by hormone action in the rat ventral prostate during the apoptotic cell death process. Biol Reprod 2003;69:752-760.

24. Rokhlin OW, Bishop GA, Hostager BS, Waldschmidt TJ, Sidorenko SP, Pavloff N, Kiefer MC, Umansky SR, Glover RA, Cohen MB. Fas-mediated apoptosis in human prostatic carcinoma cell lines. Cancer Res 1997;57:1758-1768.

25. De la Taille A, Chen MW, Shabeigh A, Bagiella E, Kiss A, Buttyan R. Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. Prostate 1999;40:89-96.

For Peer Review

26. Woolveridge I, Taylor MF, Wu FC, Morris ID. Apoptosis and related genes in the rat ventral prostate following androgen ablation in response to ethane dimethanesulfonate. Prostate1998;36:23-30.

27. Vindrieux D, Réveiller M, Florin A, Blanchard C, Ruffion A, Devonec M, Benahmed M, Grataroli R. TNF-α Related Apoptosis-Inducing Ligand Decoy Receptor DcR2 is Targeted by Androgen Action in the Rat Ventral Prostate. Journal of Cellular Physiology. 2006;206:709-717.

28. Vindrieux D, Devonec M, Benahmed M, Grataroli R. Identification of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in adult rat ventral prostate. Mol Cell Endocrinol 2002;198:115-121.

29. Shi J, Zheng D, Lui Y, Sham MH, Tam P, Farzaneh F, Xu R. Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. Cancer Research. 2005;65:1687-1692.

30. Rokhlin OW, Taghiyev AF, Guseva NV, Glover RA, Syrbu SI, Cohen MB. TRAIL-DISC formation is androgen-dependent in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. Cancer Biol Ther 2002;1:631-637.

31. Bucur O, Ray S, Bucur MC, Almasan A. APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy. Frontiers in Bioscience 2006;11:1549-1568.

32. Rokhlin OW, Taghiyev AF, Guseva NV, Glover RA, Chumakov PM, Kravchenko JE, Cohen MB. Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. Oncogene 2005;45:6773-6784.

33. Amantana A, London CA, Iversen PL, Devi GR. X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. Mol Cancer Ther 2004;3:699-707.

For Peer Review

34. Chawla-Sarkar M, Bae SL, Reu FJ, Jacobs BS, Lindner DJ, Borden EC. Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPS (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. Cell Death and Differentiation 2004;11:915-923.

35. Hesry V, Piquet-Pellorce C, Travert M, Donaghy L, Jégou B, Patard JJ, Guillaudeux T. Sensitivity of prostate cells to TRAIL-induced apoptosis increase with tumor progression: DR5 and caspase 8 are key players. The Prostate 2006;66:987-95 .

36. Munshi A, McDonnell TJ, Meyn RE. Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. Cancer Chemother Pharmacol 2002;50:46-52.

37. Devi GR, XIAP as a target for therapeutic apoptosis in prostate cancer. Drug News Perspect 2004;17:127-134.

For Peer Review

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Androgen control of LNCaP cells proliferation. **A**: cells were treated with increasing concentrations of R1881 (1 pM- 10 nM) or with ethanol control (vehicle). Proliferation was measured 4 days later by [3H] thymidine incorporation with $*P < 0.005$ versus other concentrations and by cells number counting with $**P < 0.05$ versus other concentrations. **B**: cell cycle was analysed by flow cytometry after treatment with R1881, 1 pM, 0,1 nM, 10 nM, with its diluent ethanol (Ct) and with Etoposide 300 µM (positive control) and its diluent, DMSO; a representative cell cycle profil is presented. **C** and **D**: Cell cycle distribution analysis is reported, the values are expressed as the mean ± SD determined from two independent experiments, with triplicates cultures per traitment condition. **C**: percentage DNA fragmentation (S-G0), $*P < 0.005$ versus control and R1881 concentrations, $**P < 0.005$ versus

DMSO. **D**: percentage of cells in G0-G1 and in G2-M with $*P < 0.005$ and $**P < 0.005$ versus the other conditions treatment respectively.

Figure 2. Androgen control of TRAIL and TRAIL-receptors expression in LNCaP cells. Cells were treated for 4 days with increasing concentrations of R1881 (1 pM- 10 nM) or with ethanol control (vehicle). Proteins were characterized by immunoblot analysis using anti-TRAIL, anti-DR4 and anti-DcR1 antibodies (**A**), and with anti-DcR2 and anti-DR5 antibodies (**B**). Histograms represent corresponding protein levels and are normalized for ß-actin expression. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. For each protein a representative autoradiograph is shown. $*P < 0.005$ compared with control.

Figure 3 DcR2 and DR5 protein expression in cancer prostate cells when androgen action is cancelled out. **A** and **B**: in LNCaP cells incubated for 4 days with vehicle or R1881 0.1 nM or 10 nM without or with antiandrogen bicalutamide, 25 µM. **C** and **D**: in PC3 cells, devoided of androgen receptor, incubated for 4 days with increasing concentrations of R1881. Immunoblot results and histograms represent levels of DcR2 and DR5 and were normalized for ß-actin expression. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from two independent experiments. For each protein a representative autoradiograph is shown. $*P < 0.05$ versus the other treatment conditions.

Figure 4 Androgen regulation of TRAIL-induced apoptosis in LNCaP cells. After four days of culture with vehicle ethanol (Ct: control), or R1881, LNCaP cells were treated with increasing TRAIL concentrations for 24 hours. **A**: fragmented nuclei were investigated with DAPI staining and fluorescence microscopy. **B**: the quantity of fragmented nuclei was determined in LNCaP treated with increasing TRAIL concentrations for 24 hours. The values

For Peer Review

represent the mean ± SD of fragmented nuclei per thousand cells after analysis of 5000 randomly selected cells per culture and determined from five replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. *P < 0.005 versus TRAIL treated cells in androgen free and R1881 10 nM conditions.

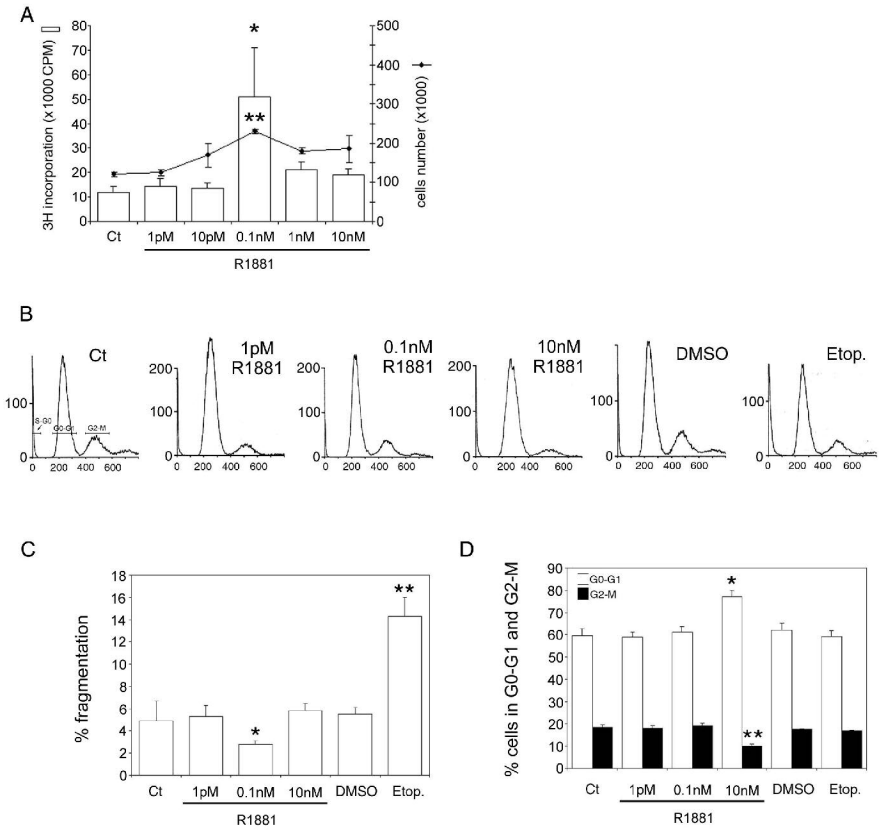
Figure 5 SiRNAs specific for DcR2 and DR5 suppress gene expression in LNCaP cells. Gene-specific siRNAs and the control siRNAs (0.5 µg) were added to the media using lipophilic transfection-enhancing reagent (lipofectamine) for 4h, then cells were cultured in media containing R1881 0.1 nM. Cells were harvested after 48 h or 96 h and immunoblot analyses were performed using DcR2 (**A**) and DR5 (**B**), specific antibodies. The blots were reprobed with antibody against beta-actin to confirm equal protein loading (15 µg). Representative autoradiograph results are shown and histograms represent protein level of DcR2 and DR5 and were normalized for ß-actin expression. **C**: the quantity of fragmented nuclei per thousand cells was determined in all transfection treatment conditions with DAPI method. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. *P < 0.005 versus the other treatment conditions.

Figure 6 Inhibition of DcR2 and DR5 protein expression by siRNA sensitizes LNCaP cells to TRAIL-induced apoptosis. LNCaP cells untransfected (Ct: control) or transfected with siDcR2 or siDR5 (0.5 µg) were treated with TRAIL (100 ng/ml) for 24 hours in media containing R1881 0.1 nM (**A**) or 10 nM (**C**). White arrows show fragmented nuclei detected by DAPI method. Histograms represent the quantity of fragmented nuclei per thousand cells from 5000 randomly selected cells per culture. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. a, P < 0.005, *P < 0.005 and **P < 0.005 versus the other

For Peer Review

treatment conditions. TRAIL-induced apoptosis, in previous conditions, was controled by caspase-3 activity assay (**B** and **D**). Histogram values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from two independent experiments performed respectively at R1881 0.1 nM (**B**), $*P < 0.005$ versus the other treatment conditions and at R1881 10 nM (**D**) $*P < 0.05$ with Fisher post-test, versus the other treatment conditions except versus control with TRAIL.

For Peer Review



VINDRIEUX et al., FIGURE 1

Figure 1. Androgen control of LNCaP cells proliferation. A: cells were treated with increasing concentrations of R1881 (1 pM- 10 nM) or with ethanol control (vehicle). Proliferation was measured 4 days later by [3H] thymidine incorporation with *P < 0.005 versus other concentrations and by cells number counting with **P < 0.05 versus other concentrations. B: cell cycle was analysed by flow cytometry after treatment with R1881, 1 pM, 0,1 nM, 10 nM, with its diluent ethanol (Ct) and with Etoposide 300 µM (positive control) and its diluent, DMSO; a representative cell cycle profil is presented. C and D: Cell cycle distribution analysis is reported, the values are expressed as the mean ± SD determined from two independent experiments, with triplicates cultures per traitment condition. C: percentage DNA fragmentation (S-G0), *P < 0.005 versus control and R1881 concentrations, **P < 0.005 versus DMSO. D: percentage of cells in G0-G1 and in G2-M with *P < 0.005 and **P < 0.005 versus the other conditions treatment respectively.
199x240mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

Vindrieux *et al.*, Figure 2

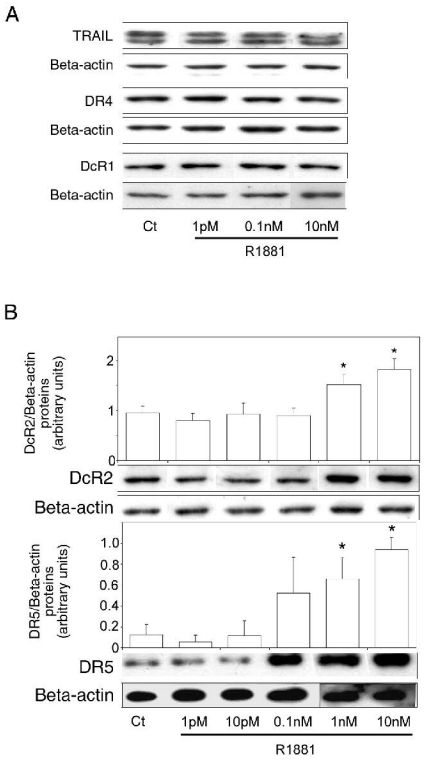


Figure 2. Androgen control of TRAIL and TRAIL-receptors expression in LNCaP cells. Cells were treated for 4 days with increasing concentrations of R1881 (1 pM- 10 nM) or with ethanol control (vehicle). Proteins were characterized by immunoblot analysis using anti-TRAIL, anti-DR4 and anti-DcR1 antibodies (A), and with anti-DcR2 and anti-DR5 antibodies (B). Histograms represent corresponding protein levels and are normalized for ß-actin expression. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. For each protein a representative autoradiograph is shown. *P < 0.005 compared with control.
199x240mm (300 x 300 DPI)

VINDRIEUX *et al.*, Figure 3

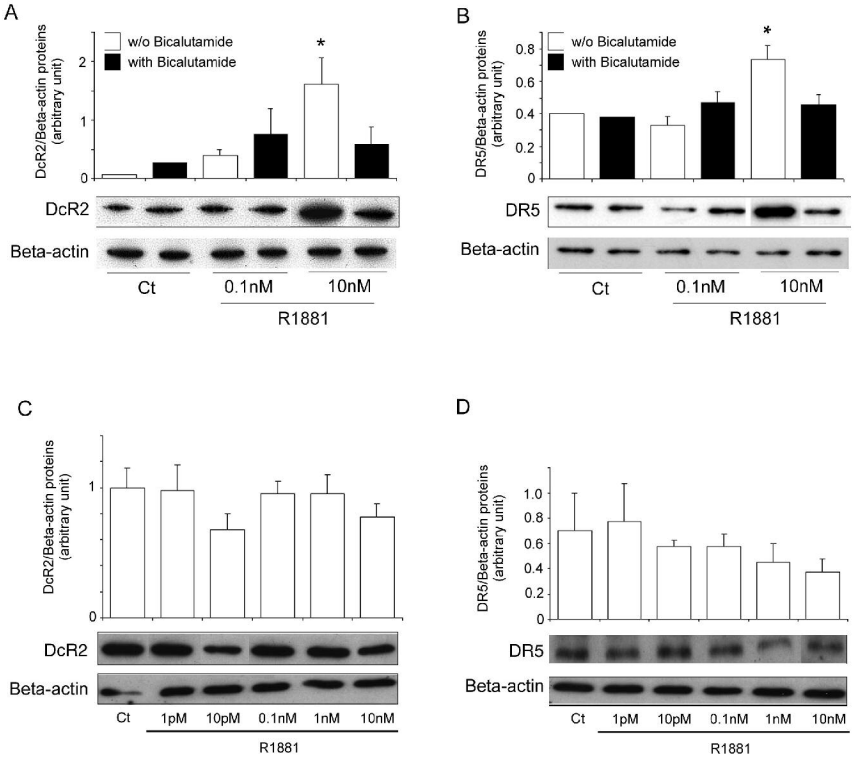


Figure 3 DcR2 and DR5 protein expression in cancer prostate cells when androgen action is cancelled out. A and B: in LNCaP cells incubated for 4 days with vehicle or R1881 0.1 nM or 10 nM without or with antiandrogen bicalutamide, 25 µM. C and D: in PC3 cells, devoided of androgen receptor, incubated for 4 days with increasing concentrations of R1881. Immunoblot results and histograms represent levels of DcR2 and DR5 and were normalized for ß-actin expression. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from two independent experiments. For each protein a representative autoradiograph is shown. *P < 0.05 versus the other treatment conditions.

180x240mm (300 x 300 DPI)

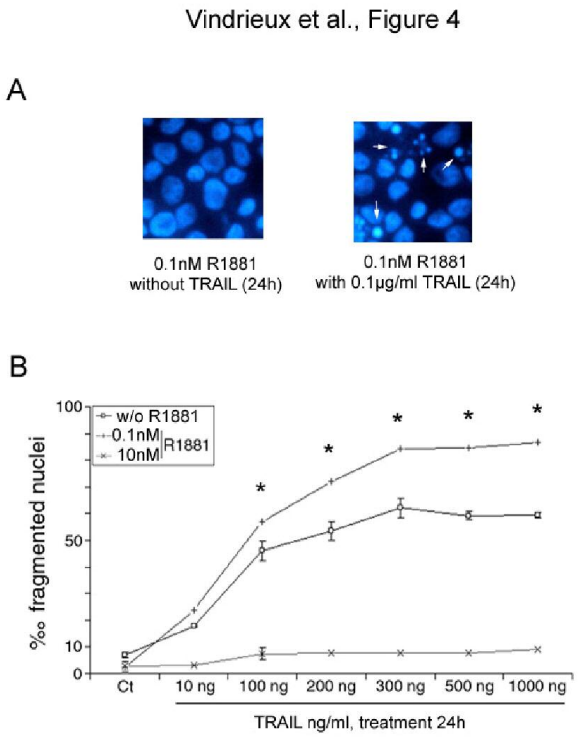


Figure 4 Androgen regulation of TRAIL-induced apoptosis in LNCaP cells. After four days of culture with vehicle ethanol (Ct: control), or R1881, LNCaP cells were treated with increasing TRAIL concentrations for 24 hours. A: fragmented nuclei were investigated with DAPI staining and fluorescence microscopy. B: the quantity of fragmented nuclei was determined in LNCaP treated with increasing TRAIL concentrations for 24 hours. The values represent the mean ± SD of fragmented nuclei per thousand cells after analysis of 5000 randomly selected cells per culture and determined from five replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. *P < 0.005 versus TRAIL treated cells in androgen free and R1881 10 nM conditions.

100x143mm (300 x 300 DPI)

Vindrieux et al., Figure 5

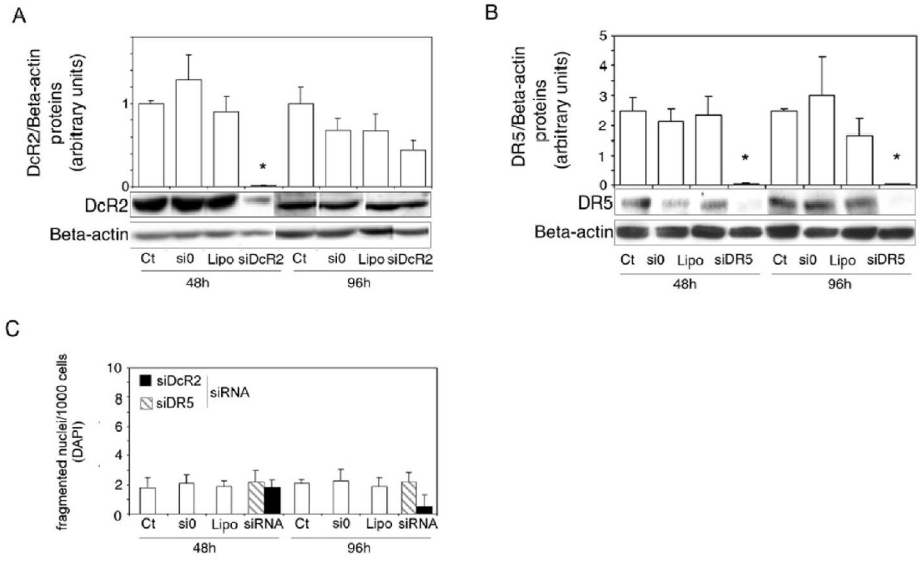


Figure 5 SiRNAs specific for DcR2 and DR5 suppress gene expression in LNCaP cells. Gene-specific siRNAs and the control siRNAs (0.5 µg) were added to the media using lipophilic transfection-enhancing reagent (lipofectamine) for 4h, then cells were cultured in media containing R1881 0.1 nM. Cells were harvested after 48 h or 96 h and immunoblot analyses were performed using DcR2 (A) and DR5 (B), specific antibodies. The blots were reprobed with antibody against beta-actin to confirm equal protein loading (15 µg). Representative autoradiograph results are shown and histograms represent protein level of DcR2 and DR5 and were normalized for ß-actin expression. C: the quantity of fragmented nuclei per thousand cells was determined in all transfection treatment conditions with DAPI method. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. *P < 0.005 versus the other treatment conditions.

162x195mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

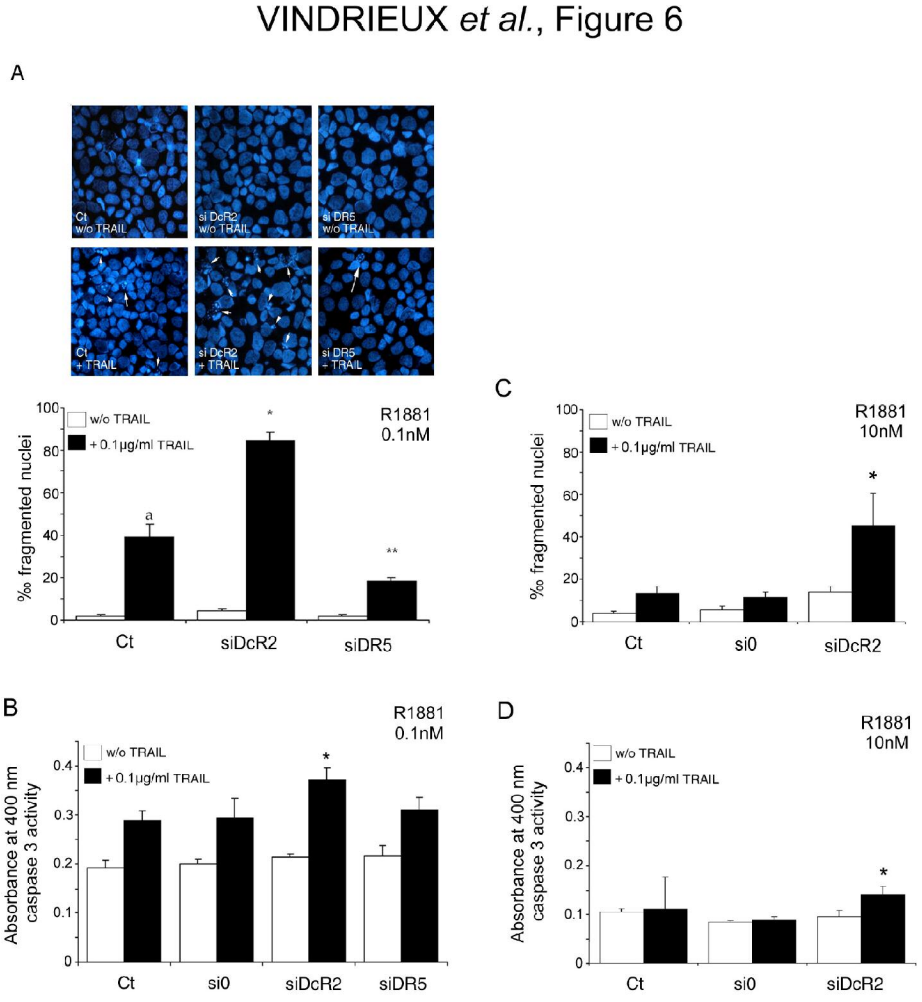


Figure 6 Inhibition of DcR2 and DR5 protein expression by siRNA sensitizes LNCaP cells to TRAIL-induced apoptosis. LNCaP cells untransfected (Ct: control) or transfected with siDcR2 or siDR5 (0.5 µg) were treated with TRAIL (100 ng/ml) for 24 hours in media containing R1881 0.1 nM (A) or 10 nM (C). White arrows show fragmented nuclei detected by DAPI method. Histograms represent the quantity of fragmented nuclei per thousand cells from 5000 randomly selected cells per culture. The values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. a, P < 0.005, *P < 0.005 and **P < 0.005 versus the other treatment conditions. TRAIL-induced apoptosis, in previous conditions, was controled by caspase-3 activity assay (B and D). Histogram values represent the mean ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from two independent experiments performed respectively at R1881 0.1 nM (B), *P < 0.005 versus

the other treatment conditions and at R1881 10 nM (D) *P < 0.05 with Fisher post-test, versus the other treatment conditions except versus control with TRAIL.
143x172mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

3-Etude d'un modèle de cancer prostatique humain chez la souris

Contexte d'étude

Nos précédents résultats ont montré une régulation des expressions de DR5 et DcR2, récepteurs pro et anti-apoptotiques du TRAIL, par les androgènes dans les cellules LNCaP hormonosensibles *in vitro*. Nous avons ensuite étudié la régulation de ces protéines par les androgènes *in vivo*, dans un modèle expérimental de cancer prostatique. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de xénogreffes de cellules LNCaP chez la souris nude largement utilisé dans la littérature. Les cellules LNCaP étant peu tumorigéniques, leur utilisation nécessite l'ajout de matrigel, un concentré de protéines de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance. Le mélange de matrigel aux cellules LNCaP au moment de l'inoculation favorise la prise tumorale. Sans matrigel, les cellules LNCaP ne prolifèrent pas et ne forment pas de tumeurs malgré l'immunodéficience partielle des souris nude.

Grâce à une collaboration avec AstraZeneca, nous avons pu obtenir de l'anti-androgène bicalutamide (Casodex®) dans le but d'induire une privation androgénique sur les tumeurs LNCaP hormonosensibles. Contrairement au flutamide, l'avantage du bicalutamide est qu'il est actuellement utilisé dans le cadre de l'hormonothérapie pour traiter les patients atteints d'un cancer prostatique. Nous avons donc développé un modèle expérimental de cancer prostatique humain hormonosensible, greffé en sous-cutanée chez la souris pour permettre un suivi aisé de la croissance tumorale, et traité avec un anti-androgène utilisé chez l'homme.

Dans un premier temps, nous avons contrôlé l'action anti-androgénique du bicalutamide *in vitro*. Nos résultats sont en accord avec la littérature et montrent une inhibition de la croissance des cellules LNCaP hormonosensibles. Bien que le R1881, analogue à la DHT, protège les cellules contre l'anti-androgène, une concentration en bicalutamide de 50 µM induit leur apoptose. L'apoptose a été montrée par plusieurs techniques complémentaires : le DAPI, la mesure de l'activité de la caspase 3 activée, et la fragmentation par cytométrie en flux.

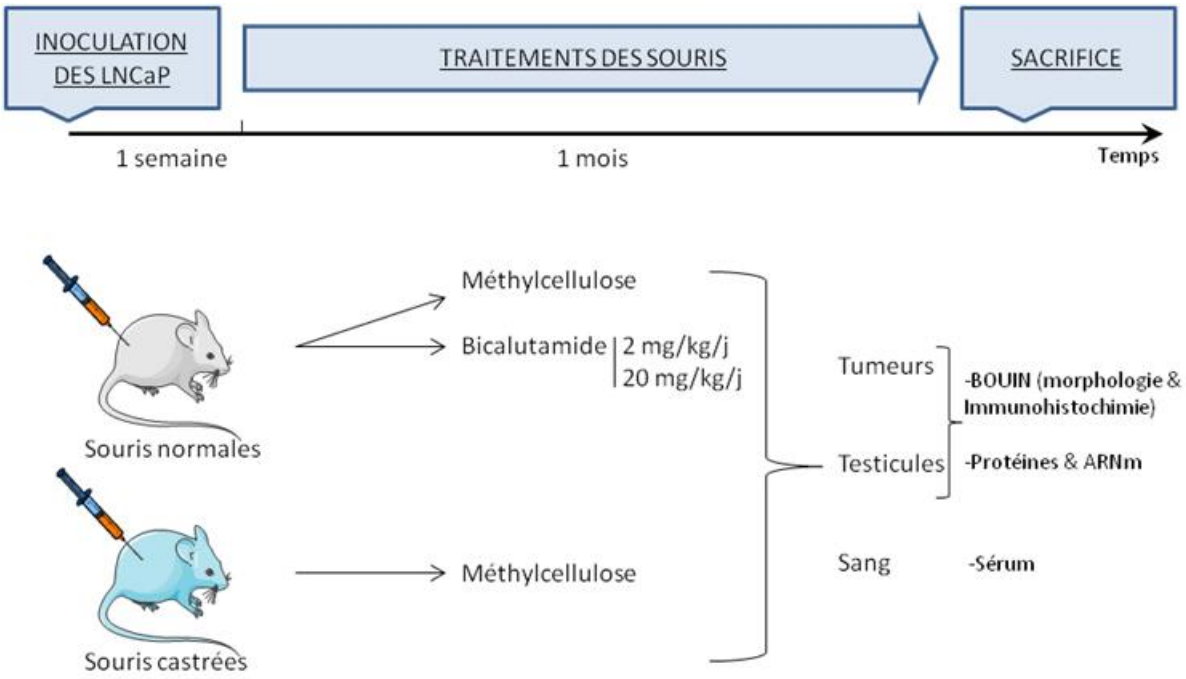


Figure 42 – Schéma récapitulatif du protocole d'expérimentation animale.

Résultats obtenus *in vitro*

Dans la littérature, le ligand TRAIL est souvent combiné à d'autres traitements (chimiothérapie, irradiation…) pour sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose. Les mécanismes reliés avec ces traitements et identifiés sont la surexpression des récepteurs de mort DR4 et DR5 ainsi que des protéines de la voie mitochondriale (Bax, Bak), et l'inhibition de l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, FLIP et NF-κB (El-Zawahry et al., 2005). Aucune étude n'a encore étudié l'impact de l'hormonothérapie sur l'expression des récepteurs au TRAIL, ni la possibilité d'utiliser ce traitement en combinaison avec TRAIL pour augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses prostatiques à l'apoptose. Nous avons donc combiné l'action du ligand TRAIL au bicalutamide sur les cellules LNCaP *in vitro* et montré une augmentation de l'apoptose de ces cellules comparée à l'apoptose induite par ces molécules seules.

Dans ces conditions, le bicalutamide augmente l'expression des récepteurs DR5 et DcR2 de façon identique dans les cellules LNCaP. Or, l'affinité des différents récepteurs pour leur ligand TRAIL n'est pas identique (Truneh et al., 2000). Les constantes de dissociation sont respectivement de 2, 70, 200 et 400 nM pour DR5, DR4, DcR1 et OPG, ce qui signifie que TRAIL a une meilleure affinité pour DR5 et une moins bonne pour l'OPG. L'affinité de DcR2 pour TRAIL n'a pas pu être déterminée dans cette étude. Si DcR2 a une affinité proche de celle de DcR1 pour TRAIL, on peut spéculer que l'augmentation de l'expression de DR5 induite par le bicalutamide serait plus efficace que celle de DcR2 et serait en faveur de l'apoptose. Comme beaucoup de molécules utilisées pour rendre les cellules cancéreuses plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL, le bicalutamide semble agir de la même façon en augmentant l'expression du récepteur de mort DR5.

Résultats obtenus *in vivo*

Après avoir validé l'action anti-androgénique du bicalutamide *in vitro* et démontré que les cellules LNCaP utilisées sont hormonosensibles, nous avons utilisé le bicalutamide dans le modèle de cancer prostatique humain chez la souris.

Protocole expérimental

Notre protocole a consisté en l'inoculation des cellules LNCaP en sous-cutanée chez des souris nude mâles adultes (figure 42). Une semaine après l'inoculation des cellules, les souris ont été randomisées en deux groupes de traitement : les souris contrôles traitées avec l'excipient du bicalutamide, la méthylcellulose, et les souris traitées au bicalutamide par voie

Références	Modèles	Etudes/Caractéristiques
(Culig et al., 1999; Hobisch et al., 2000)	Tumeurs LNCaP chez la souris nude supplémentée en testostérone Tumeurs LNCaP-abl chez la souris nude normale	Pas d'effet du Bic à 50 mg/kg In vitro : LNCaP-abl = LNCaP cultivées 10 mois dans du milieu destéroïdé In vivo : Tumeurs LNCaP-abl sont stimulées par le Bic à 50 mg/kg (+/- castration) et inhibées par la testostérone.
(Zaccheo et al., 2000)	Cancer prostatique de rat : Dunning R3327	Le traitement au Bic à 1 mg/kg/j pendant 9 semaines inhibe la croissance tumorale de 45%
(Sirotnak et al., 2002)	Tumeurs CWR22LD1 = cancer prostate humain hormono-sensible greffées chez la souris nude normale	1-Inhibition de la croissance tumorale de 50% et 80% à 25 et 50 mg/kg/j respectivement. 2-Effet du Bic dépend de la taille des tumeurs : -volume 50 mm3 : à 25 comme à 50 mg/kg/j : inhibition croissance tumorale de 45% - volume 10 mm3 : 50 mg/kg/j de Bic inhibe la croissance tumorale de 80%
(Hara et al., 2003)	Tumeurs LNCaP-hr chez la souris nude castrée Tumeurs LNCaP-cxd chez la souris nude castrée	In vitro : LNCaP-hr : LNCaP cultivées 2 semaines dans du milieu destéroïdé. In vivo : Tumeurs LNCaP-hr poussent parfaitement bien dans souris castrées et sont inhibées par 210 mg/kg/sem de Bic (donné en 2 fois/sem). In vitro : LNCaP-cxd : LNCaP cultivées à long terme dans du milieu destéroïdé + Bic. Leur RA présente une mutation en 741 induite par le Bic. In vivo : Tumeurs LNCaP- cxd sont stimulées par le Bic. dès 2,1 mg/kg/sem
(Compagno et al., 2007)	Tumeurs LNCaP chez la souris nude normale	Inhibition de la croissance tumorale par 50 mg/kg/j de Bic.

Tableau 6 - Etat de la littérature sur les doses de bicalutamide utilisées sur les modèles animaux de cancers prostatiques

Les travaux cités ci-dessus sont pour la plupart différents de nos conditions d'expérimentation rendant le choix des doses de bicalutamide (Bic) difficile pour nos expérimentations. En effet, Culig et al. n'observent pas d'effet du bicalutamide à 50 mg/kg/j vraisemblablement à cause de la supplémentation en testostérone des souris et travaillent sur un variant des cellules LNCaP (LNCaP-abl : LNCaP cultivées 10 mois dans du milieu destéroïdé). Zaccheo et al. travaillent sur un modèle de cancer prostatique de rat. Hara et al. étudient des variants des cellules LNCaP sur des souris castrées. Sirotnak et al. utilisent des tumeurs différentes des LNCaP mais qui présentent les mêmes caractéristiques. Sur ces tumeurs CWR22LD1, le bicalutamide inhibe la croissance tumorale à 25 mg/kg/j (proche de notre dose de bicalutamide utilisée de 20 mg/kg/j). La seule étude qui utilise les conditions d'expérimentations les plus proches des nôtres est l'équipe de Compagno qui montre une inhibition de la croissance des tumeurs LNCaP à 50 mg/kg/j de bicalutamide publiée récemment en octobre 2007.

orale pendant un mois. Plusieurs expérimentations ont été réalisées dans lesquelles deux doses de bicalutamide ont été testées (2 et 20 mg/kg/j). Un troisième groupe de souris a été ajouté dans chaque expérimentation où les cellules LNCaP ont été injectées dans des souris nude castrées permettant de contrôler leur hormonosensibilité. Le choix des doses de bicalutamide a été fait à partir de la littérature sachant qu'au moment de l'élaboration du protocole aucune publication n'avait décrit l'effet du bicalutamide dans nos conditions exactes d'expérimentations. Les tableaux 6 et 7 récapitulent quelques données bibliographiques de l'utilisation du bicalutamide sur des modèles de cancer de la prostate chez l'animal ainsi que sur les organes androgénodépendants. Pour résumer, le choix des doses a été effectué à partir de la dose maximale administrée chez l'homme en monothérapie, 150 mg/j qui est aussi efficace que le traitements par les agonistes de la LH-RH sur un cancer prostatique localement avancé et métastatique (Iversen et al., 2000; Tyrrell et al., 1998). Cette dose est équivalente à 2 mg/kg/j chez la souris ; puis une dose 10 fois supérieure a été choisie (20 mg/kg/j). Les sérums, testicules et tumeurs ont été prélevés sur chaque souris. L'analyse morphologique des tumeurs est essentielle car elle nous a permis d'éliminer les tissus prélevés qui ne contiennent pas de tumeurs (que du tissu conjonctif par exemple) ou les tumeurs qui présentent trop de nécrose. Par immunohistochimie avec un anticorps spécifique du PSA humain, nous avons vérifié que les tumeurs prélevées sont bien constituées de cellules LNCaP.

Effet du bicalutamide sur la croissance et l'incidence tumorale

De façon surprenante, nos résultats *in vivo* montrent que non seulement le bicalutamide à 20 mg/kg/j stimule la croissance des tumeurs LNCaP mais favorise aussi leur prise tumorale. L'incidence tumorale des souris traitées à la méthylcellulose est de 50%, alors qu'elle est supérieure à 90% pour les tumeurs des souris traitées au bicalutamide.

A ma connaissance, seule l'étude de Campagno et al. présente un effet inhibiteur du bicalutamide sur le modèle de tumeurs LNCaP hormonosensibles chez la souris nude, à la dose de 50 mg/kg/j (Compagno et al., 2007). D'autres travaux qui ont été effectués sur des cellules LNCaP « modifiées », ont montré un effet agoniste du bicalutamide sur ces cellules (cf tableau 6). Par exemple, des cellules LNCaP cultivées à long terme en présence de bicalutamide ont acquis une mutation sur le RA qui par conséquence stimule la croissance des cellules *in vivo* (Hara et al., 2003). Sironak *et al* ont montré que l'effet inhibiteur du bicalutamide sur la croissance des tumeurs CWR22LD1 (androgéno-sensibles) dépend de la taille des tumeurs au commencement du traitement (Sirotnak et al., 2002). Plus les tumeurs sont petites, plus le bicalutamide a un effet inhibiteur important sur la croissance tumorale.

Références	Animaux	Etudes/Caractéristiques
(Iswaran et al., 1997)	Rat	Etudes toxicologiques après 12 mois de traitement au Bic à 15 mg/kg/j : -atrophie des prostates ventrales de 5%, des vésicules séminales de 71%, des testicules de 5%. - hyperplasie des cellules de Leydig de 71%.
(Nickerson and Pollak, 1999)	Rat	Bic à 10 mg/kg/j pendant 4 jours : 85% d'apoptose dans la prostate ventrale
(Zaccheo et al., 2000)	Rat	-Atrophie prostate ventral et vésicules séminales et baisse de la DHT intra-prostatique par un facteur 4 par le Bic à 0,2 et 1 mg/kg/j 9 semaines. -Pas d'effet sur les testicules.
(Skarda, 2003)	Souris	Bic à 2,5 mg/kg/j pendant 15 jours : diminution poids vésicules séminales par 6.
(Kaya et al., 2005)	Rat	Bic 25 mg/kg/j pendant 28 jours : diminution du nombre de vaisseaux sanguins par 2 dans la prostate ventrale

Tableau 7 - Etat de la littérature sur l'effet du bicalutamide sur les organes androgéno-dépendants des rongeurs en fonction des doses.

Globalement, beaucoup d'études ont été réalisées chez le rat mais assez peu chez la souris. Quelques unes sont représentées dans ce tableau pour illustrer que le bicalutamide à faible dose est assimilée par les rongeurs et exerce un effet anti-androgénique sur les organes androgéno-dépendants des animaux. Néanmoins, si le bicalutamide a presque toujours un effet sur les prostates ventrales et vésicules séminales même à faible dose, ce n'est pas toujours le cas sur les testicules.

Dans nos expérimentations, le traitement au bicalutamide a été effectué une semaine après leur inoculation et donc sur des tumeurs de petites tailles (< 100 mm^3).

Les mêmes expérimentations ont été effectuées avec des cellules PC3 qui n'expriment pas le récepteur aux androgènes. Le bicalutamide est sans effet sur leur croissance tumorale confirmant que les mécanismes d'activation de la croissance tumorale des LNCaP par le bicalutamide impliquent la signalisation du RA.

L'hypothèse d'une action agoniste du bicalutamide sur les tumeurs LNCaP pour expliquer la stimulation de leur prolifération paraît peu probable car : i) les tumeurs LNCaP des souris castrées ont un taux de croissance quasi-nul démontrant que dans un environnement dépourvu d'androgènes, les tumeurs LNCaP ne poussent pas, ii) aucune mutation n'a été identifiée sur le site de liaison du ligand du RA dans les tumeurs LNCaP des souris traitées au bicalutamide, iii) enfin, nos résultats obtenus *in vitro* effectués sur les mêmes cellules ont démontré une action antagoniste du bicalutamide bien que les temps de traitement ne soient pas comparables (1 à 3 jours *in vitro versus* 1 mois *in vivo*).

Effet du bicalutamide sur un organe androgéno-dépendant de la souris : le testicule

Nous avons ensuite analysé les testicules de souris pour savoir si le bicalutamide présentait un effet anti-androgénique sur cet organe androgéno-dépendant. Le poids des testicules n'est pas modifié ni l'expression du gène *pem* qui contient un élément de réponse aux androgènes. La technique du TUNEL n'a pas révélé de différence du nombre de cellules en apoptose dans les testicules de souris en fonction des traitements. Cependant, cela ne signifie pas pas que le bicalutamide n'a pas eu d'effet sur le testicule car Omezzine et al., ont montré que l'apoptose est maximale à 3 jours de traitement à l'anti-androgène flutamide (Omezzine et al., 2003a). Ainsi, dans nos expérimentations, la vague d'apoptose est sans doute passée au bout d'un mois de traitement au bicalutamide. De plus, des travaux effectués avec le flutamide sur une durée de 28 jours sur le rat ont montré que si les poids des vésicules séminales et des prostates ventrales étaient diminués, le poids des testicules ne variait pas (Friry-Santini et al., 2007).

Le flutamide induit une augmentation de la sécrétion de LH par l'hypophyse, et par conséquence, la stimulation de la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig (Friry-Santini et al., 2007; Viguier-Martinez et al., 1983). Ainsi, **la seconde hypothèse que nous avons étudiée concernant le mode d'action du bicalutamide *in vivo*, est qu'il modifie l'équilibre hormonal de la souris altérant ainsi la prolifération des tumeurs LNCaP**.

Le dosage de testostérone n'a malheureusement pas donné de résultats exploitables, les taux mesurés étant très hétérogènes, dus sans doute aux prélèvements effectués tout au long de la

journée. Pour avoir un reflet de la synthèse de testostérone, nous avons analysé l'expression des gènes de la stéroïdogenèse. Le traitement au bicalutamide induit une augmentation de l'expression de l'enzyme 3βHSD. Friry-Santini et al. ont montré une augmentation de la transcription des enzymes de la stéroïdogenèse dans les cellules de Leydig de rat, dont la StAR, la Cytochrome P450scc et la 3βHSD par le flutamide expliquant ainsi l'augmentation de testostérone, ainsi qu'une hyperplasie des cellules de Leydig (Friry-Santini et al., 2007). Nos conditions expérimentales diffèrent de celle du groupe de Friry-Santini (rat/souris, flutamide/bicalutamide, doses) pouvant expliquer que dans nos résultats seule l'expression de la 3βHSD augmente et que nous n'observons pas d'hyperplasie des cellules de Leydig.
Pour résumer notre hypothèse sur l'action du bicalutamide *in vivo*, on peut dire qu'il a probablement perturbé les mécanismes de sécrétion de la LH de la souris et par conséquent modifié les processus de régulation des enzymes stéroïdogéniques au niveau du testicule. Il a induit une expression accrue d'une enzyme participant à la voie de biosynthèse des stéroïdes, la 3βHSD, qui favorise probablement une augmentation de testostéronémie. Ainsi, l'effet anti-androgénique du bicalutamide a pu être contrebalancé par une augmentation de testostérone stimulant la croissance des tumeurs LNCaP. Néanmoins, un dernier élément manquant à ces expérimentations qui paraît nécessaire pour vérifier cette hypothèse est le dosage de testostérone intra-testiculaire qui n'a pas pu être réalisé pour des questions techniques et de temps.

Analyse de l'expression de quelques gènes reliés au statut hormonal dans les tumeurs LNCaP
Les effets du bicalutamide et de la castration sur la croissance des tumeurs LNCaP étant opposés, nous avons étudié le profil d'expression de plusieurs gènes afin de mieux les caractériser en situations hormonales différentes : i) avec le traitement au bicalutamide qui stimule la croissance tumorale (probablement par l'augmentation de testostérone), ii) dans les souris castrées (inhibition de testostérone) qui inhibent la croissance tumorale.

Les tumeurs LNCaP des souris traitées au bicalutamide montrent une augmentation de l'expression du RA, et de deux gènes androgénorégulés dont les promoteurs contiennent des éléments de réponse aux androgènes, le PSA et le NEP. Ces augmentations d'expression en RA et PSA sont-elles causées par une augmentation de la testostéronémie due au bicalutamide ou par l'adaptation des cellules cancéreuses à un traitement à un anti-androgène (processus d'échappement hormonal) ?

L'expression de l'aromatase est également augmentée dans les tumeurs LNCaP ce qui indique une augmentation de la synthèse locale en œstrogènes par les cellules tumorales. De nombreux travaux ont montré que l'œstradiol peut se lier au RA et moduler sa voie de transcription. L'œstradiol stimule la prolifération des cellules LNCaP ainsi que l'expression du PSA, ces effets étant inhibés par le bicalutamide (Arnold et al., 2007; Migliaccio et al., 2000; Takahashi et al., 2007; Yeh et al., 1998).

Enfin, l'expression de REβ est augmentée dans les tumeurs LNCaP des souris traitées au bicalutamide alors que l'expression du REα dans les tumeurs LNCaP est très faible et ne varie pas. Il a été montré que l'expression du REβ diminue dans les cancers prostatiques en développement, mais est ensuite fortement augmentée dans les métastases des os et ganglions lymphatiques des cancers de prostate (Lai et al., 2004; Leav et al., 2001; Signoretti and Loda, 2001). REβ ne semble pas indispensable dans l'initiation du cancer de la prostate mais semble faciliter la survie cellulaire à des sites distants. Récemment, plusieurs travaux ont montré un rôle du REβ dans la signalisation du RA. Le REβ s'associe au RA et régule l'expression des gènes androgéno-dépendants (Arnold et al., 2007; Migliaccio et al., 2000). L'inhibition de l'expression du REβ par siRNA inhibe la prolifération des cellules LNCaP induite par l'œstradiol et la DHT, et inhibe l'expression des gènes androgénorégulés (Arnold et al., 2007; Maggiolini et al., 2004; Takahashi et al., 2007). Dans notre modèle expérimental, le REβ participe probablement avec le RA à la stimulation des gènes androgénorégulés comme le PSA et le NEP, mais ne module pas l'expression des deux gènes œstrogénorégulés étudiés, le pS2 et AP2-γ.

Dans ce contexte hormonal, les expressions des récepteurs au TRAIL, DR5 et DcR2, ainsi que la protéine FLIP ne sont pas modifiées.

Les tumeurs LNCaP inoculées dans les souris castrées survivent dans un environnement dépourvu d'androgènes. Elles ont une expression en RA plus élevée que les tumeurs des souris contrôles. La surexpression du RA est une des causes d'échappement hormonal des cancers prostatiques (Chen et al., 2004; Gregory et al., 2001; Koivisto et al., 1997; Visakorpi et al., 1995). Normalement, un des indices de la récurrence des cancers prostatiques est l'augmentation importante du taux de PSA alors que le patient est sous hormonothérapie. Dans nos expérimentations, le PSA sérique des souris castrées est plus faible que les souris contrôles ce qui signifie que les tumeurs LNCaP des souris castrées sont toujours hormonosensibles, comme l'indique aussi le taux de croissance quasi-nul.

D'autre part, les tumeurs LNCaP des souris castrées sous-expriment le récepteur de mort DR5 et sur-expriment les protéines anti-apoptotiques DcR2, $FLIP_L$ et $_S$. Deux études récentes ont montré que l'augmentation de DcR2 dans les cancers prostatiques par rapport au tissu sain est corrélée à un score de Gleason élevé, à la récurrence du PSA ainsi qu'à une diminution de la survie (Koksal et al., 2008; Sanlioglu et al., 2007b). La protéine FLIP qui inhibe aussi l'activation de la caspase 8 au niveau du DISC est impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses prostatiques à l'apoptose induite par TRAIL (Zhang et al., 2004). Gao et al. ont montré que la surexpression de FLIP accélère la transformation de cellules androgéno-sensibles vers l'androgéno-indépendance (Gao et al., 2005). Au vue de ces résultats, nous pouvons dire que la surexpression des protéines anti-apoptotiques comme DcR2 et FLIP dans notre modèle d'expérimentation est un des mécanismes de résistance utilisé par les cellules cancéreuses pour contrer l'apoptose induite par les ligands de mort dont TRAIL et favoriser les voies de survie cellulaire (O'Kane et al., 2006).

Ces résultats font l'objet d'un article en cours de rédaction. Cependant, il convient de compléter ces résultats par quelques analyses complémentaires comme un dosage de la testostérone en intra-testiculaire qui nous permettrait de confirmer l'hypothèse d'un effet du bicalutamide sur l'axe hypothalamo-hypophysaire résultant en une augmentation de testostérone alors responsable de l'effet stimulant de la croissance tumorale des LNCaP. Sans ce dernier argument, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'un échappement des tumeurs LNCaP par le traitement au bicalutamide. En effet, plusieurs travaux ont montré que cet anti-androgène peut avoir un effet agoniste dans certaines conditions. Brièvement, Chen et al. suggèrent qu'une forte expression en RA confère aux cellules une résistance au bicalutamide qui dans certains cas agit comme agoniste (Chen et al., 2004). Les auteurs mettent en cause une modification de l'assemblage des cofacteurs du RA. Festuccia *et al* ont montré une stimulation de l'expression d'EGFR et Her-2 des cancers de prostate de patients traités 120 jours en monothérapie au bicalutamide 150 mg/j. Ces protéines interagissant avec la voie de signalisation du RA sont impliquées dans la prolifération et l'invasion cellulaire (Festuccia et al., 2005; Gravina et al., 2007; Osman et al., 2001). Enfin, le bicalutamide peut avoir une action agoniste à faible concentration *in vitro* sur la voie des MAP Kinases (voie non génomique du RA) (Unni et al., 2004).

Article en cours de rédaction :

INTRODUCTION

Prostate cancer is henceforth the most frequent male cancer (25% of the new male cancers) ahead of lung cancer or colorectal cancer, and the second mortality cause per cancer in men (Sarma and Schottenfeld, 2002). As in a normal prostate, the development of prostate cancers depends on androgens (Marker et al., 2003; Taplin and Ho, 2001). Hormone therapy consisting on androgen deprivation is the main treatment of locally advanced or metastatic prostate cancers when no treatment has been possible at a localized stage (Huggins and Hodges, 2002; Labrie et al., 1982). Androgen deprivation causes apoptosis of hormonosensitive cancerous prostatic cells and results in a regression of the tumour and an improvement of the prognosis (Isaacs et al., 1992). But, tumours will always escape to androgen deprivation by apoptosis resistance leading to cancer cell extension. This explains the importance to study apoptosis induced by androgen deprivation in hormonosensitive prostate cancer in order to develop more effective therapeutic approaches to induce cell death in prostate cancer (Guseva et al., 2004). It has been suggested that treatment with apoptosis-inducing ligands belonging to Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-α) family would be an effective strategy for cancer treatment (Ashkenazi, 2002; Zornig et al., 2001). Unfortunately, TNF-α and Fas ligand (FasL) have severe systemic cytotoxic effects, limiting their use as systemic agents. Unlike TNF-α and FasL, TRAIL has been used effectively in systemic animal trials and has the unique feature of inducing apoptosis in cancer cells and sparing normal cells (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Therefore, TRAIL may be a promising candidate for treatment of cancer. Five receptors to TRAIL are known today. Two receptors, DR4 and DR5, transmitting apoptotic signal in the cells are said to be pro-apoptotic. Three other receptors, DcR1, DcR2 and OPG, do not transmit apoptotic signal and are thus considered as anti-apoptotic. DcR2 is a decoy receptor of TRAIL that has a truncated cytoplasmic death domain (Degli-Esposti et al., 1997). In the absence of DcR2, the ligand TRAIL binds itself to the DR4 and/or DR5 death receptors; their death domains will recruit the adapter protein FADD and the pro-caspase 8 that constitute the DISC (Death Inducing Signalling Complex) leading to the activation into the caspase 8 and 10 (Sprick et al., 2000). In the presence of DcR2, the ligand TRAIL binds itself to DR5 and DcR2 that combine at the level of DISC (Clancy et al., 2005; Merino et al., 2006). Because of its truncated death

domain, DcR2 inhibits the recruitment of adapter proteins in the DISC and hence the transmission of the TRAIL apoptotic signal. Few works about TRAIL ligand and receptors in prostate cancer have studied their relation with androgen. Rokhlin *et al*. reported the TRAIL-DISC formation is androgen-related in LNCaP cells (Rokhlin et al., 2005; Rokhlin et al., 2002). Our previous studies showed that the expression of two TRAIL-receptors DR5 and DcR2, and the cell death induced by TRAIL ligand are androgen-related in LNCaP cells.

To improve understanding of mechanisms regulation of TRAIL receptors genes related to androgen in prostate cancer, we have used the animal model of hormonosensitive human prostate tumours from LNCaP cells grafted on nude mice. We have studied the influence of the hormonal context of the mice on the tumour growth either by treating the mice with bicalutamide in comparison with castration. The bicalutamide is used within hormone therapy under well-defined conditions. It can be administered to patients in a 50 mg dose with a locally advanced or metastatic prostate cancer either combined with a LH-RH agonist, or as a monotherapy with 150 mg (Iversen et al., 2000; Kolvenbag et al., 1998). In literature, the combination of treatments like chemotherapy and irradiation with TRAIL has been frequently used in order to sensitize cancer cells to TRAIL apoptosis *in vitro* and *in vivo* (El-Zawahry et al., 2005). However, no study have ever analysed if hormone therapy can increase sensibility of cancer prostatic cells to TRAIL apoptosis.

In this study, we have first shown anti-androgenic effect of bicalutamide on LNCaP cells *in vitro* and expressions of DR5 and DcR2 have been analysed. In these conditions, co-treatments with bicalutamide and TRAIL simultaneously increased LNCaP apoptosis. Secondly, we have shown stimulation of LNCaP tumours by treating the mice with bicalutamide whereas castration inhibits their growth. In this model, we analysed effect of bicalutamide on proliferation and some steroidogenic genes expression in mice testis, an androgen-regulated tissue. Then, we have reported TRAIL receptors expression, androgen sensitive genes expression and oestrogen receptors expression in LNCaP tumours to understand the relation between tumour growth and hormonal background.

MATERIALS AND METHODS

In vitro Studies

Cell Culture and Materials

The human prostatic carcinoma cell line LNCaP and PC-3 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD). The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), supplemented with 7.5% fetal calf serum (FCS) (Invitrogen), 2 mM L-Glutamine (Sigma, Isle d'Abeau, France), 20 µg/ml streptomycin, 20 U/ml penicillin (Invitrogen), and 50 U/ml Nystatin (Sigma). LNCaP and PC3 cells were used between the passages 37-47 and 15-17 respectively. R1881, a testosterone analogous, was purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Bicalutamide was a gift from AstraZeneca (Alderly House, Cheshire, England). TRAIL ligand was purchased from PeproTech France.

Cell Proliferation and Treatment

Cell proliferation was performed by measuring [^{3}H] thymidine incorporation. LNCaP cells were plated in quadruplicate in 12-well plates at a density of 8.10^4 cells/well (Corning Incorporated, Corning, NY) in steroid-depleted media containing 2.5% charcoal-stripped FCS (HyClone, Logan, UT) supplemented with 0.1 nM R1881. After 48h, the medium was remplaced by a new one supplemented with 0.1 nM R1881 and bicalutamide at various final concentrations: 1, 10 and 50 µM, for 24, 48 and 72h. Two hours before harvesting cells, 0.5 µCi/ml [^{3}H] thymidine (Du Pont-New England Nuclear, Les Ulis, France) was added in medium. The cells were washed twice with ice-cold PBS, trypsinated and precipitated with 0.5 N perchloric acid for one hour at 4°C. After centrifugation, pellets were dissolved in 150 µl of 0.5 N NaOH and incorporated [^{3}H] thymidine was determined by liquid scintillation counting. Three control conditions were integrated to the experiment: R1881 alone, bicalutamide at 50 µM alone, and ethanol (10^{-5}%)-methanol (0.5%), which were R1881 and bicalutamide vehicle respectively.

Same treatments were applied for further apoptosis experiments, western-blotting and real-time PCR analysis, with LNCaP cells seeded in 6 cm disk (8.10^5 cells).

Caspase Activity Assay

For apoptosis assay, TRAIL was added or not in culture medium at 0.1 μg/ml final concentration for 3 hours before harvesting cells. Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in cell lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA and 10 mM Tris–HCl, pH 7.5) for 10 min on ice (Kit Amersham). Proteins (200 μg) were mixed with caspase assay buffer (50 mM Hepes, pH 7.2, 50 mM NaCl, 0.1% CAPS, 10 mM EDTA, 5% glycerol and 10 mM dithiothreitol) containing 200 μM DEVD-pNA substrate and incubated for 2 h at 37 °C. Enzyme catalyzed release of pNA was monitored using spectrophotometer at 405 nm.

Apoptosis assessment with 4', 6'-diamidino-2 phenylindole staining (DAPI)

The LNCaP cells undergoing apoptosis were evaluated by chromatin condensation, nuclear shrinkage, and formation of apoptotic bodies, all visualized with DAPI staining. After various designated treatments, medium was removed and cells were fixed with ethanol/acetic acid (3:1, vol/vol) at room temperature for 10 minutes. Cells were washed with NaCl 0.9% and stained with 0.4 μg/ml DAPI at room temperature for 30 minutes and visualized under an inverted fluorescence microscope and photographed.

***In vivo* Studies**

Xenografts in Nude Mice

Animals' studies were conducted in accordance with the guidelines of the French Ministère de l'Agriculture.

Six-week-old athymic male nude mice (Hsd: athymic nude/Nu) were purchased from Harlan (Gannat, France). Mice were inoculated s.c. in the right and left flanks with 100 μL of 5 x 10^6 LNCaP cells resuspended in 50% (v:v) High-Concentration Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA). After one week, animals were randomized into three groups and treated by daily gavage in a volume of 1 ml/100g for up to one month. In the first experiment, group 1 received 2 mg/kg/j of bicalutamide in 0.5% methylcellulose containing 0.4% Tween-80. This dosage is equivalent to the human monotherapy treatment (150 mg/j). Group 2, the control, received the vehicle. The third group contained mice which were castrated three days before cells injection to control the androgen-sensitivity of the inoculated LNCaP. In two others experiments, same treatments groups were done, with 20 mg/kg/j of bicalutamide instead of 2. Tumour volume was calculated twice weekly by measuring three tumour dimensions with a caliper by the formula length x width x depth x 0.5236 (Janik *et al*., 1975). Mice number was

about 6 to 14 per group beyond the experiments. When the mice were killed, testis and tumours were collected; one part was fixed in Bouin's solution and paraffin-embedded for further morphology and immunohistochemistry analysis, the second part was snapfrozen in liquid nitrogen and stored at –80°C for biochemicals analysis. Blood samples were taken to determine the serum PSA and testosterone levels.

To verify that bicalutamide effect on LNCaP growth tumour implicated the androgen receptor, the same experiment was performed with PC3 hormonoresistant xenograft. Mice were either treated with 20 mg/kg/j of bicalutamide or with vehicle.

Morphology Studies and Immunohistochemistry

Parrafin-embedded tumor sections (5 µm thick) of the LNCaP and PC3 xenograft were mounted on positively charged glass slides (Superfrost Plus; Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany). The sections were deparaffined, rehydrated and first colored by Papanicolaou using an automated apparatus to analyse tumour morphology. Tumours with connective tissue or/and necrosis up to 50% of the section were eliminated and only the most homogeneous tumours were selected for further biochemicals analysis.

LNCaP tumours sections were stained immunohistochemically with antibody against PSA (A 0562, Dakocytomation). The experimental procedures were carried out as previously described (Vindrieux *et al*., 2006). The primary antibody was incubated at the appropriate concentration (1:4000) at 4°C overnight. The secondary antibody, horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-rabbit, was incubated for 30 min at 37°C. Sections were then incubated with DAB (3.3'-diaminobenzidine), counterstained with Mayer's haematoxylin, and mounted. Negative control experiment was done by omitting the primary antibody.

TRIzol RNA and Protein Extraction

The coordinated, simultaneous extraction of RNA and proteins from tumours which are heterogeneous sample is crucial for accurate correlations on the transcriptome and proteome. TRIzol extraction of total RNA and subsequent extraction of protein were carried out essentially according to the manufacturer's specifications (Invitrogen) on tumours and testis samples.

To ~3-mm diameter tissue, 1 ml of TRIzol (Life Technologies, Eragny, France) was added, and the sample was homogenized with a manual pestle. Following incubation for 5 min at room temperature, 0.2 ml of chloroform was added, and the tubes were shaken for 15 sec and

then incubated for 3 min at room temperature. This mixture was then centrifuged at 12,000 x g for 15 min at 4 °C. Aqueous phase (RNA) was transferred to a new tube, and the lower organic phase was saved for protein extraction. Isopropanol (0.5 ml) was added to the aqueous phase; the sample was mixed and then incubated for 10 min at room temperature prior to centrifugation at 12,000 x g for 10 min at 4 °C. The RNA pellet was washed with 1 ml of 75% ethanol, centrifuged at 7,500 x g for 5 min at 4 °C, and air-dried for 5–10 min. The RNA pellets were dissolved in 40µl of RNase-free water and stored at –80°C.

For protein extraction, DNA was precipitated from the organic phase by the addition of 0.3 ml of 100% ethanol. The sample was mixed by inversion, incubated for 3 min at room temperature, and centrifuged at 2,000 x g for 5 min. The phenol/ethanol phase was transferred to new tube and 1.5 ml of isopropanol was added. The sample was mixed and incubated for 10 min, and the precipitated protein was pelleted at 12,000 x g for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was washed three times using 2 ml of 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol with 20-min incubations at room temperature and centrifugation at 12,000 x g for 10 min. Then a final wash was done by adding 2 ml of ethanol on the protein pellet, vortexing and incubating for 20 min at room temperature prior to a centrifugation at 12,000 x g for 10 min. The sample was vacuum dried and dissolved in 1% SDS.

Real-time Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted using TRIzol reagent and the amount was estimated by spectrophotometry at 260 nm. Single-strand cDNAs were obtained from the reverse transcription (RT) of 1µg total RNA in 20 µl of reaction volume, as described earlier (Vindrieux *et al*. 2006).

The quantitative real-time PCR using the LightCycler Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Basel, Switzerland) were performed on diluted RT mix (1/10). Each reaction volume (20 µl) contained 5 µl cDNA 1/10, 10 µl of SYBR Green, 1 µl of primers at 10 µM, and 4 µL RNase free water. The amplification program consisted in initial activation of HotStart Taq DNA Polymerase for 15 min at 95 °C, followed by 50 cycles in three steps: 15 sec at 95 °C, 20 sec at T °C, and x sec at 72 °C, x depending on amplicon size (see table 1). The presence of a unique amplicon was verified for each primer on agarose gel and by observing the melting

curve. A dilution series of the purified target amplicon was submitted to PCR to check the PCR efficiency and to be used as standard curve for the quantification analysis.
The cDNA was amplified using primers reported in table1. Primers were selected to be on different exon. Quantification of amplified cDNA in each experimental condition was determined by using the software RealQuant 1.0 (Roche Molecular Biochemicals).

Western Blot Analysis

Proteins from cells culture extracts were prepared by direct addition of five volumes of cold lysis buffer as previously described (Vindrieux *et al*. 2006). Proteins from tumor extracts were dissolved in 1% SDS. Protein concentration was determined by Bicinchoninic acid assay reagent (Sigma, Isle d'Abeau, France) and by using a bovine serum albumine as standard.
Protein samples were prepared in Laemmli buffer, separated on 12% SDS-polyacrylamide gels electrophoresis and electroblotted onto a nitrocellulose membrane treated as described earlier (Vindrieux *et al*. 2002). Membranes were incubated with the following human specific primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA): DcR2 clone E-12 (1:1,000), DR5 clone C-20 (1:1,000), AR clone N-20 (1:2,000), ERα clone D-12 (1:500), ERβ clone N-19 (1:100), CYP19 clone C-16 (aromatase) (1:100). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary antibody anti-rabbit IgG (1/10000) or anti-goat (1/10000). Bound antibodies were detected using chemiluminescent Western blotting Kit (Covalab, Lyon, France). Membranes were scanned using Luminescent Image Analyser 3000 (Fujifilm) and quantified using MultiGauge logiciel. The protein loading was checked by reprobing the blot with a rabbit IgG anti-β actine (1/10000) (Jackson).

Sequencing of Androgen Receptor cDNA after Reverse Transcription-PCR

PCR amplification was performed using specific human androgen receptor primers: antisens, CTTGCACAGAGATGATCTCTGC; sens, GTCCTGGAAGCCATTGAGCCA (Hara et al., 2003). PCR product size was about 681pb and corresponded to the 683-896 amino acid of the protein which is the domain ligand binding. cDNA (2 µl RT mixture 1/10) was amplified by PCR (PerkinElmer GeneAmp PCR System 9700) with Taq DNA polymerase (0,02 U/µl), dNTP (100 µM), MgCl2 (1.5 mM) and primers (10 µM). Amplification conditions consisted of an initial denaturing step of 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 sec; 57°C for 30 sec; 72°C for 45 sec; followed by a final step at 72°C for 7 min. The size and the integrity of the

PCR product and the absence of contamination in the negative control sample (in which no DNA was added) were confirmed on 1.5% agarose gel.

Determination of Serum Prostatic-Specific Antigen (PSA) and Testosterone

Determination of PSA level was performed by Radioanalysis Laboratory at Lyon-Sud Hospital using a RIA kit (Beckman Coulter France S.A.S. Paris Roissy).

Determination of testosterone levels was performed by Hormonology Laboratory at Lyon-Sud Hospital using a kit (Beckman).

Data Analysis

Data are expressed as the mean ± SD. *In vitro* analyses were performed with two or three independent experimentations depending analyses. Three *in vivo* experiments were performed in which 14 mice per group were utilized corresponding at n = 15-23 tumours per condition. For statistical analysis, one-way ANOVA was performed to determine whether differences existed between all groups ($P<0.005$), and the Bonferroni/Dunn post-test was performed to determine the significance of the differences between the pairs of groups. A *P*-value less than 0.05 was considered to be significant. The statistical tests were performed on StatView software (version 5.0; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

TABLE 1: Primers' list

Target gene	Primer sequence	Amplified product size (bp)	Hybridation T°C	Ref
	Gènes humains			
TRAIL-R4	5'-AGTTCGTCGTCTTCATCGTCGC-3' 5'-GTTGGAAGCAATGGTGTAATCC-3'	217	53	
TRAIL-R2	5'-GAGCTGCCTTTTAGGG-3' 5'-GGCTGAAATGGTTACTGAG-3'	172	58	
AR	5'-TGTCAACTCCAGGATGCTCTACTT-3' 5'-TTCGGACACACTGGCTGTACA-3'	94	57	(Leotoing et al 2008)
PSA	5'-GCATCAGGAACAAAAGCGTGA-3' 5'-CCTGAGGAATCGATTCTTCAG-3'	141	57	(Leotoing et al 2008)
NEP	5'-ATCTTGTAAGCAGCCTCAGCCG-3' 5'-GCATCCATCCAAGTGAGG-3'	258	61	
FLIP-Long	5'-CCTAGGAATCTGCCTGATAATCGA-3' 5'-TGGGATATACCATGCATACTGAGATG-3'	125	55	(Benesch et al 2003)
FLIP-short	5'-GCAGCAATCCAAAAGAGTCTCA-3' 5'-ATTTCCAAGAATTTTCAGATCAGGA-3'	95	55	(Benesch et al 2003)
Aromatase	5'-CAGAGGCCAAGAGTTTGAGG-3' 5'-ACACTAGCAGGTGGGTTTGG-3'	245	51	
ERa	5'-CCTACTACCTGGAGAACG-3' 5'-CTCCTTGGCAGATTCCATAGCC-3'	160	55	
ERb	5'-CTCCTTTAGTGGTCCATCGCCAG-3' 5'-AGACAGCGCAGAAGTGAGCAT-3'	196	55	
pS2	5'-GGAGAACAAGGTGATCTGCG-3' 5'-CACACTCCTCTTCTGGAGGG-3'	236	62	(Lau et al., 2000)
AP2g	5'-AACAGACCCACACACTTAGCCATT-3' 5'-GCGGACACAAAAACCAACCA-3'	110	55	(Orso et al., 2004)
βαχτινε	5'-AGCCTCGCCTTTGCCGA-3' 5'-CTGGTGCCTGGGGCG-3'	173	54	
	Gènes souris			
Pem	5'-ACTGATGGATGCCTGTGTGTCC-3' 5'-ATCTCACTCCACGACAAGCAGG-3'	152	57	
Star	5'-TGTCAAGGAGATCAAGGTCCTG-3' 5'-CGATAGGACCTGGTTGATGAT-3'	337	55	(Volle et al., 2007)
17/20lyase	5'-CCAGGACCCAAGTGTGTTCT-3' 5'-CCTGATACGAAGCACTTCTCG-3'	250	55	(Volle et al., 2007)
3bHSD	5'-ATGGTCTGCCTGGGAATGAC-3' 5'-ACTGCAGGAGGTCAGAGCT-3'	207	55	(Volle et al., 2007)
P450scc	5'-CTGCCTCCAGACTTCTTTCG-3' 5'-TTCTTGAAGGGCAGCTTGTT-3'	195	53	(Volle et al.,

				2007)
17bHSD	5'-GCCAACTCAAATGAATAGGCTTTC-3' 5'-TGGGACAATGGGCAGTGAT-3'	66	55	(O'Shaughness et al., 2002)
FSH-R	5'-GTGCTCACCAAGCTTCGAGTCAT-3' 5'-AAGGCCTCAGGGTTGATGTACAG-3'	188	53	(Volle et al., 2007)
LH-R	5'-AGCTAATGCCTTTGACAACC-3' 5'-GATGGACTCATTATTCATCC-3'	262	51	(Volle et al., 2007)

Target gene	Primer sequence	Amplified product size (bp)	Hybridation T°C	Ref
SF1	5'-TGCAGAATGGCCGACCAG-3' 5'-TGGCGGTAGATGTGGTC-3'	145	55	(Volle et al., 2007)
Cyclin E	5'-CTGGCTGAATGTCTATGTCC-3' 5'-TCTTTGCTTGGGCTTTGTCC-3'	386	55	(Volle et al., 2007)
Cyclin D2	5'-CGATGATTGCAACTGGAAGC-3' 5'-TTCAGCAGCAGAGCTTCGAT-3'	169	51	(Volle et al., 2007)
Cyclin A1	5'-GATGTGTATGAAGTCGACACC-3' 5'-GTGGGGTCAACCAGCATTGG-3'	92	55	(Volle et al., 2007)
Actine	**5'-GCCTTCATACATCAAGTTGG-3' 5'-TAAGAGGAGGATGGTCGC-3'**	**193**	**55**	

RESULTS

1- Effect of the bicalutamide on growth and apoptosis of LNCaP cells *in vitro*

Before using bicalutamide *in vivo*, we have validated the anti-androgen action of bicalutamide *in vitro* on the hormonosensitive LNCaP cells as described in the literature.

At first, we have studied the effect of bicalutamide on LNCaP cell growth. As shown in figure 1A, tritiated thymidine uptake is maximal for the cultivated cells in the presence of 0.1 nM R1881 alone (this concentration is optimal for the growth of these cells). The control condition without R1881 represents the basal level of tritiated thymidine uptake of the LNCaP cells cultivated in an environment with no androgens. At 72h of treatment, the tritiated thymidine uptake by the LNCaP cells is significantly reduced starting from 10 to 50 μM of bicalutamide compared to R1881 alone ($P < 0.0001$). At 24h of treatment, only the 50 μM dose of bicalutamide inhibits the proliferation of LNCaP cells (data not shown).

We have then studied the effect of bicalutamide on the apoptosis of LNCaP cells by measuring the activity of the activated caspase-3 (Figure 1B). Firstly, without TRAIL, the 50 μM bicalutamide induces a significant increase by factor 2 of the caspase-3 activity compared to R1881 alone ($P < 0.0001$). The 10 μM bicalutamide does not induce any variation of activated caspase-3 compared to R1881, so this concentration that inhibits the growth of LNCaP cells is not sufficient to induce their apoptosis. Therefore it seems that the R1881 protects the LNCaP cells against apoptosis induced by the bicalutamide at 10 μM but not at 50 μM.

Secondly, TRAIL addition significantly increases the activity of the caspase-3 under all the conditions under study. In presence of bicalutamide at 50 μM, caspase 3 activity TRAIL-induced is significantly increased by factor 2 ($P < 0.0001$) compared to the condition with R1881 + TRAIL. Cell death was confirmed by a DAPI staining in these conditions by visualizing fragmented nuclei (figure 1C).

Thus we have first validated the anti-androgen action of the bicalutamide on LNCaP cells growth *in vitro* and shown its apoptosis inducer effect (factor 2 at 50 μM). Interestingly, we have shown for the first time the rider effect of the bicalutamide and the ligand TRAIL on the LNCaP cells apoptosis.

Then, we have analysed PSA and androgen receptor (RA) expressions in LNCaP cells under bicalutamide treatments. The PSA transcript level is inhibited by only 1 μM of bicalutamide and as soon as 24h of treatment (about 40% with $P < 0.0001$) (figure 2A). So, with this little

dose of 1 μM, bicalutamide inhibits the RA transcriptional activity on PSA gene whereas it neither inhibits proliferation nor induces apoptosis. The regulation of PSA gene is so subtle. RA transcript and protein expressions were reduced about 60% ($P < 0.0001$) and 40% ($P = 0.0017$) respectively at 72h of treatment with 50 μM bicalutamide (figure 2B).

Our previous studies have shown that the reduction of the TRAIL-receptor DcR2 expression correlates with the apoptosis within the rat ventral prostate induced by castration. We have also shown that, *in vitro*, within the LNCaP cells, the DcR2 and the DR5 expressions are regulated by androgens. Then, we characterized the expression of DR5 and DcR2 in presence of the anti-androgen bicalutamide. Figures 1C-D show that R1881 with 50 μM bicalutamide significantly increases the DR5 and DcR2 protein expressions by factor 4 compared to R1881 without bicalutamide ($P < 0.0001$). Thus the DR5 expression, a pro-apoptotic receptor, is stimulated by the treatment by bicalutamide and should be related to the apoptosis increase of the LNCaP cells in the presence of bicalutamide. However, the bicalutamide also increases the expression of the DcR2 decoy receptor considered as anti-apoptotic.

2- Effect of the bicalutamide on tumour growth

Having validated the anti-androgen action of the bicalutamide *in vitro* on the LNCaP cells, we next studied its effect on tumour growth and TRAIL receptors expressions.

The same LNCaP cells used for the experimentations *in vitro* were injected subcutaneously in adult male nude mice. A week after cell injection, mice were randomized in two treatment groups: the control group of mice treated with the bicalutamide vehicle, the methylcellulose, and the bicalutamide group. Historically, we tested in preliminary experimentations with reduced number of mice (4-6 mice per group), two doses of bicalutamide: 2 and 20 mg/kg/j for up to one month. Treatment with 2 mg/kg of bicalutamide per day has no effect on tumours growth as shown in figure 3A, whereas treatment with 20 mg/kg/j seemed to increase LNCaP tumour growth (data not shown). So, we performed a more important experimentation with 14 mice per group to be statistically strong. Mice received either 20 mg/kg of bicalutamide or methylcellulose per day for one month. Figure 3B shows that the daily 20 mg/kg bicalutamide significatively stimulates LNCaP tumour growth by a factor 3 from three weeks treatment ($P = 0.0057$) and by a factor 1.7 at four weeks treatment ($P = 0.0354$).

In all experimentations realised, a third group of mice was constituted by injecting LNCaP cells in 3-4 castrated nude mice to control the hormone sensitivity of the injected LNCaP. The

quasi-null tumour growth of the castrated mice shows the hormone sensitivity of LNCaP cells at the moment of injection.

At the end of the experimentations, the tumours were divided in two: one part was fixed in Bouin's solution for morphological analysis purposes, and the second part was used to analyze the gene expression. The morphological analysis is essential since it allows the elimination of the sample tissues with no tumours (connective tissue only, for example) or with too much necrosis (figure 4 A-D). Then, through the use of immunohistochemistry with a specific antibody of the human PSA, we made sure that the sample tissue is indeed constituted of LNCaP cells (figure 4 E-F).

Furthermore, the tumour incidence differs according to the treatments. It is of 50% for the tumours of the mice treated with methylcellulose whereas it is more than 90% for those treated with bicalutamide. These results show not only that bicalutamide stimulates LNCaP tumour growth but it also contributes to tumour intake in nude mice.

The PSA serum analysis of mice developing LNCaP tumours and treated with the daily dose of 20 mg/kg has been conducted. Figure 3D shows the relation between the PSA serum rate and the tumour size. The PSA serum rate increases in proportion to the tumour size in the two groups with good correlation coefficients, respectively of 0.89 and 0.83 for the control and bicalutamide groups. The PSA index, which is the PSA serum rate referred to the unit of tumour size (mm^3), shows that the PSA secretion from the LNCaP tumours is stimulated by the bicalutamide by a factor 2 in comparison with the control group (P=0.0094) (figure 3E). These results, showing a stimulating effect of the bicalutamide on the PSA serum, correlate with those of the tumour growth.

In parallel with the experimentations conducted on the LNCaP tumours, PC3 cells have been injected in the same way to nude mice and treated with bicalutamide. The PC3 cells are hormone refractory and do not express androgen receptors. Figure 3C shows that the 20 mg/kg bicalutamide given daily has no effect on tumour growth of PC3. These results suggest that the tumour growth activation mechanisms of the LNCaP by bicalutamide imply RA signalling.

To understand the absence of LNCaP tumour growth arrest by bicalutamide, we analyzed its effect on another androgen-regulated tissue, the mice testis. We studied proliferation, apoptosis and some steroidogenic genes expression into the testes on bicalutamide treated mice. Finally the molecular profiles of the LNCaP tumours treated by bicalutamide and the tumours developed by the castrated mice were analyzed.

3- Analysis of an androgen-dependent organ of a mouse, the testis

In the literature, the effect of anti-androgens on androgen-dependent organs such as the testis is translated by an apoptosis within the days following the first treatment. Depending on the doses, the anti-androgen treatment can result in a weight reduction of the testis. The anti-androgens also modulate the expression of androgen-regulated genes (Lindsey and Wilkinson, 1996).

In our experimentations, the testes of mice were removed at the time of sacrifices, after one month treatment with bicalutamide and were weighed. The 20 mg/kg daily dose of bicalutamide does not induce weight variations of the mice testes (figure 5A).

A TUNEL analysis of the testes was conducted but it did not reveal any difference of apoptosis between the mice of the control groups and those treated with bicalutamide (data not shown). This can be explained as the results of Omezzine et al. showing a maximal wave of apoptosis within 3 days of flutamide treatment (Omezzine et al., 2003a). It is probable that in the same way at the end of one month of bicalutamide treatment, when the apoptosis wave is gone, cell death is no longer significant.

The effect of bicalutamide on the expression of one androgen-regulated gene in the mice testes has been analyzed. The *Pem* gene is expressed by Sertoli cells and steps in spermatogenesis; its promoter contains several androgens response elements (Lindsey and Wilkinson, 1996; Rao et al., 2003). Figure 5B shows that *Pem* expression has not been modified by the treatment with bicalutamide.

Under the conditions of experimentations, the 20 mg/kg daily dose of bicalutamide does not seem to have an antagonistic effect on the testis weight or on the expression of a regulated gene by the androgens, *pem*.

Then, some cyclins expressions were analysed. The cyclin A2 which is a proliferation marker of the spermatocyt and spermatid was significantly increased (about 50%, $P = 0.0026$) in bicalutamide treated mice, but the cyclins E and D1 were not (figure 5 C-E).

Has the bicalutamide modified the testosterone rate of the mice by acting on pituitary axis, which may be related to the apoptosis absence in the testis (Cockshott, 2004)?

4- The hormone status of the mice treated with bicalutamide

a. Testosterone assay

The testosterone assay has been performed on 100 µL mouse serum samples extracted by ether in the Lyon-Sud hospital in the Hormonology Department of Dr Mathian. A RIA test has then been carried out. The testosterone rates are heterogeneous within the groups, which do not allow any interpretation. This heterogeneity may probably be due to the fact that the blood samples have been taken the whole day long instead of precise hour. Stress might be an important second factor of testosterone rate variability.

b. Analysis of the steroidogenesis enzymes in the testis

If the testosterone rate of the serum is not known, it is possible to have an idea of its synthesis by the testis through the analysis of the expressions of the steroidogenesis enzymes by Leydig cells which roles are recapitulated in table 2. Figure 6A-F shows that the enzymes expressions of Star, Cyp17, p450scc, 17βHSD and SF1 do not vary whereas the expression of the 3βHSD increases significantly (about 75%, $P = 0.0007$). Another steroidogenic enzyme, the cytochrome P450 aromatase that transforms testosterone into estradiol was studied. The analysis of its expression in the mice testes shows a slight significant increase of the transcript (about 30%, $P = 0.0433$) (figure 6G) but not of the protein (data not shown). The estradiol synthesis in the testis is therefore not modified by the bicalutamide treatment.
Moreover, expressions of LH and FSH receptors which are implied in steroidogenesis and spermatogenesis are not modified by bicalutamide treatment (figure 6H-I).
Thus, the increase of the 3βHSD expression may be related to an increase of the testosterone synthesis by the testis.

5- Molecular analysis of LNCaP tumours

a. RA mutation hypothesis

One of the causes of hormonal escape – already observed in clinics and in the scientific literature (*in vivo* and *in vitro*) – following a treatment involving bicalutamide, is the appearance of androgen receptor mutation. These mutations are predominantly localized at the ligand-binding site. The sequencing of the RA ligand-binding domain has been performed in order to determine whether a new RA mutation in the tumours treated with bicalutamide

Table 2: Enzymes of steroidogenesis.

Name	Common name	Role
Steroidogenic factor-1	SF1	Maintenance of the steroidogenesis
steroidogenesis activator protein	StAR	Transport protein that regulates cholesterol transfer within mitochondria
Cytochrome P450 Side-chain cleavage; desmolase	$P450_{SCC}$ / CYP11A1	Catalyses the conversion of cholesterol to pregnenolone
Cytochrome P450 17α-hydroxylase/17,20 lyase	$P450_{C17}$ / CYP17	Catalyses the conversion of pregnenolone and progesterone to their 17-hydroxy forms
3β-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ^5-Δ^4 isomerase	3βHSD	Catalyses the conversion of pregnenolone to progesterone and dihydroepiandrosterone to androstenedione
17β-hydroxysteroid dehydrogenase	17βHSD	Catalyses the conversion of androstenedione to testosterone
Cytochrome P450 aromatase	$P450_{arom}$ / CYP19	Catalyzes the aromatization of testosterone and androstenedione to estradiol

would be responsible for stimulating tumour growth. The well-known LNCaP and T877A cell mutation has been recognized as expected but no other RA mutation at the level of the ligand-binding domain has been identified in the tumours treated with bicalutamide (figure 7).

b. Molecular analysis of tumours

Several genes in LNCaP tumours treated by the bicalutamide have been analyzed in order to better understand their proliferation stimulation. *In vivo*, the RA expression is increased as regards transcript and protein in the tumours treated with bicalutamide by factors 2 (P = 0.0001) and 2.5 respectively (P = 0.0012) (figure 8A). Such increase of RA expression in tumours is functional because the expressions of the two genes with androgen response elements, the PSA and NEP (neutral endopeptidase) are increased in tumours treated with bicalutamide by 50% (P = 0.0003) and 100% respectively (P = 0.0007) (figures 8B and 8C).

In the bibliography, it has been shown that the aromatase that is not expressed in normal prostate cells is expressed in cancerous prostate cells. Is there an aromatase expression in LNCaP tumours? Is this expression modified by the bicalutamide treatment?
Figure 9A shows that the aromatase expression protein is significantly increased in the tumours treated with bicalutamide by 100% with P = 0.0027. This suggests an increase of estradiol local synthesis by the tumours, which can contribute to the progression of the tumours (Ellem et al., 2004).

If the estradiol synthesis is increased by bicalutamide, what about the oestrogen receptor expression, ERα and ERβ, and two oestrogen-regulated genes in the tumours?
Since the ERα expression is very low, it is not possible to quantify the transcript. Figure 9B does not show any modification of its protein expression by bicalutamide. The ERβ expression is significantly increased in ARNm and protein in the tumours treated with bicalutamide by factors 5 (P = 0.0038) and 2.5 respectively (P = 0.0269) (figure 9C). The expressions of the two genes described as oestrogen-regulated, pS2 and Ap2γ, are not modified (Colombel et al., 1999; Lau et al., 2000; Orso et al., 2004; Parker et al., 2007).

In this tumour context, we have analyzed the expressions of DR5 (TRAIL pro-apoptotic receptor), DcR2 (TRAIL anti-apoptotic receptor) and FLIP-Long and –short (anti-apoptotic

proteins of the death receptors pathway). The expressions of these proteins are not modified in the tumours treated with bicalutamide (figure 10).

6- Molecular analysis of LNCaP tumours of castrated mice

LNCaP tumours developing in castrated mice (about 50%) have been collected in all experimentations. Note that their volume only represents 1/5 of the control tumours (see in figure 3A-B). As with the other tumours, a morphological study was performed prior to molecular analyses. In each experimentation, the gene expression in the tumours of castrated mice was compared to the methylcellulose controls. Statistical analysis of these tumours of castrated mice has been carried out on the number involved in the three experimentations that is a total of nine tumours.

Figures 11A & 11B show that the androgen receptor expression is greatly increased by factor 6 ($P < 0.0001$) for ARNm and factor 2.5 ($P = 0.0002$) for protein level in the tumours of castrated mice whereas the PSA index is significantly reduced (about 60%, $P = 0.0002$). These results are in agreement with those of the literature in which the RA surexpression is a frequent mean of resistance to the androgen deprivation.

The aromatase expression is increased in the tumours of castrated mice by a factor 3 ($P < 0.0001$), which suggests that the low quantity of testosterone still synthesized by the surrenal glands is transformed into estradiol (figure 11C).

The DR5 pro-apoptotic receptor expression is reduces about 60% ($P = 0.0196$) whereas the anti- apoptotic proteins expressions of DcR2, FLIP (Long and short) are significantly increased about 100% ($P < 0.0001$) and 50% respectively ($P = 0.0067$) (figure 11D-G). The tumours of the castrated mice show a decrease in the expression of a pro-apoptotic protein and an increase in the expression of anti- apoptotic proteins that characterizes the escape process.

Figure 1
Effect of bicalutamide *in vitro* on LNCaP cells proliferation and apoptosis

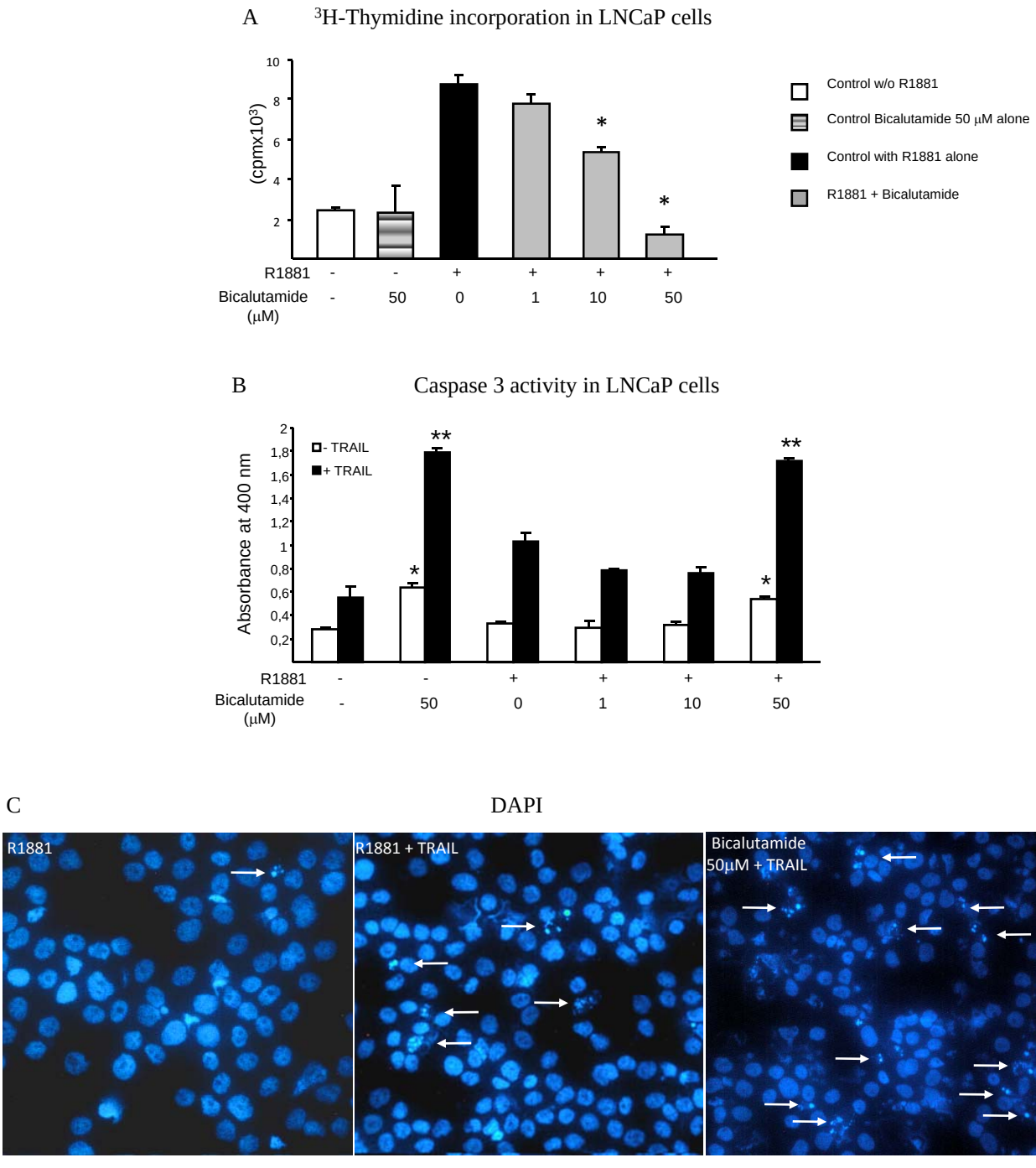


Figure 1: Effect of bicalutamide *in vitro* on LNCaP cells proliferation and apoptosis
A-Cells were first treated 48h with R1881 0.1 nM, then bicalutamide was added 72h at many concentrations. Proliferation was measured 72h later by [^{3}H] thymidine incorporation with *P < 0.0001 as compared to R1881 alone. Histograms represent the means ± SD determined from four replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. B- To control apoptosis by caspase-3 activity, cells were first treated 48h with R1881 0.1 nM, then bicalutamide was added 24h at many concentrations. TRAIL was added or not three hours before harvesting cells by enzymatic activity assay.
*P < 0.0001 as compared to R1881 alone and **P < 0.0001 as compared to R1881+TRAIL. Histograms represent the means ± SD determined from three replicate cultures of a representative experiment from three independent experiments. C-Cells were treated as described in figure B and fragmented nuclei was observed with DAPI staining and fluorescence microscopy.

Figure 2

Effect of bicalutamide on PSA, androgen receptor and TRAIL receptors expression on LNCaP cells

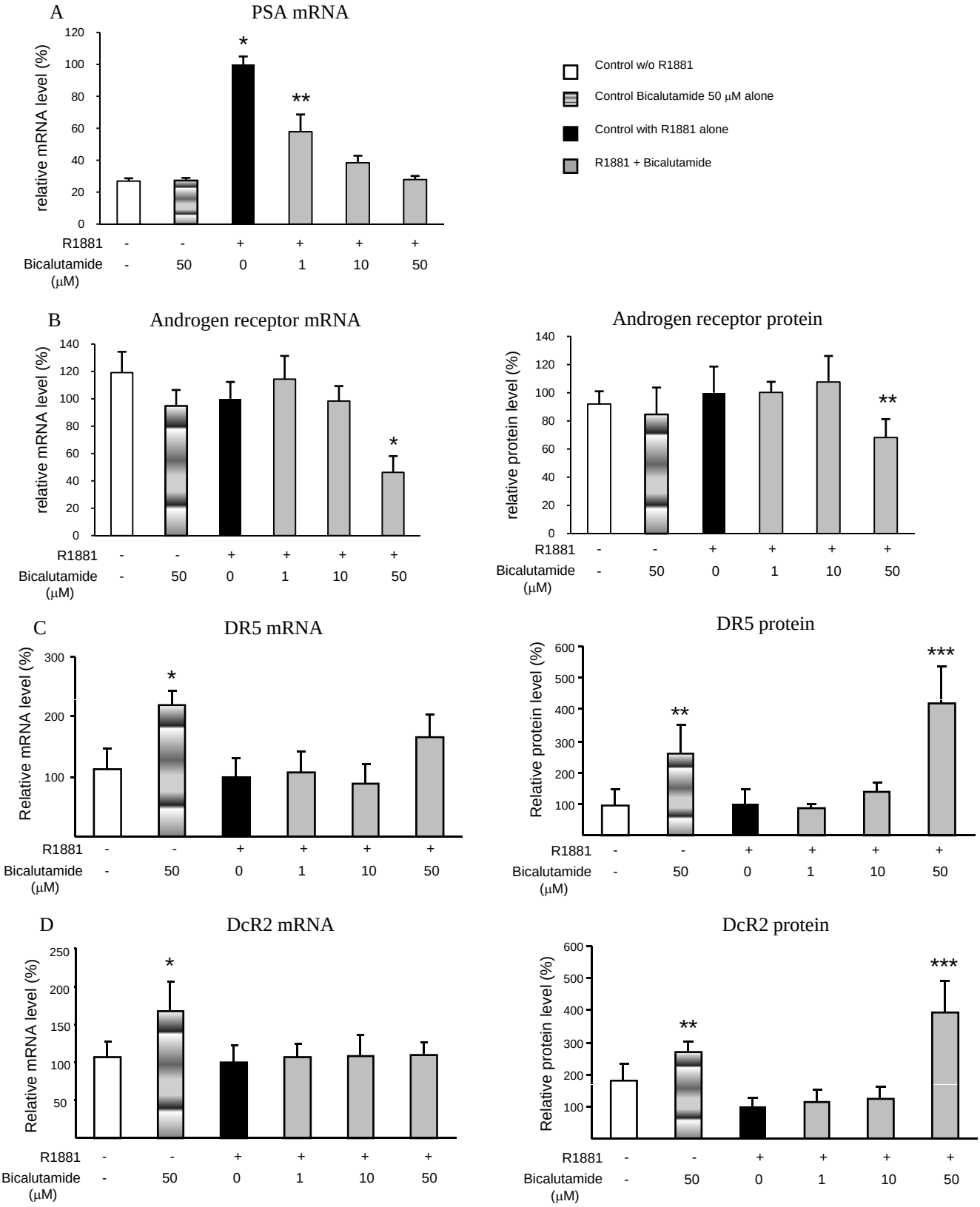


Figure 2: Effect of bicalutamide on PSA, androgen receptor and TRAIL receptors expression on LNCaP cells. LNCaP cells were cultured in the same conditions as in figure 1A and several genes and proteins expressions were analysed: A- PSA mRNA expression with * $P < 0.0001$ and ** $P < 0.0001$ compared to others conditions; B- AR mRNA and protein expression with * $P < 0.0001$ as compared to others conditions, ** $P < 0.0033$ as compared to R1881 alone and R1881+B10μM; C- DR5 mRNA and protein expression with *$P < 0.0001$ as compared to others conditions except R1881+B50μM, **$P < 0.0033$ as compared to others conditions except R1881+B10μM and *** $P < 0.0033$ as compared to others conditions. D: DcR2 mRNA and protein expression with * $P < 0.0033$ as compared to others conditions, ** $P < 0.0033$ as compared to R1881 alone and R1881+B1μM and ***$P < 0.0001$ as compared to others conditions except Bicalutamide 50μM. Histograms represent the means ± SD determined from five replicate cultures of a representative experiment from two independent experiments.

Figure 3
Effect of bicalutamide *in vivo* on LNCaP and PC3 tumour proliferation in nude mice

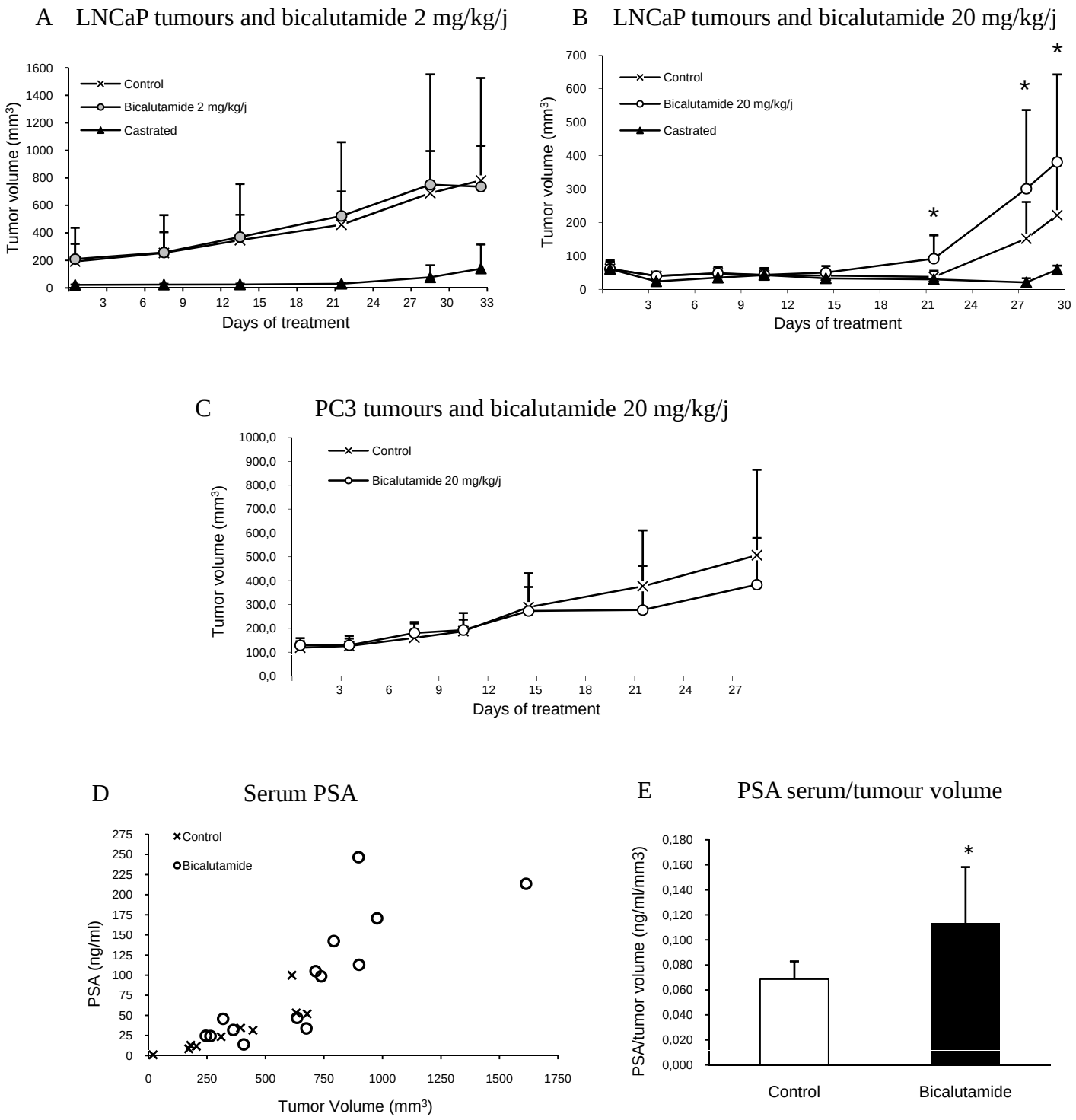


Figure 3: Effect of bicalutamide *in vivo* on LNCaP and PC3 tumour proliferation in nude mice
LNCaP cells were subcutaneously injected to nude mice. One week after, animals received a daily oral dose of 2 (A) or 20 (B) mg.kg^{-1} of bicalutamide (day 0), or vehicle (control and castrated mice) during one month. Tumour volume were measured every 3-4 days with a digital caliper; (A), *P < 0.0033 comparing bicalutamide 20 mg.kg^{-1} to control treated tumors. As LNCaP tumours experimentations, PC3 cells were subcutaneously injected to nude mice. Animals received a daily oral dose of 20 mg.kg^{-1} of bicalutamide, or vehicle during one month (C). At the end of the LNCaP tumours experiments, blood samples were collected and serum PSA level of mice treated with bicalutamide 20 mg/kg/j or vehicle were analysed. The relationship between serum PSA and tumour volume was represented (D). The PSA index (PSA serum/tumour volume) which corresponds to secreted PSA by tumour in mice blood was calculated (E) for each condition with *P=0.0094 as compared to control.

Figure 4
Morphology and PSA immunologic staining in LNCaP tumours

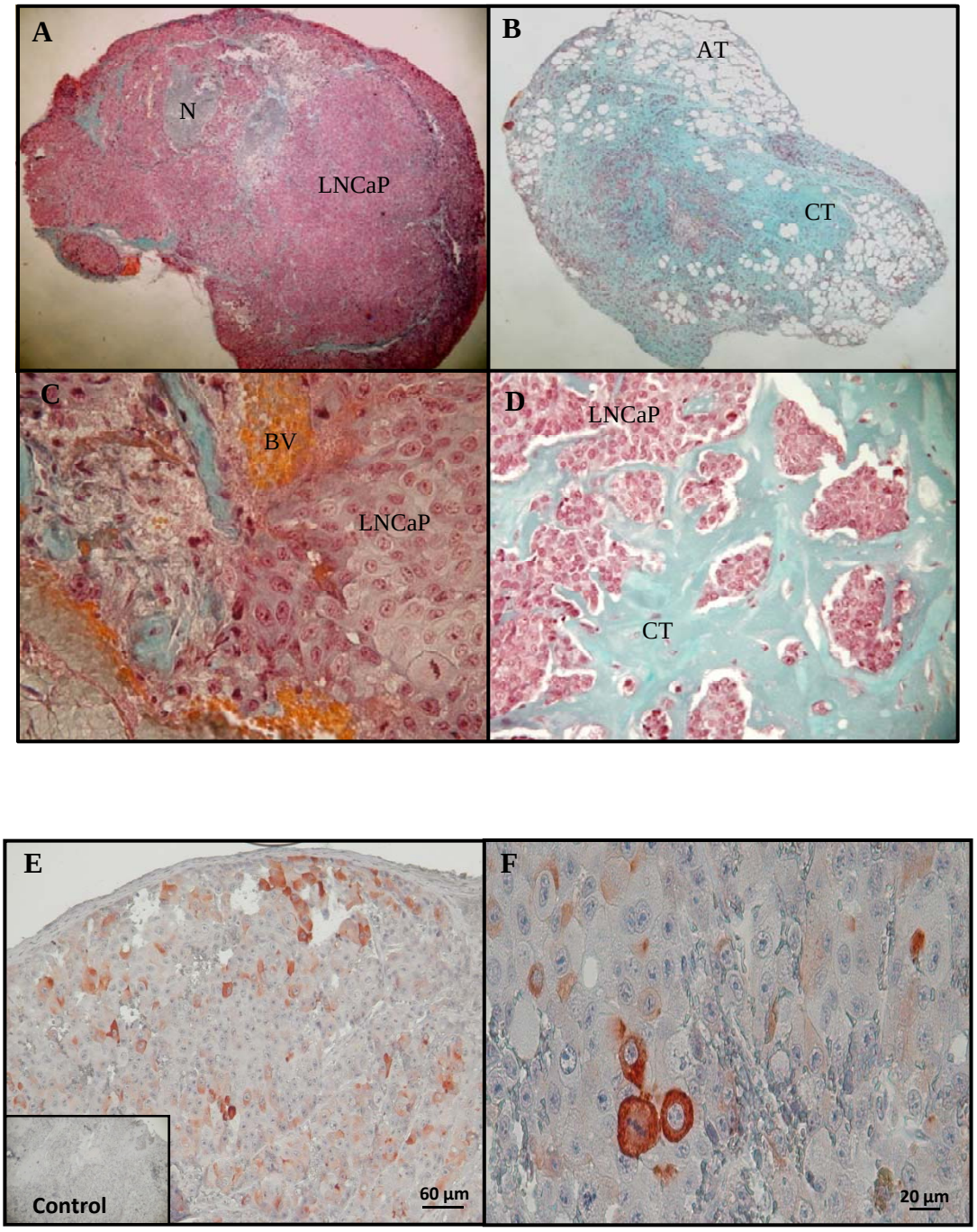


Figure 4: Morphology and PSA immunologic staining in LNCaP tumours
A-D: Morphology of LNCaP tumours was done by Papanicolaou coloration in order to select homogeneous tumours. In A, an homogenous tumour which contains principally cancerous cells with a little necrosis (N) whereas in B, an heterogeneous tumour which contains a lot of connective and adipose tissues (CT & AT). In C & D, a bigger enlarging of these respective tumours. BV: blood vessel.
E & F: Immunohistochemistry of human PSA of LNCaP tumours.

Figure 5
Effect of bicalutamide treatment on mice testis: weight & proliferation of gene expression

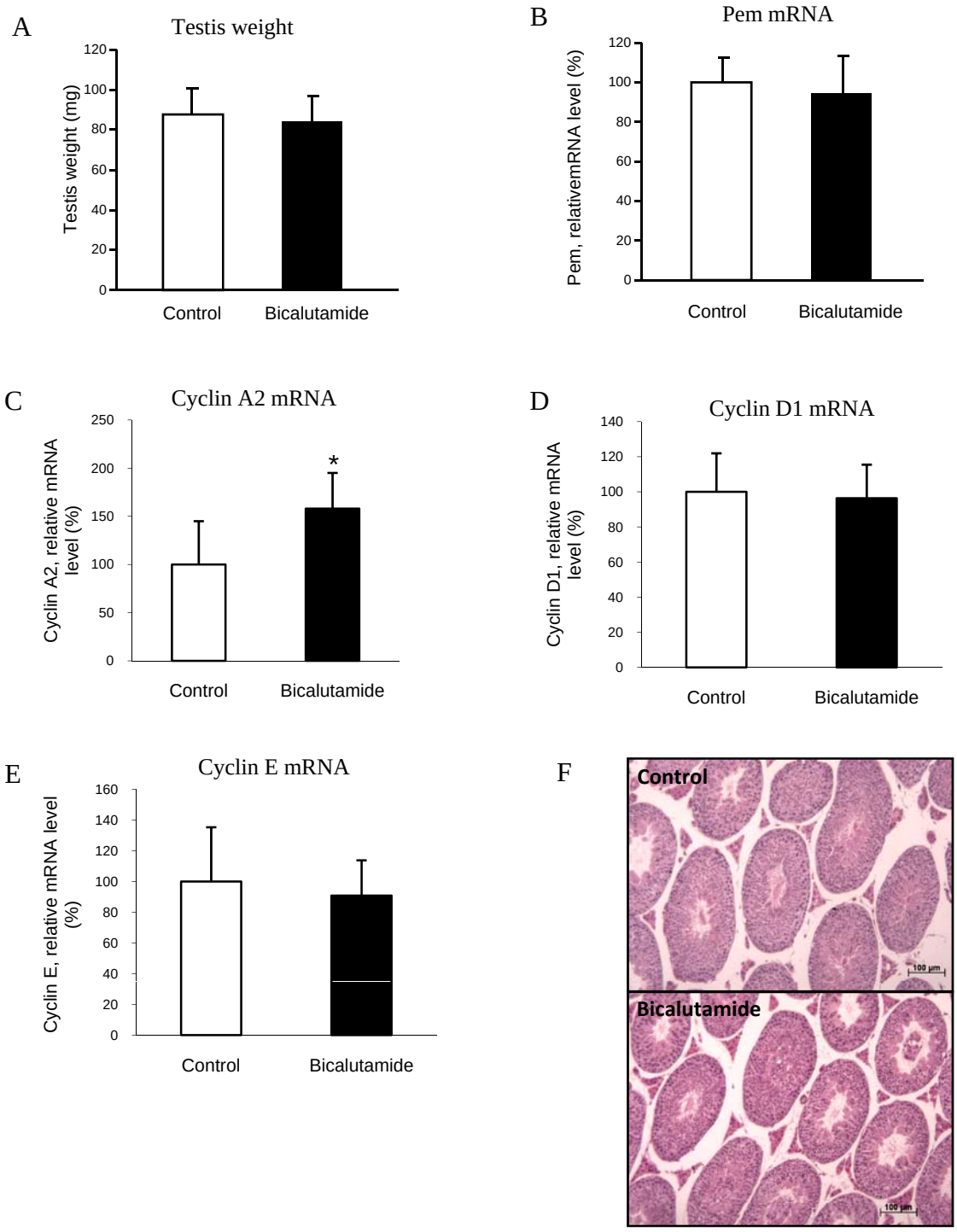


Figure 5: Effect of bicalutamide treatment on mice testis: weight & proliferation
For tumours growth experiments, mice were treated one month with either by bicalutamide 20 mg/kg/j, or by vehicle. Testes were collected at the end of the experiments and weighted (A). Pem, an androgen regulated gene (B) and proliferation markers like cyclins A2, D1 and E (C-E) were analysed by quantitative PCR in these testes. Histograms represent the means ± SD determined from seven testes per group of two representative experiment. C: **P* = 0.0026 as compared to control. Testis morphology was observed to analyse an hypothetical effect of bicalutamide on Leydig hyperplasia (F).

Figure 6
Effect of bicalutamide treatment on steroidogenic enzyme expression in mice testis

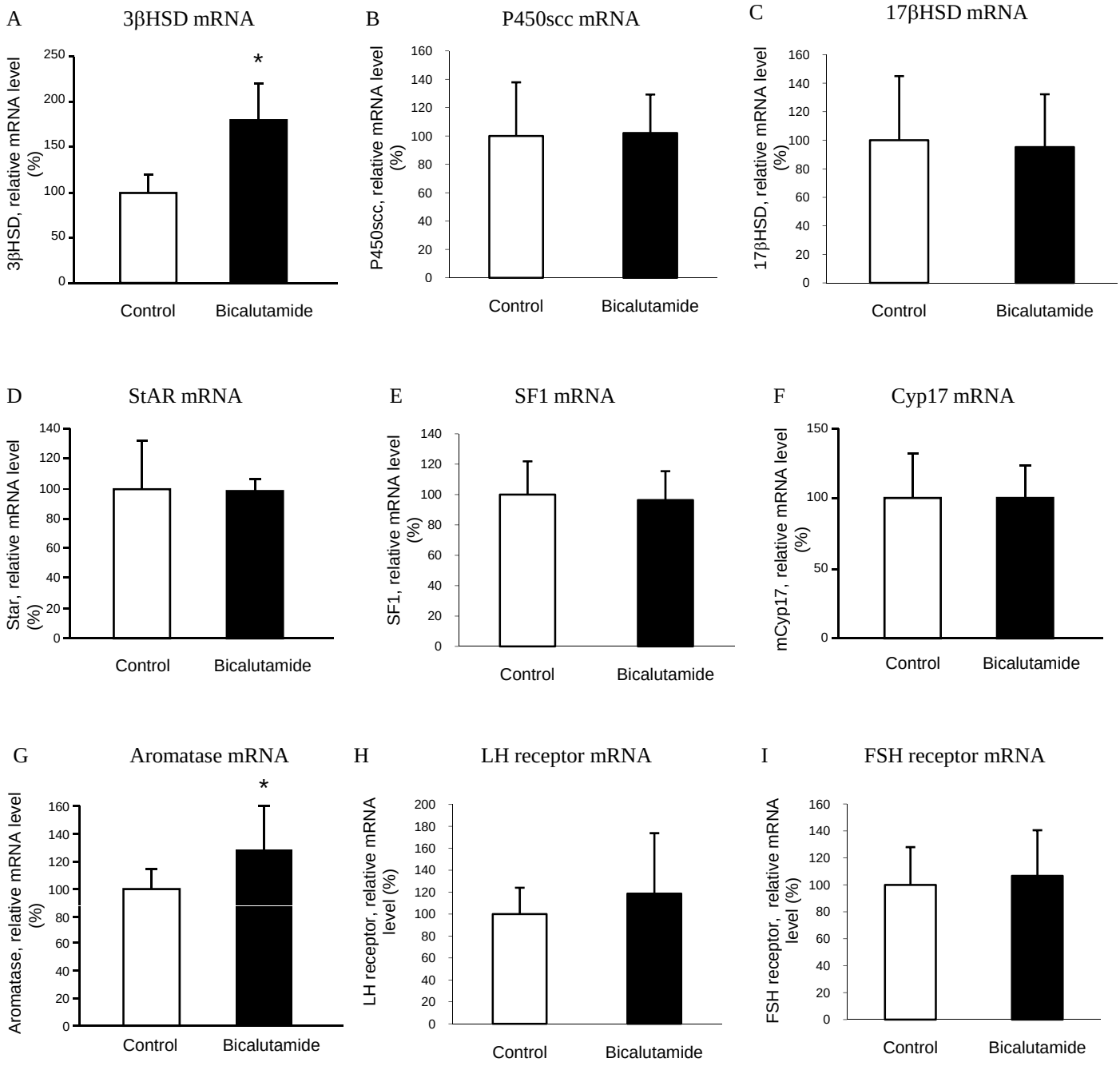


Figure 6: Effect of bicalutamide treatment on steroidogenic enzyme expression in mice testis
Steroidogenic enzymes expressions (A-G) involved in testosterone biosynthesis, LH and FSH receptors (H-I) were analysed by quantitative PCR in testes from mice treated one month by bicalutamide 20 mg/kg/j and vehicle. A: **P* = 0.0007 and G: **P* = 0.0433 as compared to control. Histograms represent the means ± SD determined from seven testes per group of two representative experiments.

Figure 7
Effect of bicalutamide treatment on a hypothetical mutation in the ligand domain binding of androgen receptor on the LNCaP tumours

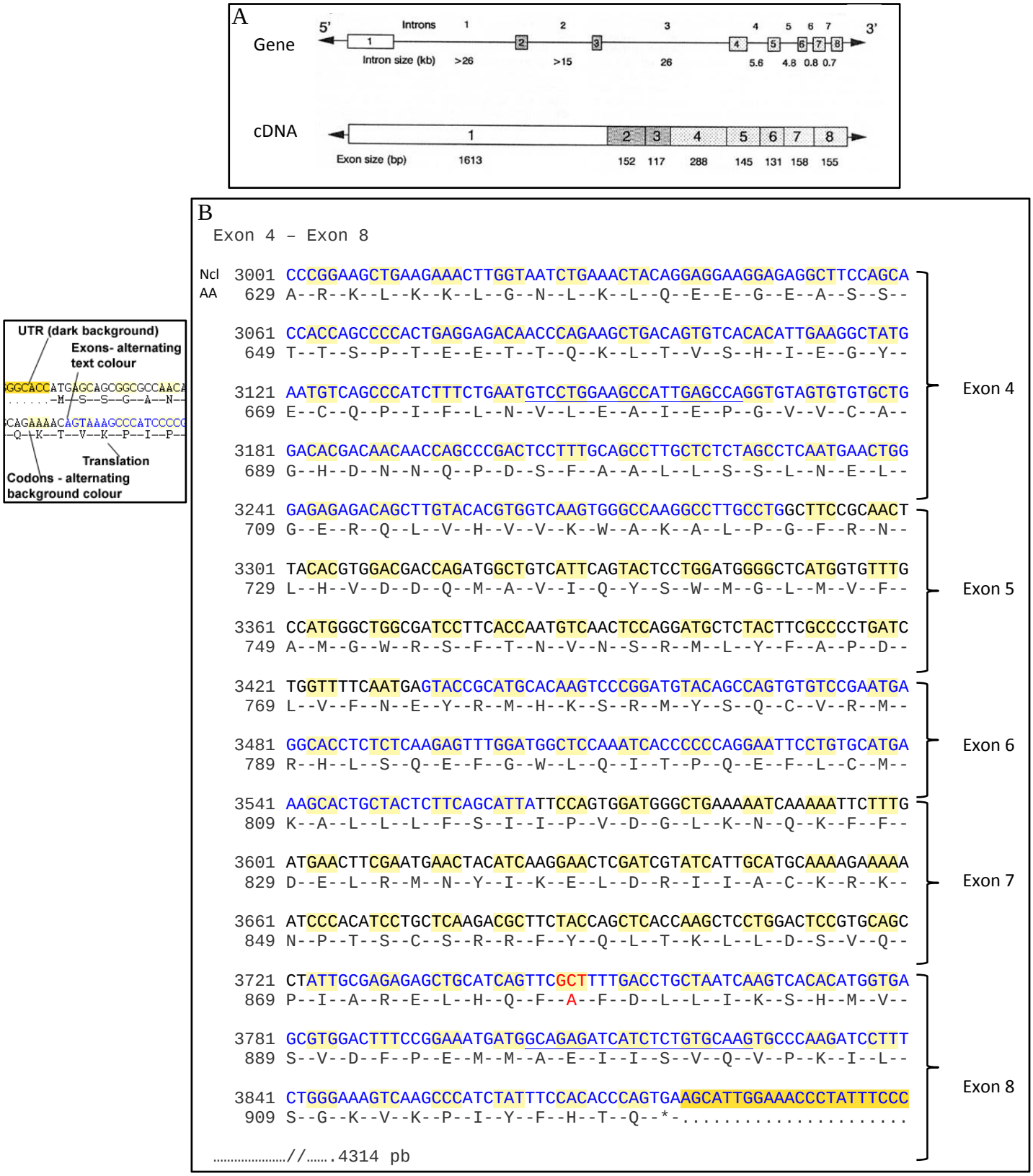


Figure 7: Effect of bicalutamide treatment on a hypothetical mutation in the ligand domain binding of androgen receptor on the LNCaP tumours

A: Scheme of androgen receptor gene and cDNA (d'après Quigley *et al.* 1995). B: Representation of exons 4-8 of the androgen receptor which correspond to the hinge region (part of the exon 4) and binding steroid domain (exon 4 to exon 8). Sequences primers hybridization are underlined. The sequencing have been done after reverse transcription PCR. Codon in red (GCT) which corresponds to amino acid Alanine is the well known mutation of the LNCaP androgen receptor in position 877. The wild androgen receptor contains the codon ACT which encode for the amino acid Threonin. Ncl: nucleotide; AA: amino acid.

Figure 8
Effect of bicalutamide treatment on androgen receptor and androgen regulated genes expression *in vivo* on the LNCaP tumours

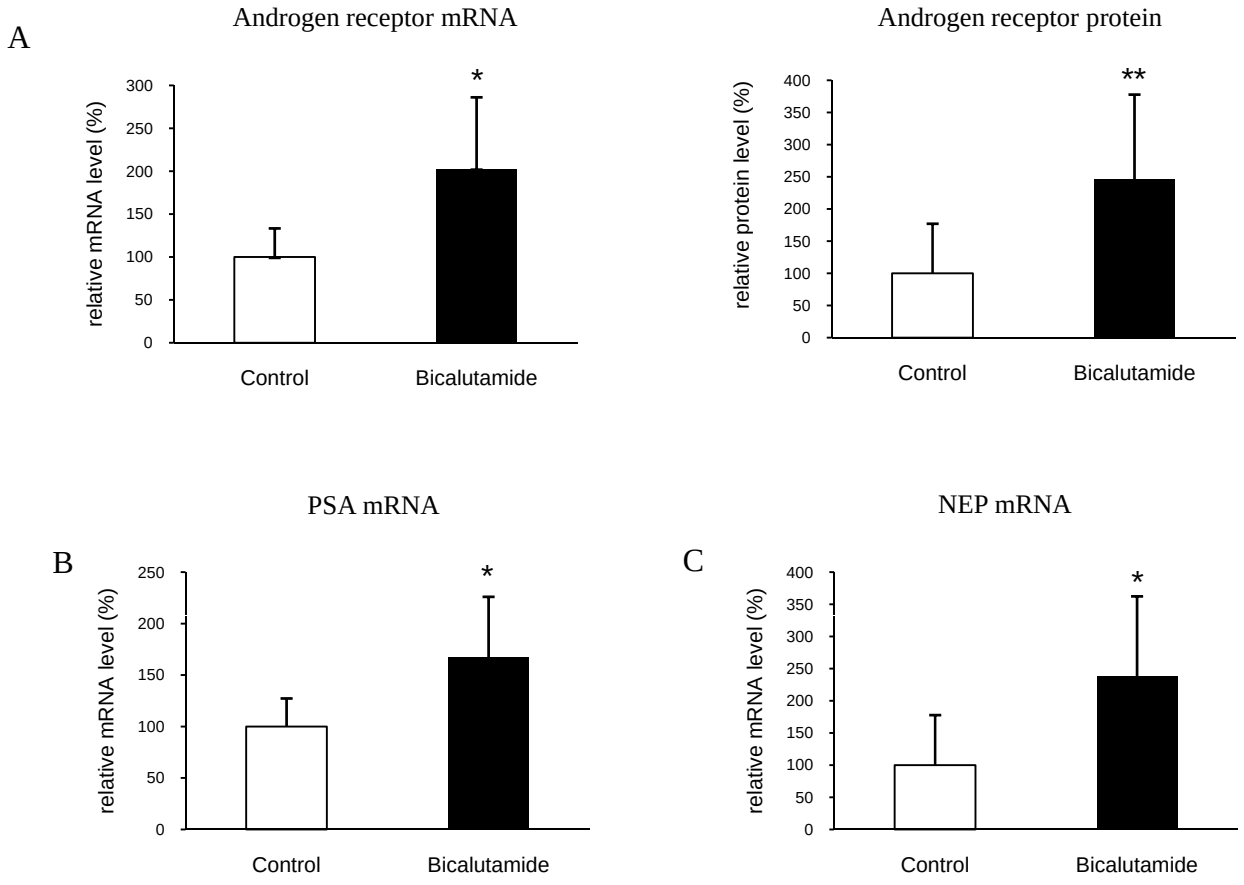


Figure 8: Effect of bicalutamide treatment on androgen receptor and androgen regulated genes expression *in vivo* on the LNCaP tumours

Androgen receptor mRNA and protein (A), PSA mRNA (B) and NEP mRNA (C) expressions were determined by quantitative PCR and western blotting in LNCaP tumours exposed or not to bicalutamide 20 mg/kg/j (A) with **P* = 0.0001 and ** *P* = 0.0012 as compared to control; (B) with * *P* = 0.0003 as compared to control; (C) with * *P* = 0.0007 as compared to control. Histograms represent the means ± SD determined from fifteen to twenty-three tumours per group of a representative experiment from two independent experiments.

Figure 9
Effect of bicalutamide treatment on aromatase, estrogen receptors and estrogen regulated genes expression on the LNCaP tumors

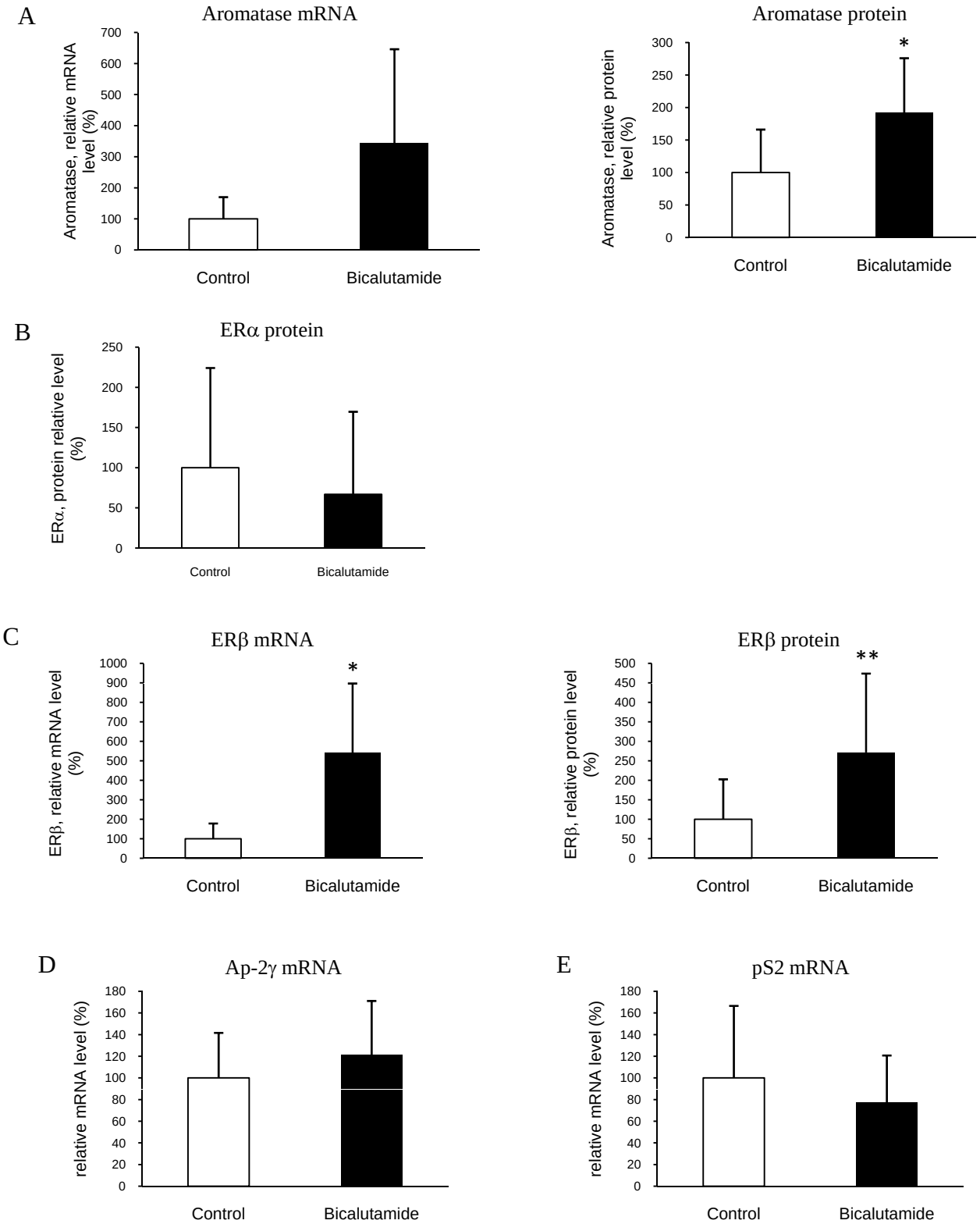


Figure 9: Effect of bicalutamide treatment on aromatase, estrogen receptors and estrogen regulated genes expression on the LNCaP tumors

mRNA and proteins expressions were determined by quantitative PCR and western blotting respectively in LNCaP tumors exposed or not to bicalutamide 20 mg/kg/j. A: Aromatase mRNA and protein levels with *P = 0.0027 as compared to control; B: ERα protein level and C: ERβ mRNA and protein levels with *P = 0.0038 and ** P = 0.0269 as compared to control; D-E: mRNA expression of two estrogen regulated genes, AP-2γ and pS2. Histograms represent the means ± SD determined from fifteen to twenty-three tumors per group of a representative experiment from two independent experiments.

Figure 10
Effect of bicalutamide treatment on some TRAIL-pathway genes expression on the LNCaP tumours

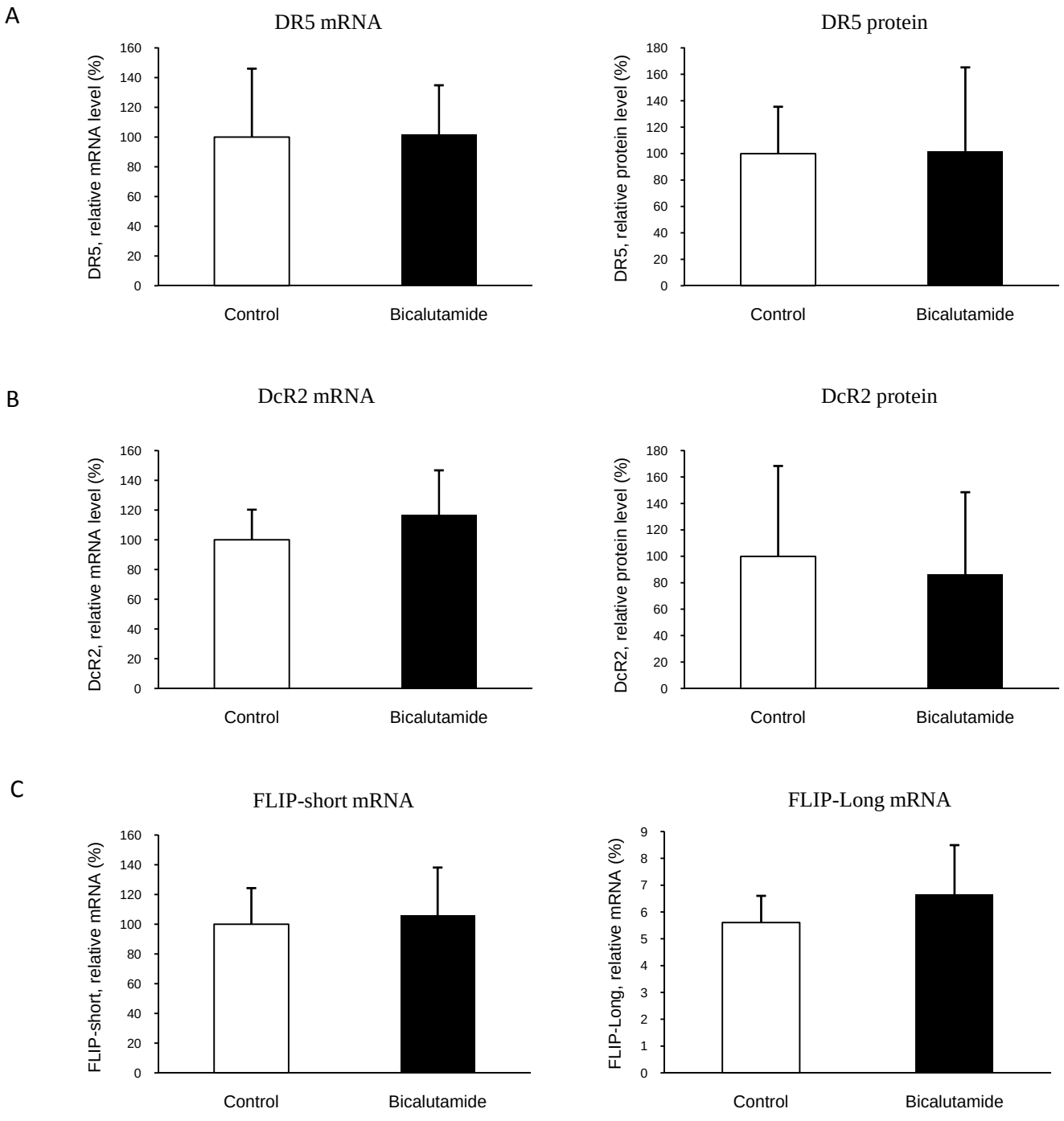


Figure 10: Effect of bicalutamide treatment on some TRAIL-pathway genes expression on the LNCaP tumours

DR5 (A) and DcR2 (B) mRNA and protein levels were determined by quantitative PCR and western blotting respectively in LNCaP tumors exposed or not to bicalutamide 20 mg/kg/j. FLIP-Long and FLIP-short (C) mRNA were determined by quantitative PCR in LNCaP tumors exposed or not to bicalutamide 20 mg/kg/j. Histograms represent the means ± SD determined from fifteen to twenty-three tumors per group of a representative experiment from two independent experiments.

Figure 11
Expression analysis of LNCaP tumors developped in castrated mice compared to control mice

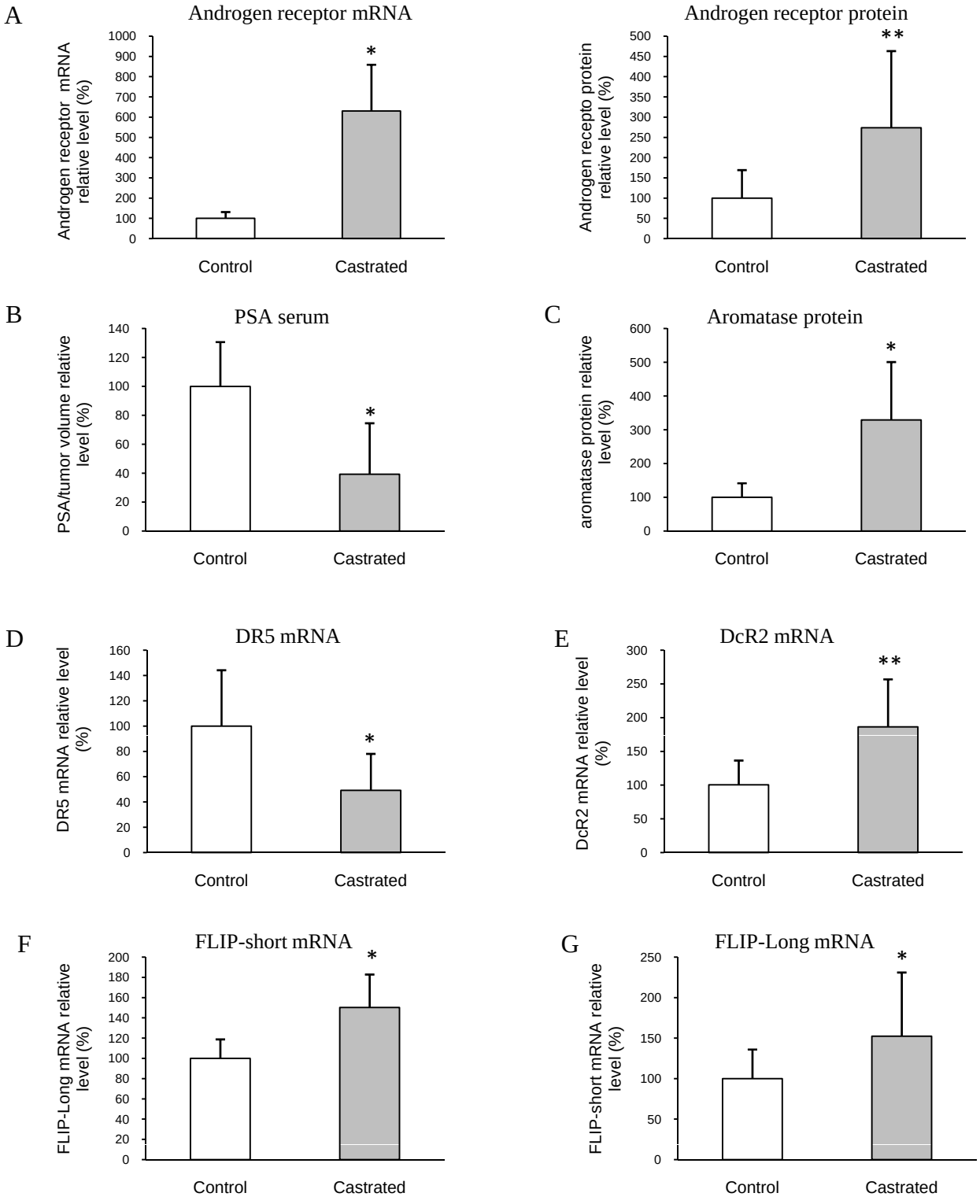


Figure 11: Expression analysis of LNCaP tumors developped in castrated mice compared to control m Androgen receptor mRNA and protein levels (A) were determined by quantitative PCR and western blotting respectively in LNCaP tumours from control and castrated mice with $*P < 0.0001$ and $**P = 0.0002$ as compared to control. Serum PSA level was measured and the PSA index was calculated (B) in control and castrated mice with $*P = 0.0002$ as compared to control. Aromatase protein levels (C) was determined by western blotting in LNCaP tumours from control and castrated mice with $*P < 0.0001$ as compared to control. DR5 (D), DcR2 (E), FLIP-Long and FLIP-short (F-G) mRNA levels were determined by quantitative PCR in LNCaP tumours from control and castrated mice with D: $*P = 0.0196$, E: $**P < 0.0001$ and F & G: $*P = 0.0067$ as compared to control. Histograms represent the means ± SD determined from three to four tumours per group from three independent experiments.

DISCUSSION

1-Bicalutamide *in vitro* action

Proliferation

As in a normal prostate, the growth of the prostate cancer depends on androgens at the beginning (Marker et al., 2003). The bicalutamide action on the normal or cancerous prostate cells is translated first into the inhibition of their proliferation (Bai et al., 2005). Even though the LNCaP cells have a mutated RA (T877A), bicalutamide inhibits their growth (Berrevoets et al., 1993; Veldscholte et al., 1992a). In our experimentations, we have validated the anti-androgen action of bicalutamide on LNCaP cells *in vitro* by showing its antiproliferative effect from 10 to 50 μM. The whole data confirm that the LNCaP cells we used are really hormonosensitive.

This growth inhibition is correlated with an inhibition of the expression and therefore of the RA transcription activity on some hormone sensitive gene expression including the PSA. In the literature, the studies on the regulation of RA expression are conflicting because of the experimentation conditions probably (presence or absence of androgens) and the analysis techniques used (Kaarbo et al., 2007). A number of work agree with our results and have shown an inhibition of the RA expression through a treatment with bicalutamide (Bouchal et al., 2005; Bouchal et al., 2002; Festuccia et al., 2005).

Apoptosis

The bicalutamide that suppresses the action of androgens on prostate cells (normal or cancerous) also induces the apoptosis of these hormonosensitive cells. We have shown in our experimentations that the 50 μM bicalutamide (with or without R1881) induces a significant increase of the activated caspase-3. On the other hand, with a lower dose, the bicalutamide (10 μM) is not sufficient to induce the apoptosis of LNCaP cells. In the literature, Bouchal *et al*, who have carried out LNCaP cultures in a medium without androgens, have obtained a IC_{50} (50% growth inhibition) with 40 μM bicalutamide at 3 days of treatment, whereas Zhan *et al* who have used a supplemented medium with 1nM of testosterone, show an inhibition of 25% only under the same conditions (Bouchal et al., 2005; Zhan et al., 2002). Therefore, presence of androgens in the medium protects the cells against the action of bicalutamide. The induced apoptosis by bicalutamide is translated into ADN fragmentation in the LNCaP cells, activation of caspases 8 and 3 and reduction of the mitochondrial membrane potential (Lee et al., 2003; Zhan et al., 2002). However, the overexpression of Bcl-2 in the LNCaP cells does

not attenuate the induced apoptosis from the bicalutamide (Lee et al., 2003). So the mitochondrial pathway does not seem to be essential to the apoptosis induced by the bicalutamide in the LNCaP cells, that can then be classified as type I cells where apoptosis mainly occurs through death receptors (Lee et al., 2003).

We have shown the interesting cumulative effect of the bicalutamide and the ligand TRAIL, on the apoptosis of the LNCaP cells *in vitro*. The ligand TRAIL induces the apoptosis of cancerous cells but not healthy ones (Ashkenazi et al., 1999; Takeda et al., 2002; Takeda et al., 2001; Walczak et al., 1999). The use of ligand TRAIL on normal human prostatic epithelial cells has shown that they are resistant to apoptosis induced by the ligand (Ashkenazi and Dixit, 1999; Hesry et al., 2006; Shankar et al., 2005; Tong and Li, 2004). Moreover, it does not have any toxic effect as the other death ligands, the Fas-ligand and the TNF-α. The use of ligand TRAIL is promising for anti-cancer therapy and is undergoing phases I and II clinical studies of (Malhi and Gores, 2006; Tolcher et al., 2007). However, there are biological and clinical problems linked to the resistance mechanisms of the TRAIL depending on the types of cancers and lines. If the cell lines are largely sensitive to apoptosis induced by TRAIL, several primary cancerous cells are resistant to TRAIL (Dyer et al., 2007). Furthermore, it has been noticed that some cellular lines that are initially sensitive to apoptosis induced by TRAIL *in vitro* become resistant *in vivo*, thus questioning the role of stromal cells or immunological cells that infiltrate tumours (Muerkoster et al., 2004; Trauzold et al., 2006). Finally, the TRAIL has shown an inverse effect, stimulating tumour and metastatic growth through NF-κB signalling under certain conditions (Malhi and Gores, 2006; Trauzold et al., 2006). Because of several potential resistance to apoptosis induced by TRAIL (decoy receptor, FLIP, IAP, NF-κB), several scientists agree on the importance of combining treatment. As regards prostate cancer, the combination of treatments with TRAIL has been frequently used in order to sensitize and maximize apoptosis *in vitro* and *in vivo*. The chimiotherapeutic molecules such as doxorubicine with subtoxic concentration, irradiation and components like selenium and curcumin have shown synergetic effects with TRAIL on apoptosis of cancerous prostate cells *in vitro* and *in vivo* (Kang et al., 2005; Shankar et al., 2008; Shankar et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005). The sensitization mechanisms identified by these treatments are the overexpression of DR4 and DR5 death receptors as well as proteins of the mitochondrial pathway (Bax, Bak), and the inhibition of the expression of anti-apoptotic proteins like Bcl-2, FLIP et NF-κB (El-Zawahry et al., 2005). So the combination of bicalutamide hormone therapy with ligand TRAIL can be considered.

DR5 & DcR2 expressions

In order to know if bicalutamide induces LNCaP cell apoptosis partly by modifying the expression of receptors to TRAIL, we have analyzed their expression. In the literature, the expression of a certain number of genes in relation to apoptosis is modified by the bicalutamide including the expression of the DR4 receptor (Bouchal et al., 2005). Our previous studies have shown that the reduction of the expression of the DcR2 decoy receptor correlates with the apoptosis of the rat ventral prostate induced by castration. We have also shown that, in vitro, the expressions of DcR2 and DR5 are regulated by androgens in LNCaP cells. We therefore dwelled on these two receptors whose expression is hormone-regulated. In our experimental conditions, bicalutamide increases the protein expression of DR5 and DcR2, which are pro- and anti-apoptotic receptors of TRAIL, in the same way. But the affinity of the various receptors for their ligand TRAIL is not identical (Truneh et al., 2000). Truneh et al. reported the dissociation constant is respectively of 2, 70, 200 and 400 nM for DR5, DR4, DcR1 and OPG, which means that TRAIL has a better affinity for DR5 and a worse one for OPG. Unfortunately, authors failed to determine the affinity of DcR2 dissociation constant. If DcR2 has an affinity close to that of DcR1 for TRAIL, it can be hypothesized that the increase of the expression of DR5 induced by bicalutamide should be more efficient than that of DcR2 and should be in favour of apoptosis. As many molecules used to make the cancerous cells more sensitive to apoptosis induced by TRAIL, the bicalutamide seems to work in the same way by increasing the expression of the death receptor DR5.

2-Bicalutamide *in vivo* action

After validating the anti-androgen action of the bicalutamide *in vitro* and demonstrating that the LNCaP cells used are hormonosensitive, we have studied the effect of the bicalutamide on tumour growth *in vivo*.

Tumour growth

Our results *in vivo* show that not only does the bicalutamide stimulates the LNCaP tumour growth but it also helps tumour intake in those cells in nude mice. Tumour incidence in mice treated with methylcellulose is of 50% while it is higher at 90% for tumours in mice treated with bicalutamide. As far as the authors know, only one study presents an inhibiting effect of the bicalutamide on the type of hormonosensitive LNCaP tumours in nude mice at a daily dose of 50 mg/kg (Compagno et al., 2007). Sironak *et al* have shown that the inhibiting effect of the bicalutamide on the growth of CWR22LD1 tumours (androgen-sensitive) depends on

the size of the tumours at the beginning of the treatment (Sirotnak et al., 2002). In our experimentations, the treatment with bicalutamide was applied one week after their injection when the tumours were inferior to 100 mm^3. On the other hand, the bicalutamide has no effect on the tumour growth of PC3, which are cells that do not express androgen receptors. Therefore the activation mechanisms of the tumour growth of LNCaP through bicalutamide imply RA signalling.

At this stage of analyses, the first hypothesis would be that the treatment with bicalutamide has induced a hormonal escape of LNCaP tumours. But LNCaP tumour growth developed by castrated mice is quasi-null, so these tumours survive in an environment without androgens (induced by castration), which indicates then the hormone sensitivity of LNCaP at the moment of injection and during the time of experiment. Another mechanism of resistance to anti-androgen treatment of prostate cancers is the acquisition of new mutations on the RA (Taplin et al., 2003). These mutations are often localized at the level of ligand-binding domain, modifying the conformation of the RA-anti-androgen complex and helping the transduction of the RA signal. In the literature, mutations noticed after a treatment with bicalutamide have been identified in patients and *in vitro* on LNCaP cells (long term treatment) (Haapala et al., 2001; Hara et al., 2003; Yoshida et al., 2005). So we have sequenced the ligand-binding domain of the androgen receptors and we have not found any other additional mutations than the known mutation of LNCaP (T877A).

The second hypothesis is that the bicalutamide modifies the hormone balance of mice thus modifying the proliferation of hormone-dependent LNCaP tumours. Bicalutamide inhibits the action of testosterone and DHT at the level of androgen-dependent organs and of the hypothalamus-hypophysis axis (Cockshott, 2004; Iswaran et al., 1997).

Testis analysis

The analysis of mice testes in our experimentations does not show any effect of the bicalutamide on weight, apoptosis and the expression of PEM gene that contains an ARE. In rats, bicalutamide induces an atrophy of the prostate and the seminal vesicles starting with small doses (1 mg/kg per day). The weight of the testes is reduced with doses 10 times higher and the morphological analysis shows a hyperplasia of Leydig cells (Cockshott, 2004; Iswaran et al., 1997). In men, the treatment with bicalutamide at 50 mg per day seems to induce a moderate increase of the fibrous tissue between the tubules as well as a hyperplasia of Leydig cells (Bjerklund Johansen et al., 1994). The clinical studies have shown that the serous rates of LH, FSH, testosterone and estradiol increase whatever the dose of bicalutamide tested (Cockshott, 2004; Tyrrell et al., 1998). A number of work on Leydig cells

have shown an effect of the LH on the increase of the transcription of encoding genes for some steroidogenic enzymes and their activity including the 3βHSD (Youngblood and Payne, 1992). Among the encoding genes for steroidogenesis enzymes, bicalutamide induces an increase of the expression of the 3βHSD in the testicles of the mice of our experimentations. These results may suggest an increase of the steroidogenesis and therefore of the testosterone synthesis. Expression of the cyclin D2, a spermatocyte and spermatide proliferation marker, also increases. Other work also describes the modifications of gene expression of steroidogenesis enzymes after a long-term treatment (28 days) with flutamide, a nonsteroid anti-androgen like bicalutamide (Friry-Santini et al., 2007). Flutamide is capable of blocking the testosterone retrocontrol at the level of the hypothalamus and the hypophysis, inducing an increase of LH secretion from the hypophysis, and accordingly, the stimulation of the testosterone synthesis by Leydig cells (Viguier-Martinez et al., 1983). Friry-Santini et al. have shown that this increase of the LH secretion from the hypophysis and of testosterone from the Leydig cells implies an increase of the transcription of steroidogenesis genes including the StAR, Cyp11a1, Cyp17a1 et 3βHSD (Friry-Santini et al., 2007). Moreover, ventral prostates and seminal vesicles have their weight significantly reduced by the treatment with flutamide, but not the testicles that present a hyperplasia of the Leydig cells. The disruption of the mechanisms of LH secretion that is continuously stimulated, and the modulation of the steroidogenic enzyme regulation process at the level of testicle, induce an increased expression of enzymes that take part in the steroid biosynthesis pathway and therefore an increase of the plasmatic testosterone level.

In the testis, aromatase is expressed by the cells of Leydig, Sertoli and germinal cells (Lambard et al., 2005). The aromatase gene is regulated by the transcription factors including SF- 1 (steroidogenic factor-1), CREB and CREM through the intracellular increase of AMPc, induced by FSH and LH (Bourguiba et al., 2003). Testosterone stimulates the expression of aromatase and estradiol production in the germinal cells and Leydig cells (Bourguiba et al., 2003; Lambard et al., 2005). Our results show that the aromatase expression is stimulated at level of the transcribed but not the protein. Under our experiment conditions, the increase in testosterone synthesis following the treatment with bicalutamide may be not sufficient to induce a marked positive regulation of the aromatase as regards protein.

In conclusion, our results in testes analysis shown: i) no variation in testicular weight, pem expression, apoptosis and Leydig hyperplasia but ii) variation in two steroidogenic enzyme related genes (3βHSD and aromatase transcript level) on nine studied, and iii) one

proliferation related gene (cyclin E) on three studied. In our experimentations, bicalutamide effect on testis is slight compared with results of Fryri-Santini et al., and may be due to the difference in animal model (mouse/rat), anti-androgen (bicalutamide/flutamide) and certainly by doses of anti-androgen used (20 mg/kg/j of bicalutamide/6 to 150 mg/kg/j of flutamide) (Friry-Santini et al., 2007).

Genes expression in LNCaP tumours

The analysis of the gene expression in the LNCaP tumours shows an increase of the RA and the two androgen-regulated genes whose promoters contain elements of response to androgens, the PSA and the NEP. These results correlate with the stimulation of tumour growth in mice treated with bicalutamide, and they are probably due to an increase in steroidogenesis and thus in testosterone. The increases in RA and PSA expression are probably due to a much higher testosteronemy. Noteworthy, these results are in agrement with the experimentations *in vitro* where the bicalutamide – which inhibits the R1881 effect on the LNCaP cell proliferation and induces apoptosis – inhibits the RA and PSA expressions.

The expression of aromatase is increased in the LNCaP tumours of the mice treated with bicalutamide. In a normal prostate, the aromatase, that converts the testosterone and androstenedione into estradiol, is expressed in the stromal cells only. In the prostate cancer, epithelial cells express the aromatase via a promoter different from the one used by stromal cells (Ellem et al., 2004). The alteration of the aromatase expression in the prostate cancer by modification of the gene regulation mechanisms helps the progression towards androgen-independence. This increase in aromatase expression implies an increase of the oestrogen local synthesis. But a number of works has shown that estradiol can bind with RA and have an influence on its transcription pathway. Estradiol action, like DHT, stimulates LNCaP cell proliferation as well as PSA expression, and is inhibited by bicalutamide (Arnold et al., 2007; Migliaccio et al., 2000; Takahashi et al., 2007; Yeh et al., 1998). Conversely, Kalach et al have shown the inhibiting effect of estradiol on the growth of MOP cells that stem from the LNCaP line as they are produced by a long term culture in a medium without androgens and present an inversion of response to androgens (Kalach et al., 2005). This effect of estradiol on MOP cells is also inhibited by bicalutamide. In rats, combining testosterone with estradiol promotes the cancerogenesis of the prostate (Ho and Roy, 1994; Prins, 1992). In our experimentations, the stimulation of the tumour growth is probably due to a testosteronemy increase but also to an increase of the local production in estradiol generated by the aromatase.

The REα expression in LNCaP tumours is very low and does not vary according to the treatments in our experimentations. On the other hand, the REβ expression is increased in the LNCaP tumours of mice treated with bicalutamide. In a normal prostate, the REβ is generally expressed in epithelial cells whereas the two isoforms are expressed in stromal cells (Leav et al., 2001). The action of REβ has a stimulating role over the proliferation and induction of the inflammatory process on normal prostate cells (Ellem and Risbridger, 2007; Fujimoto et al., 2004). Even though this has not been demonstrated for cancerous prostate cells, it is the REα that is responsible for the prostate hyperplasia in animals following a neonatal treatment with estradiol (Ellem and Risbridger, 2007; Prins et al., 2001). The action of the REβ is associated with an inhibition of the proliferation of normal prostatic epithelial cells (McPherson et al., 2007). The expression of the REβ is reduced in developing prostate cancers, but is subsequently increased greatly in the metastasis of bones and lymph nodes of prostate cancers (Lai et al., 2004; Leav et al., 2001; Signoretti and Loda, 2001). REβ does not seem to be essential in the onset of prostate cancers but seems to facilitate cell survival on distant sites. Recently, a number of work have shown a role of the REβ in signalling RA. The REβ associates itself to RA and regulates the expression of androgen-dependent genes (Arnold et al., 2007; Migliaccio et al., 2000). The inhibition of the REβ expression inhibits the proliferation of LNCaP induced by estradiol and DHT and it also inhibits the expression of androgen-regulated genes (Arnold et al., 2007; Maggiolini et al., 2004; Takahashi et al., 2007). Even though the role associated with REβ in a normal prostate is inhibiting the proliferation of epithelial cells, in the contrary it seems that it take part in the proliferation of LNCaP cells (Arnold et al., 2007; Bales and Chodak, 1996; Maggiolini et al., 2004; Takahashi et al., 2007). In our experimental model, it is probable that the REβ, with the RA, contributes to the stimulation of the androgen-regulated genes in the same way as PSA and NEP, but it does not modulate the expression of the two oestrogen-regulated genes under study, the pS2 and AP2-γ. The AP2-γ gene that contains a response element to oestrogens over its promoter is regulated by the REα (Orso et al., 2004). The expression of pS2 which is oestrogen-regulated is not much expressed in a benign prostate but is highly expressed in a prostate cancer and constitutes a potential marker of prostate cancer (Colombel et al., 1999; Lau et al., 2000; Parker et al., 2007).

LNCaP tumours in castrated mice

The LNCaP cells injected in castrated mice have developed tumours with an incidence of 50% identical to the LNCaP tumours of the non-castrated mice control group. On the other

hand, the growth rate is very low and its volume only represents 30% of the LNCaP tumours of the control group. These LNCaP tumours injected in castrated mice survive in an environment without androgens and are probably in an escape phase. They have a RA expression that is much more important than that of the control mice tumours. The overexpression of RA is one of the causes of hormonal escape of prostate cancers (Chen et al., 2004; Gregory et al., 2001; Koivisto et al., 1997; Visakorpi et al., 1995). One of the signs of the prostate cancer recurrence is the important increase of the PSA rate while the patient is undergoing a hormone therapy. On the other hand, the serous PSA of castrated mice is much lower than that of the control mice, which means that the LNCaP tumours of the castrated mice are still hormone sensitive, as it is also indicated in the quasi-null growth rate.

These LNCaP tumours have an aromatase expression that is higher than that of the control tumours. The small quantity of testosterone and androstenedione that is still synthesized by the surrenal glands is perhaps transformed into estradiol by the tumours locally.

LNCaP tumours of castrated mice under express the DR5 death receptor and over-express the DcR2, $FLIP_L$ and $FLIP_S$ anti-apoptotic proteins. Two recent studies have shown that the DcR2 increase in prostate cancers compared to healthy tissue correlates with a high Gleason score, a PSA recurrence and a survival reduction (Koksal et al., 2008; Sanlioglu et al., 2007b). The FLIP protein that also inhibits the activation of caspase 8 at DISC level is involved in the resistance of prostate cancerous cells to apoptosis induced by TRAIL (Zhang et al., 2004). The FLIP overexpression accelerates the transformation of androgen-sensitive cells to androgen-independence (Gao et al., 2005). It has been shown that androgens stimulate FLIP expression, whose promoter contains several ARE (Cornforth et al., 2008; Nastiuk et al., 2003). Therefore the RA directly targets the FLIP gene in order to promote androgen-independent growth of prostate cancer cells. The overexpression of anti-apoptotic proteins such as DcR2 and FLIP in our experimentation model is one of the resistance mechanism used by cancerous cells to block the apoptosis induced by the death ligands including TRAIL and favour the pathways to cell survival (O'Kane et al., 2006).

Conclusion

Our models of prostate human tumours grafted on nude mice have allowed us to study different tumour behaviours in different hormonal contexts of the mice. The use of bicalutamide under our experimentation conditions has stimulated the tumour growth of LNCaP instead of inhibiting it as already described (Compagno et al., 2007). It is probable that it is not an escape of LNCaP tumours as we have demonstrated the hormone sensitivity of

our cells *in vitro* and *in vivo* through the use of castrated mice. Besides, the profiles of gene expressions are different. While the anti-apoptotic proteins are overexpressed in the tumours of castrated mice, their expressions are not modified when treated with bicalutamide. The RA does not present any mutations following a treatment with bicalutamide but its expression is increased as in tumours of castrated mice even though the AR regulation mechanisms identified in those two models are different. We think that the bicalutamide has blocked the negative retrocontrol of the testosterone at the level of the hypothalamus-hypophysis axis, with a result of an LH rate increase that has stimulated the steroidogenesis in the Leydig cells of the mice testes. The increase in the expression 3βHSD in the testicles shows an increase in testosterone synthesis by the mouse, which may be related to the stimulation of the tumour growth of hormonosensitive LNCaP and the increase in AR expression. The testosterone synthesis thus increased has offset the anti-androgen effect of bicalutamide on the testis in which no apoptosis has been detected and on the tumours. On the other hand, the increase in aromatase expression in the tumour is probably leading to an increase of local synthesis of estradiol. The combination of testosterone and estradiol increase with AR and ERβ expression increase stimulates LNCaP tumour growth and the expression of androgen-regulated genes such as PSA and NEP.

In the context of castrated mice, the LNCaP tumours survive in an environment without androgen owing to AR overexpression that lowered the cell sensitivity threshold to a very low androgen level. But these tumours have not escaped yet as growth and PSA rate are low yet. These tumours in the process of escaping use several resistance mechanisms such as AR overexpression that favours the pathways of cell survival by increasing anti-apoptotic proteins like FLIP and DcR2. It can be hypothesized that these LNCaP tumours would have finally escaped completely and grow if they had been observed longer.

All these results underscore the importance of the bicalutamide doses administered for hormone therapy for cancer prostate treatment. In fact, the bicalutamide may be administered either with a LH-RH agonist (this is the complete androgen blockage) or on its own in monotherapy. The clinical studies show that the patients suffering from an advanced prostate cancer and treated with a daily dose of 50 mg of bicalutamide in monotherapy have a reduced survival compared to chemical castration with LH-RH agonist whereas 150 mg of bicalutamide is as efficient as castration as regards patient survival. Therefore it seems that the daily dose of 20 mg/kg is not sufficient as in our experimental model of the mice carrying LNCaP tumours and treated with bicalutamide. Are these results an explanation for the

clinical observation about dose of 50 mg? The anti-androgen effect of the bicalutamide may be offset by an increase of the testosterone so that the prostatic tumours are stimulated instead of being inhibited, thus accelerating the patients' death. On the other hand, in a daily dose of 150 mg, the anti-androgen effect of the bicalutamide is not cancelled by the increase in testosterone, so the effect of the bicalutamide in large amount is as efficient as castration. These data reflected the complexity of bicalutamide action.

REFERENCES

Arnold, J. T., Liu, X., Allen, J. D., Le, H., McFann, K. K., and Blackman, M. R. (2007). Androgen receptor or estrogen receptor-beta blockade alters DHEA-, DHT-, and E(2)-induced proliferation and PSA production in human prostate cancer cells. Prostate *67*, 1152-1162.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer *2*, 420-430.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol *11*, 255-260.

Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A.*, et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest *104*, 155-162.

Bai, V. U., Cifuentes, E., Menon, M., Barrack, E. R., and Reddy, G. P. (2005). Androgen receptor regulates Cdc6 in synchronized LNCaP cells progressing from G1 to S phase. J Cell Physiol *204*, 381-387.

Bales, G. T., and Chodak, G. W. (1996). A controlled trial of bicalutamide versus castration in patients with advanced prostate cancer. Urology *47*, 38-43; discussion 48-53.

Benesch, M., Platzbecker, U., Ward, J., Deeg, H. J., and Leisenring, W. (2003). Expression of FLIP(Long) and FLIP(Short) in bone marrow mononuclear and CD34+ cells in patients with myelodysplastic syndrome: correlation with apoptosis. Leukemia *17*, 2460-2466.

Berrevoets, C. A., Veldscholte, J., and Mulder, E. (1993). Effects of antiandrogens on transformation and transcription activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. J Steroid Biochem Mol Biol *46*, 731-736.

Bjerklund Johansen, T. E., Majak, M., and Nesland, J. M. (1994). Testicular histology after treatment with the new antiandrogen Casodex for carcinoma of the prostate. A preliminary report. Scand J Urol Nephrol *28*, 67-70.

Bouchal, J., Baumforth, K. R., Svachova, M., Murray, P. G., von Angerer, E., and Kolar, Z. (2005). Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. J Pharm Pharmacol *57*, 83-92.

Bouchal, J., Kolar, Z., Mad'arova, J., Hlobilkova, A., and von Angerer, E. (2002). The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer cell line LNCaP. Biochem Pharmacol *63*, 1177-1181.

Bourguiba, S., Genissel, C., Lambard, S., Bouraima, H., and Carreau, S. (2003). Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 335-343.

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.

Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., and Chan, F. K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 18099-18104.

Cockshott, I. D. (2004). Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. Clin Pharmacokinet *43*, 855-878.

Colombel, M., Dante, R., Bouvier, R., Ribieras, S., Pangaud, C., Marechal, J. M., and Lasne, Y. (1999). Differential RNA expression of the pS2 gene in the human benign and malignant prostatic tissue. Prostate Cancer Prostatic Dis *2*, S11.

Compagno, D., Merle, C., Morin, A., Gilbert, C., Mathieu, J. R., Bozec, A., Mauduit, C., Benahmed, M., and Cabon, F. (2007). SIRNA-directed in vivo silencing of androgen receptor inhibits the growth of castration-resistant prostate carcinomas. PLoS ONE *2*, e1006.

Cornforth, A. N., Davis, J. S., Khanifar, E., Nastiuk, K. L., and Krolewski, J. J. (2008). FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. Oncogene.

Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity *7*, 813-820.

Dyer, M. J., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2007). Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. J Clin Oncol *25*, 4505-4506.

Ellem, S. J., and Risbridger, G. P. (2007). Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. Nat Rev Cancer *7*, 621-627.

Ellem, S. J., Schmitt, J. F., Pedersen, J. S., Frydenberg, M., and Risbridger, G. P. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. J Clin Endocrinol Metab *89*, 2434-2441.

El-Zawahry, A., McKillop, J., and Voelkel-Johnson, C. (2005). Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts. BMC Cancer *5*, 2.

Festuccia, C., Gravina, G. L., Angelucci, A., Millimaggi, D., Muzi, P., Vicentini, C., and Bologna, M. (2005). Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the nonsteroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells in vitro. Int J Cancer *115*, 630-640.

Friry-Santini, C., Rouquie, D., Kennel, P., Tinwell, H., Benahmed, M., and Bars, R. (2007). Correlation between protein accumulation profiles and conventional toxicological findings using a model antiandrogenic compound, flutamide. Toxicol Sci *97*, 81-93.

Fujimoto, N., Suzuki, T., Honda, H., and Kitamura, S. (2004). Estrogen enhancement of androgen-responsive gene expression in hormone-induced hyperplasia in the ventral prostate of F344 rats. Cancer Sci *95*, 711-715.

Gao, S., Lee, P., Wang, H., Gerald, W., Adler, M., Zhang, L., Wang, Y. F., and Wang, Z. (2005). The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. Mol Endocrinol *19*, 1792-1802.

Gregory, C. W., Johnson, R. T., Jr., Mohler, J. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. Cancer Res *61*, 2892-2898.

Guseva, N. V., Taghiyev, A. F., Sturm, M. T., Rokhlin, O. W., and Cohen, M. B. (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-associated nuclear factor-kappaB in prostatic carcinoma cell lines. Mol Cancer Res *2*, 574-584.

Haapala, K., Hyytinen, E. R., Roiha, M., Laurila, M., Rantala, I., Helin, H. J., and Koivisto, P. A. (2001). Androgen receptor alterations in prostate cancer relapsed during a combined androgen blockade by orchiectomy and bicalutamide. Lab Invest *81*, 1647-1651.

Hara, T., Miyazaki, J., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., and Miyamoto, M. (2003). Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. Cancer Res *63*, 149-153.

Hesry, V., Piquet-Pellorce, C., Travert, M., Donaghy, L., Jegou, B., Patard, J. J., and Guillaudeux, T. (2006). Sensitivity of prostate cells to TRAIL-induced apoptosis increases with tumor progression: DR5 and caspase 8 are key players. Prostate *66*, 987-995.

Ho, S. M., and Roy, D. (1994). Sex hormone-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats. Cancer Lett *84*, 155-162.

Huggins, C., and Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. J Urol *168*, 9-12.

Isaacs, J. T., Lundmo, P. I., Berges, R., Martikainen, P., Kyprianou, N., and English, H. F. (1992). Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. J Androl *13*, 457-464.

Iswaran, T. J., Imai, M., Betton, G. R., and Siddall, R. A. (1997). An overview of animal toxicology studies with bicalutamide (ICI 176,334). J Toxicol Sci *22*, 75-88.

Kaarbo, M., Klokk, T. I., and Saatcioglu, F. (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. Bioessays *29*, 1227-1238.

Kalach, J. J., Joly-Pharaboz, M. O., Chantepie, J., Nicolas, B., Descotes, F., Mauduit, C., Benahmed, M., and Andre, J. (2005). Divergent biological effects of estradiol and diethylstilbestrol in the prostate cancer cell line MOP. J Steroid Biochem Mol Biol *96*, 119-129.

Kang, J., Bu, J., Hao, Y., and Chen, F. (2005). Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. Prostate Cancer Prostatic Dis *8*, 274-279.

Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T., and Kallioniemi, O. P. (1997). Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Res *57*, 314-319.

Koksal, I. T., Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Griffith, T. S., and Sanlioglu, S. (2008). Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma. Urol Oncol *26*, 158-165.

Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Cusan, L., Lacourciere, Y., Monfette, G., Laberge, J. G., Emond, J. P., Fazekas, A. T., Raynaud, J. P., and Husson, J. M. (1982). New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. Clin Invest Med *5*, 267-275.

Lai, J. S., Brown, L. G., True, L. D., Hawley, S. J., Etzioni, R. B., Higano, C. S., Ho, S. M., Vessella, R. L., and Corey, E. (2004). Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. Urology *64*, 814-820.

Lambard, S., Silandre, D., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bourguiba, S., and Carreau, S. (2005). Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. J Steroid Biochem Mol Biol *95*, 63-69.

Lau, K. M., LaSpina, M., Long, J., and Ho, S. M. (2000). Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. Cancer Res *60*, 3175-3182.

Leav, I., Lau, K. M., Adams, J. Y., McNeal, J. E., Taplin, M. E., Wang, J., Singh, H., and Ho, S. M. (2001). Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. Am J Pathol *159*, 79-92.

Lee, E. C., Zhan, P., Schallhom, R., Packman, K., and Tenniswood, M. (2003). Antiandrogen-induced cell death in LNCaP human prostate cancer cells. Cell Death Differ *10*, 761-771.

Leotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F., Benahmed, M., Veyssiere, G., Morel, L., and Beaudoin, C. (2008). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene *27*, 2858-2867.

Lindsey, J. S., and Wilkinson, M. F. (1996). Pem: a testosterone- and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. Dev Biol *179*, 471-484.

Maggiolini, M., Recchia, A. G., Carpino, A., Vivacqua, A., Fasanella, G., Rago, V., Pezzi, V., Briand, P. A., Picard, D., and Ando, S. (2004). Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. J Mol Endocrinol *32*, 777-791.

Malhi, H., and Gores, G. J. (2006). TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? Oncogene *25*, 7333-7335.

Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., and Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Dev Biol *253*, 165-174.

McPherson, S. J., Ellem, S. J., Simpson, E. R., Patchev, V., Fritzemeier, K. H., and Risbridger, G. P. (2007). Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. Endocrinology *148*, 566-574.

Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Mol Cell Biol *26*, 7046-7055.

Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C., and Auricchio, F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. Embo J *19*, 5406-5417.

Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U. R., and Schafer, H. (2004). Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. Cancer Res *64*, 1331-1337.

Nastiuk, K. L., Kim, J. W., Mann, M., and Krolewski, J. J. (2003). Androgen regulation of FLICE-like inhibitory protein gene expression in the rat prostate. J Cell Physiol *196*, 386-393.

O'Kane, H. F., Watson, C. J., Johnston, S. R., Petak, I., Watson, R. W., and Williamson, K. E. (2006). Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer. J Urol *175*, 432-438.

Omezzine, A., Chater, S., Mauduit, C., Florin, A., Tabone, E., Chuzel, F., Bars, R., and Benahmed, M. (2003). Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. Endocrinology *144*, 648-661.

Orso, F., Cottone, E., Hasleton, M. D., Ibbitt, J. C., Sismondi, P., Hurst, H. C., and De Bortoli, M. (2004). Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. Biochem J *377*, 429-438.

O'Shaughnessy, P. J., Willerton, L., and Baker, P. J. (2002). Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. Biol Reprod *66*, 966-975.

Parker, T. L., Eggett, D. L., and Christensen, M. J. (2007). Estrogen receptor activation and estrogen-regulated gene expression are unaffected by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. J Nutr Biochem *18*, 746-752.

Prins, G. S. (1992). Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. Endocrinology *130*, 2401-2412.

Prins, G. S., Birch, L., Couse, J. F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., and Korach, K. S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. Cancer Res *61*, 6089-6097.

Rao, M. K., Wayne, C. M., Meistrich, M. L., and Wilkinson, M. F. (2003). Pem homeobox gene promoter sequences that direct transcription in a Sertoli cell-specific, stage-specific, and androgen-dependent manner in the testis in vivo. Mol Endocrinol *17*, 223-233.

Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., Guseva, N. V., Glover, R. A., Chumakov, P. M., Kravchenko, J. E., and Cohen, M. B. (2005). Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. Oncogene *24*, 6773-6784.

Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., Guseva, N. V., Glover, R. A., Syrbu, S. I., and Cohen, M. B. (2002). TRAIL-DISC formation is androgen-dependent in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. Cancer Biol Ther *1*, 631-637.

Sanlioglu, A. D., Koksal, I. T., Ciftcioglu, A., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2007). Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. J Urol *177*, 359-364.

Sarma, A. V., and Schottenfeld, D. (2002). Prostate cancer incidence, mortality, and survival trends in the United States: 1981-2001. Semin Urol Oncol *20*, 3-9.

Shankar, S., Chen, X., and Srivastava, R. K. (2005). Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. Prostate *62*, 165-186.

Shankar, S., Ganapathy, S., Chen, Q., and Srivastava, R. K. (2008). Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. Mol Cancer *7*, 16.

Shankar, S., Singh, T. R., and Srivastava, R. K. (2004). Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. Prostate *61*, 35-49.

Signoretti, S., and Loda, M. (2001). Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? Am J Pathol *159*, 13-16.

Sirotnak, F. M., She, Y., Lee, F., Chen, J., and Scher, H. I. (2002). Studies with CWR22 xenografts in nude mice suggest that ZD1839 may have a role in the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer. Clin Cancer Res *8*, 3870-3876.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity *12*, 599-609.

Takahashi, Y., Perkins, S. N., Hursting, S. D., and Wang, T. T. (2007). 17beta-Estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. Mol Carcinog *46*, 117-129.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. J Exp Med *195*, 161-169.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. Cell Immunol *214*, 194-200.

Taplin, M. E., and Ho, S. M. (2001). Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. J Clin Endocrinol Metab *86*, 3467-3477.

Taplin, M. E., Rajeshkumar, B., Halabi, S., Werner, C. P., Woda, B. A., Picus, J., Stadler, W., Hayes, D. F., Kantoff, P. W., Vogelzang, N. J., and Small, E. J. (2003). Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. J Clin Oncol *21*, 2673-2678.

Tolcher, A. W., Mita, M., Meropol, N. J., von Mehren, M., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., Mays, T., McCoy, T., Fox, N. L.*, et al.* (2007). Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J Clin Oncol *25*, 1390-1395.

Tong, X., and Li, H. (2004). eNOS protects prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Cancer Lett *210*, 63-71.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncogene *25*, 7434-7439.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A.*, et al.* (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. J Biol Chem *275*, 23319-23325.

Tyrrell, C. J., Denis, L., Newling, D., Soloway, M., Channer, K., and Cockshott, I. D. (1998). Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies. Casodex Study Group. Eur Urol *33*, 39-53.

Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A. O., and Mulder, E. (1992). The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. J Steroid Biochem Mol Biol *41*, 665-669.

Viguier-Martinez, M. C., Hochereau de Reviers, M. T., Barenton, B., and Perreau, C. (1983). Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. Acta Endocrinol (Copenh) *104*, 246-252.

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinanen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet *9*, 401-406.

Volle, D. H., Duggavathi, R., Magnier, B. C., Houten, S. M., Cummins, C. L., Lobaccaro, J. M., Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. Genes Dev *21*, 303-315.

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T.*, et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat Med *5*, 157-163.

Yamaguchi, Y., Shiraki, K., Fuke, H., Inoue, T., Miyashita, K., Yamanaka, Y., Saitou, Y., Sugimoto, K., and Nakano, T. (2005). Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or

survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death. Oncol Rep *14*, 1311-1316.

Yeh, S., Miyamoto, H., Shima, H., and Chang, C. (1998). From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 5527-5532.

Yoshida, T., Kinoshita, H., Segawa, T., Nakamura, E., Inoue, T., Shimizu, Y., Kamoto, T., and Ogawa, O. (2005). Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. Cancer Res *65*, 9611-9616.

Youngblood, G. L., and Payne, A. H. (1992). Isolation and characterization of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17): transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells. Mol Endocrinol *6*, 927-934.

Zhan, P., Lee, E. C., Packman, K., and Tenniswood, M. (2002). Induction of invasive phenotype by Casodex in hormone-sensitive prostate cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol *83*, 101-111.

Zhang, X., Jin, T. G., Yang, H., DeWolf, W. C., Khosravi-Far, R., and Olumi, A. F. (2004). Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. Cancer Res *64*, 7086-7091.

Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochim Biophys Acta *1551*, F1-37.

-IV-
DISCUSSION & PERSPECTIVES

-IV- DISCUSSION & PERSPECTIVES

~

L'augmentation de l'incidence des cancers de la prostate due entre autres au vieillissement de la population, fait de ce cancer le plus fréquent chez l'homme et la deuxième cause de mortalité par cancer. Au stade localisé, le cancer de la prostate est asymptomatique et se traite très bien ; néanmoins, quand le cancer devient symptomatique, il est déjà étendu aux organes adjacents comme les vésicules séminales et les ganglions lymphatiques et se traite principalement par l'hormonothérapie. La privation androgénique induit une régression du cancer par apoptose mais cette efficacité est transitoire. En effet, le cancer évolue vers un stade indépendant des androgènes, incurable où seuls des traitements palliatifs pourront être proposés. Il apparaît alors indispensable de pouvoir agir sur les mécanismes apoptotiques pour combattre plus efficacement le cancer de la prostate métastatique. Pour cela, nous devons comprendre les régulations et dérégulations des mécanismes apoptotiques mis en jeu par la privation androgénique des cancers hormonosensibles et en échappement hormonal par rapport au tissu sain. Dans notre travail, nous avons choisi d'étudier le ligand TRAIL et ses récepteurs qui présentent de nombreux avantages en vue de son utilisation thérapeutique contre le cancer : i) son rôle physiologique anti-tumoral, ii) sa non-toxicité systémique chez les rongeurs et primates non-humains contrairement aux ligands Fas et TNF-α, iii) l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses en épargnant les cellules saines. Dans le cadre du cancer de la prostate androgenodépendant, il nous a paru indispensable d'étudier le système TRAIL en relation avec le statut hormonal. Nous avons abordé cet aspect dans trois modèles d'étude : la prostate normale de rat, la cellule LNCaP, un modèle de cancer prostatique humain hormonosensible, *in vitro*, puis *in vivo* par greffes de ces cellules chez la souris.

Notre premier travail nous a permis de montrer une régulation de l'expression du récepteur DcR2 par la privation androgénique dans la prostate ventrale du rat et de poser l'hypothèse suivante : la diminution du récepteur leurre DcR2 induite par la privation androgénique rend le ligand TRAIL plus disponible pour ses récepteurs fonctionnels DR4 et DR5, favorisant ainsi l'apoptose due à ce système. Nous avons ensuite vérifié cette hypothèse *in vitro* dans les cellules LNCaP et montré que l'inhibition de l'expression de DcR2 augmente l'apoptose cellulaire induite par TRAIL.

L'hypothèse selon laquelle l'expression des récepteurs au TRAIL à la surface cellulaire pourrait déterminer la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par TRAIL avait été posée afin d'expliquer la différence de sensibilité entre des cellules normales exprimant

préférentiellement les récepteurs leurres, et les cellules cancéreuses exprimant les récepteurs de mort (Malhi & Gones 2006). Néanmoins, cette hypothèse est nuancée pour différentes raisons (Dyer 2007) : (i) la difficulté à évaluer les quantités de récepteurs disponibles à la surface cellulaire, (ii) le nombre inconnu de récepteurs suffisants pour induire l'apoptose, (iii) l'expression des récepteurs de mort et leurres quasi-ubiquitaire, (iv) la résistance au TRAIL régulée par des signaux intracellulaires (FLIP, famille Bcl-2, IAP…) et par la voie du NF-κB. Cette complexité des voies de signalisation intracellulaire suggère que nos études effectuées sur le système TRAIL pourraient être complétées par l'analyse d'autres molécules du DISC comme FADD et les caspases 8 et 10. Bien que les expressions de FADD et de la caspase 8 ne semblent pas régulées par les androgènes, Rokhlin et al. ont montré que les androgènes sont nécessaires leur recrutement dans le DISC pour l'induction d'apoptose suite à l'ajout de TRAIL (Rokhlin et al., 2002). Une des molécules régulatrices de l'activation du DISC est la protéine FLIP qui inhibe l'activation de la caspase 8 et constitue une cause de résistance des cellules cancéreuses prostatiques à l'apoptose induite par TRAIL (Zhang et al., 2004). Le promoteur du gène FLIP contient plusieurs ARE et son expression est stimulée par les androgènes (Cornforth et al., 2008; Nastiuk et al., 2003).

Une autre protéine régulatrice de l'apoptose et impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses aux TRAIL est la protéine XIAP, de la famille des IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins). L'inhibition de l'expression de XIAP par siRNA ou la surexpression de Smac/DIABLO qui neutralise son action, sensibilisent les cellules tumorales prostatiques à l'apoptose par le TRAIL.

On pourrait imaginer de « cartographier » les tumeurs prostatiques au cas par cas sur les biopsies prostatiques par analyse de certains marqueurs de résistances à l'apoptose (protéines anti-apoptotiques) et d'échappement hormonal (co-régulateurs du RA, EGFR, Her-2/neu…) et utiliser une combinaison de plusieurs traitements :

- traitements habituels (radiothérapie, et chimiothérapie, hormonothérapie),
- le ligand TRAIL ou un anticorps agoniste des récepteurs de mort,
- un inhibiteur spécifique de protéines anti-apoptotiques détectées comme DcR2, XIAP, FLIP par siRNA in vivo…

Nos résultats *in vitro* nous ont permis de montrer et confirmer que l'expression de DcR2 est régulée par les androgènes comme dans la prostate ventrale de rat, mais DR5 aussi. Nous avons ensuite étendu l'étude des récepteurs au TRAIL à un modèle animal de tumeurs prostatiques chez la souris. Le choix de l'anti-androgène bicalutamide pour mettre les tumeurs

LNCaP en situation de privation androgénique nous a paru judicieux dans un premier temps en raison de son utilisation en hormonothérapie chez l'homme qui nous permettait de nous rapprocher de la réalité. Il s'est avéré qu'à la dose utilisée, non seulement le bicalutamide n'a pas eu l'effet escompté d'inhibition de la prolifération des tumeurs LNCaP. S'est alors posé la question d'un échappement hormonal des tumeurs, hypothèse qui paraît peu vraisemblable du fait des contrôles internes réalisés par injection des cellules LNCaP dans des souris castrées. Les causes d'échappement hormonal sont nombreuses et parmi elles, nous avons vérifié que le bicalutamide n'ai pas favorisé l'apparition de mutations au niveau du site de liaison de ligand du récepteur aux androgènes comme décrit dans la littérature (Haapala et al., 2001; Yoshida et al., 2005). Néanmoins, une surexpression du RA a été montrée dans les tumeurs LNCaP traitées au bicalutamide qui n'est pas un mécanisme de résistance aux androgènes au sens stirct, mais plutôt un moyen que les cellules cancéreuses ont développé pour abaisser leur seuil de sensibilité aux androgènes et favoriser ainsi leur prolifération (Chen et al., 2004; Culig et al., 1999). Des analyses complémentaires sur l'échappement hormonal pourraient être effectuées par : i) l'étude des cofacteurs du RA dont le recrutement dans le complexe de transcription peut-être modifié notamment NCoR (corépresseur) et SRC-1 (coactivateur) (Chen et al., 2004; Hodgson et al., 2007), ii) l'analyse de voies de signalisation intracellulaire interagissant avec le RA comme EGFR et Her2/neu, certains facteurs de croissance et cytokines (IGF1, IL-4 & 6…) décrits comme surexprimés dans le processus d'échappement (Festuccia et al., 2005; Gravina et al., 2007; Osman et al., 2001), iii) l'analyse de voies de signalisation intracellulaire de survie comme NF-κB, Akt et la voie des MAP Kinase (Unni et al., 2004), iv) l'étude de molécules anti-apoptotique de la famille Bcl-2 et les IAP.

Etant donné l'action complexe du bicalutamide au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire, la seconde hypothèse est que le bicalutamide a pu bloquer le rétrocontrôle négatif de la testostérone, et induire une augmentation de la LH et donc de synthèse de testostérone par le testicule de souris. Nous avons donc analysé cet organe, en premier lieu pour savoir si le bicalutamide a eu un effet anti-androgénique sur cet organe androgénorégulé, et s'il a modifié l'expression d'enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse comme les résultats de Friry-Santini et al. ont pu le montré avec un traitement à long terme au flutamide sur le rat (Friry-Santini et al., 2007). Bien que le poids des testicules et le nombre de cellules en apoptose ne varie pas avec le traitement au bicalutamide, cela ne signifie pas que le bicalutamide n'a pas eu d'effet. La vague d'apoptose normalement maximale à 3-4 jours de traitement à l'anti-androgène n'est plus détectable au bout d'un mois. En revanche, le

bicalutamide a induit une augmentation de l'expression d'une enzyme de la stéroïdogenèse la 3βHSD comme décrit par Friry-Santini et al.
Finalement, l'utilisation du bicalutamide dans nos expérimentations chez souris dans le but d'exercer une inhibition de la croissance tumorale a suscité de nouvelles questions sans apporter réellement d'information sur la régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs en cas de privation androgénique dans des tumeurs prostatiques hormonosensibles *in vivo*.

Plus généralement, les expérimentations que l'on pourrait envisager de réaliser pour compléter ce travail pourraient être les suivantes :

1) Concernant l'action du bicalutamide sur la croissance tumorale

- Pour confirmer l'action anti-androgénique sur les tumeurs LNCaP *in vivo*, utiliser du bicalutamide à une dose de 50 mg/kg/j (supérieure à celle utilisée) et comparer avec une castration.

- Pour évaluer plus finement l'effet de la balance taux de testostérone versus doses de bicalutamide sur la croissance tumorale : on pourrait contrôler le taux de testostérone des souris après castration et pose d'implant délivrant une dose précise de testostérone, puis administrer le bicalutamide à différentes doses.

2) Concernant l'étude de TRAIL et ses récepteurs :

- Déterminer l'expression de TRAIL et ses récepteurs dans un modèle de cancer prostatique hormonosensible en situation de réelle privation androgénique par bicalutamide à 50 mg/kg/j ou par castration, à court terme (un à quelques jours de privation androgénique), à long terme (un mois de privation androgénique) et jusqu'à l'échappement hormonal des tumeurs.

- Etudier l'implication de chacun des récepteurs au TRAIL dans la croissance et l'apoptose des tumeurs LNCaP soit par inhibition soit par surexpression des récepteurs dans les cellules LNCaP avant leur injection dans la souris. Par exemple, on peut émettre l'hypothèse que l'inhibition de DcR1/2 ou la surexpression de DR4/5 peuvent

retarder la croissance tumorale et/ou favoriser l'apoptose suite à un traitement anticancéreux. On peut envisager de combiner des traitements classiques (irradiation, chimiothérapie…) au ligand TRAIL sur ces tumeurs.

- Etudier plus finement la fonctionnalité du DISC (par la technique de co-immunoprécipitation) en fonction des androgènes dans des cellules épithéliales prostatiques normales, comparées à des cellules cancéreuses ayant différents degré d'hormonosensibilité.

- Etudier précisément la régulation de l'expression de TRAIL et ses récepteurs par analyse des promoteurs et des facteurs de transcription dont le récepteur aux androgènes.

- Etudier la régulation de l'expression des récepteurs au TRAIL dans les cellules PC3 transfectées avec le RA dans un modèle où Akt n'est pas constitutivement activée contrairement aux cellules LNCaP. (Akt favorise les voies de survie cellulaire et est responsable en partie de la résistance des cellules LNCaP à l'apoptose induite par TRAIL) (Rokhlin et al., 2002).

3) Perspectives de recherche appliquée

- Etude de l'utilisation de siRNA ou de technique dérivée réprimant plus longtemps l'expression de protéines anti-apoptotiques (DcR2, FLIP, XIAP…) *in vivo*.

- TRAIL ayant un rôle physiologique anti-tumoral, on peut envisager de trouver un moyen de stimuler la sécrétion de TRAIL par les cellules du système immunitaire. Cette technique combinée à d'autres traitements pourrait aider à la destruction des cellules cancéreuses.

-V-
REFERENCES

-V- REFERENCES

~

Abbou, C.C. Livre : Chirurgie de la prostate, Ed : Elsevier-Masson 2006.

Abdulkadir, S. A., Magee, J. A., Peters, T. J., Kaleem, Z., Naughton, C. K., Humphrey, P. A., and Milbrandt, J. (2002). Conditional loss of Nkx3.1 in adult mice induces prostatic intraepithelial neoplasia. Mol Cell Biol *22*, 1495-1503.

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. Mol Cell *9*, 423-432.

Algarte-Genin, M., Cussenot, O., and Costa, P. (2004). Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. Eur Urol *46*, 285-294; discussion 294-285.

Amantana, A., London, C. A., Iversen, P. L., and Devi, G. R. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells. Mol Cancer Ther *3*, 699-707.

Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med *3*, 917-921.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G.*, et al.* (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science *277*, 370-372.

Arnold, J. T., Liu, X., Allen, J. D., Le, H., McFann, K. K., and Blackman, M. R. (2007). Androgen receptor or estrogen receptor-beta blockade alters DHEA-, DHT-, and E(2)-induced proliferation and PSA production in human prostate cancer cells. Prostate *67*, 1152-1162.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer *2*, 420-430.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr Opin Cell Biol *11*, 255-260.

Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A.*, et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. J Clin Invest *104*, 155-162.

Ayala, G., Thompson, T., Yang, G., Frolov, A., Li, R., Scardino, P., Ohori, M., Wheeler, T., and Harper, W. (2004). High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. Clin Cancer Res *10*, 6572-6578.

Bai, V. U., Cifuentes, E., Menon, M., Barrack, E. R., and Reddy, G. P. (2005). Androgen receptor regulates Cdc6 in synchronized LNCaP cells progressing from G1 to S phase. J Cell Physiol *204*, 381-387.

Bales, G. T., and Chodak, G. W. (1996). A controlled trial of bicalutamide versus castration in patients with advanced prostate cancer. Urology *47*, 38-43; discussion 48-53.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell *73*, 431-445.

Bauvin, E., Remontet, L., and Grosclaude, P. (2003). [Incidence and mortality of prostate cancer in France: trends between 1978 and 2000]. Prog Urol *13*, 1334-1339.

Benesch, M., Platzbecker, U., Ward, J., Deeg, H. J., and Leisenring, W. (2003). Expression of FLIP(Long) and FLIP(Short) in bone marrow mononuclear and CD34+ cells in patients with myelodysplastic syndrome: correlation with apoptosis. Leukemia *17*, 2460-2466.

Berrevoets, C. A., Umar, A., and Brinkmann, A. O. (2002). Antiandrogens: selective androgen receptor modulators. Mol Cell Endocrinol *198*, 97-103.

Berrevoets, C. A., Veldscholte, J., and Mulder, E. (1993). Effects of antiandrogens on transformation and transcription activation of wild-type and mutated (LNCaP) androgen receptors. J Steroid Biochem Mol Biol *46*, 731-736.

Bicknell, G. R., and Cohen, G. M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. Biochem Biophys Res Commun *207*, 40-47.

Bill-Axelson, A., Holmberg, L., Ruutu, M., Haggman, M., Andersson, S. O., Bratell, S., Spangberg, A., Busch, C., Nordling, S., Garmo, H.*, et al.* (2005). Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. N Engl J Med *352*, 1977-1984.

Bjerklund Johansen, T. E., Majak, M., and Nesland, J. M. (1994). Testicular histology after treatment with the new antiandrogen Casodex for carcinoma of the prostate. A preliminary report. Scand J Urol Nephrol *28*, 67-70.

Boccon-Gibod, L. (1996). Maximum androgen blockade in 1996. Eur Urol *30 Suppl 1*, 15-18; discussion 19-21.

Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem *275*, 20632-20637.

Bodmer, J. L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci *27*, 19-26.

Bonaccorsi, L., Marchiani, S., Muratori, M., Carloni, V., Forti, G., and Baldi, E. (2004). Signaling mechanisms that mediate invasion in prostate cancer cells. Ann N Y Acad Sci *1028*, 283-288.

Bonaccorsi, L., Muratori, M., Marchiani, S., Forti, G., and Baldi, E. (2006). The androgen receptor and prostate cancer invasion. Mol Cell Endocrinol *246*, 157-162.

Bosma, G. C., Custer, R. P., and Bosma, M. J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. Nature *301*, 527-530.

Bostwick, D. G., Burke, H. B., Djakiew, D., Euling, S., Ho, S. M., Landolph, J., Morrison, H., Sonawane, B., Shifflett, T., Waters, D. J., and Timms, B. (2004). Human prostate cancer risk factors. Cancer *101*, 2371-2490.

Bostwick, D. G., Pacelli, A., and Lopez-Beltran, A. (1996). Molecular biology of prostatic intraepithelial neoplasia. Prostate *29*, 117-134.

Bouchal, J., Baumforth, K. R., Svachova, M., Murray, P. G., von Angerer, E., and Kolar, Z. (2005). Microarray analysis of bicalutamide action on telomerase activity, p53 pathway and viability of prostate carcinoma cell lines. J Pharm Pharmacol *57*, 83-92.

Bouchal, J., Kolar, Z., Mad'arova, J., Hlobilkova, A., and von Angerer, E. (2002). The effects of natural ligands of hormone receptors and their antagonists on telomerase activity in the androgen sensitive prostatic cancer cell line LNCaP. Biochem Pharmacol *63*, 1177-1181.

Bourguiba, S., Genissel, C., Lambard, S., Bouraima, H., and Carreau, S. (2003). Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 335-343.

Brawer, M. K. (1999). Prostate-specific antigen: current status. CA Cancer J Clin *49*, 264-281.

Broulik, P. D., and Starka, L. (1997). Effect of antiandrogens casodex and epitestosterone on bone composition in mice. Bone *20*, 473-475.

Bucur, O., Ray, S., Bucur, M. C., and Almasan, A. (2006). APO2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy. Front Biosci *11*, 1549-1568.

Budd, R. C., Yeh, W. C., and Tschopp, J. (2006). cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. Nat Rev Immunol *6*, 196-204.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. Annu Rev Cell Dev Biol *15*, 269-290.

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., and et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. Science *269*, 1885-1888.

Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A *72*, 3666-3670.

Carter, H. B., Pearson, J. D., Metter, E. J., Brant, L. J., Chan, D. W., Andres, R., Fozard, J. L., and Walsh, P. C. (1992). Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. Jama *267*, 2215-2220.

Catalona, W. J., Partin, A. W., Slawin, K. M., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., Richie, J. P., deKernion, J. B., Walsh, P. C., Scardino, P. T.*, et al.* (1998). Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. Jama *279*, 1542-1547.

Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. (1998). Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. Cell *94*, 727-737.

Cha, S. S., Kim, M. S., Choi, Y. H., Sung, B. J., Shin, N. K., Shin, H. C., Sung, Y. C., and Oh, B. H. (1999). 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. Immunity *11*, 253-261.

Cha, S. S., Sung, B. J., Kim, Y. A., Song, Y. L., Kim, H. J., Kim, S., Lee, M. S., and Oh, B. H. (2000). Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. J Biol Chem *275*, 31171-31177.

Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. Embo J *21*, 3704-3714.

Chang, H. Y., and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev *64*, 821-846.

Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity *7*, 821-830.

Chawla-Sarkar, M., Bae, S. I., Reu, F. J., Jacobs, B. S., Lindner, D. J., and Borden, E. C. (2004). Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. Cell Death Differ *11*, 915-923.

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, X., Kandasamy, K., and Srivastava, R. K. (2003). Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. Cancer Res *63*, 1059-1066.

Chiaverotti, T., Couto, S. S., Donjacour, A., Mao, J. H., Nagase, H., Cardiff, R. D., Cunha, G. R., and Balmain, A. (2008). Dissociation of epithelial and neuroendocrine carcinoma lineages in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model of prostate cancer. Am J Pathol *172*, 236-246.

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell *81*, 505-512.

Chinnaiyan, A. M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D. A., Shanaiah, M., Chenevert, T. L., Ross, B. D., and Rehemtulla, A. (2000). Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 1754-1759.

Chodak, G. W. (2005). Maximum androgen blockade: a clinical update. Rev Urol *7 Suppl 5*, S13-17.

Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M. J., and Chan, F. K. (2005). Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 18099-18104.

Cockshott, I. D. (2004). Bicalutamide: clinical pharmacokinetics and metabolism. Clin Pharmacokinet *43*, 855-878.

Coley, C. M., Barry, M. J., Fleming, C., Wasson, J. H., Fahs, M. C., and Oesterling, J. E. (1995). Should Medicare provide reimbursement for prostate-specific antigen testing for early detection of prostate cancer? Part II: Early detection strategies. Urology *46*, 125-141.

Coley, W. B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. Clin Orthop Relat Res, 3-11.

Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., and Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res *65*, 10946-10951.

Colombel, M., Dante, R., Bouvier, R., Ribieras, S., Pangaud, C., Marechal, J. M., and Lasne, Y. (1999). Differential RNA expression of the pS2 gene in the human benign and malignant prostatic tissue. Prostate Cancer Prostatic Dis *2*, S11.

Colombel, M., Symmans, F., Gil, S., O'Toole, K. M., Chopin, D., Benson, M., Olsson, C. A., Korsmeyer, S., and Buttyan, R. (1993). Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. Am J Pathol *143*, 390-400.

Compagno, D., Merle, C., Morin, A., Gilbert, C., Mathieu, J. R., Bozec, A., Mauduit, C., Benahmed, M., and Cabon, F. (2007). SIRNA-directed in vivo silencing of androgen receptor inhibits the growth of castration-resistant prostate carcinomas. PLoS ONE *2*, e1006.

Comuzzi, B., Nemes, C., Schmidt, S., Jasarevic, Z., Lodde, M., Pycha, A., Bartsch, G., Offner, F., Culig, Z., and Hobisch, A. (2004). The androgen receptor co-activator CBP is up-regulated following androgen withdrawal and is highly expressed in advanced prostate cancer. J Pathol *204*, 159-166.

Cornforth, A. N., Davis, J. S., Khanifar, E., Nastiuk, K. L., and Krolewski, J. J. (2008). FOXO3a mediates the androgen-dependent regulation of FLIP and contributes to TRAIL-induced apoptosis of LNCaP cells. Oncogene.

Couzinet, A., Herincs, Z., Hueber, A.O. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. Médecine sciences 2002, vol. 18, n°8-9, pp. 841-852.

Craft, N., Shostak, Y., Carey, M., and Sawyers, C. L. (1999). A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. Nat Med *5*, 280-285.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. J Immunol *168*, 1356-1361.

Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., and Klocker, H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. Cancer Res *54*, 5474-5478.

Culig, Z., Hoffmann, J., Erdel, M., Eder, I. E., Hobisch, A., Hittmair, A., Bartsch, G., Utermann, G., Schneider, M. R., Parczyk, K., and Klocker, H. (1999). Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system. Br J Cancer *81*, 242-251.

Cussenot, O., Teillac, P. Livre : le Cancer de la prostate. Ed : John Libbey Eurotext 2000.

de la Taille, A., Chen, M. W., Shabsigh, A., Bagiella, E., Kiss, A., and Buttyan, R. (1999). Fas antigen/CD-95 upregulation and activation during castration-induced regression of the rat ventral prostate gland. Prostate *40*, 89-96.

De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. Nat Rev Cancer *7*, 256-269.

Declercq, W., Denecker, G., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. J Immunol *161*, 390-399.

Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. Immunity *7*, 813-820.

Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. Oncogene *22*, 8543-8567.

Di Pietro, R., and Zauli, G. (2004). Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. J Cell Physiol *201*, 331-340.

Diehl, G. E., Yue, H. H., Hsieh, K., Kuang, A. A., Ho, M., Morici, L. A., Lenz, L. L., Cado, D., Riley, L. W., and Winoto, A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. Immunity *21*, 877-889.

Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J. M., and Venkatachalam, M. A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. Am J Pathol *151*, 1205-1213.

Dyer, M. J., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2007). Barriers to effective TRAIL-targeted therapy of malignancy. J Clin Oncol *25*, 4505-4506.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. Annu Rev Biochem *68*, 383-424.

Eaton, C. L., Wells, J. M., Holen, I., Croucher, P. I., and Hamdy, F. C. (2004). Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer. Prostate *59*, 304-310.

Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K. M., and Jeremias, I. (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. Oncogene *22*, 3842-3852.

Ehrlich, S., Infante-Duarte, C., Seeger, B., and Zipp, F. (2003). Regulation of soluble and surface-bound TRAIL in human T cells, B cells, and monocytes. Cytokine *24*, 244-253.

Ellem, S. J., and Risbridger, G. P. (2007). Treating prostate cancer: a rationale for targeting local oestrogens. Nat Rev Cancer *7*, 621-627.

Ellem, S. J., Schmitt, J. F., Pedersen, J. S., Frydenberg, M., and Risbridger, G. P. (2004). Local aromatase expression in human prostate is altered in malignancy. J Clin Endocrinol Metab *89*, 2434-2441.

Ellwood-Yen, K., Graeber, T. G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M. L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G. V., and Sawyers, C. L. (2003). Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. Cancer Cell *4*, 223-238.

El-Zawahry, A., McKillop, J., and Voelkel-Johnson, C. (2005). Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts. BMC Cancer *5*, 2.

Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., *et al.* (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem *273*, 14363-14367.

Esposti, M. D. (2002). The roles of Bid. Apoptosis *7*, 433-440.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol *148*, 2207-2216.

Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Okabe, T., Nomura, M., Daitoku, H., Fukamizu, A., Kato, S., Takayanagi, R., and Nawata, H. (2007). Insulin-like growth factor 1/insulin signaling activates androgen signaling through direct interactions of Foxo1 with androgen receptor. J Biol Chem *282*, 7329-7338.

Feldman, B. J., and Feldman, D. (2001). The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer *1*, 34-45.

Festuccia, C., Gravina, G. L., Angelucci, A., Millimaggi, D., Muzi, P., Vicentini, C., and Bologna, M. (2005). Additive antitumor effects of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, gefitinib (Iressa), and the nonsteroidal antiandrogen, bicalutamide (Casodex), in prostate cancer cells in vitro. Int J Cancer *115*, 630-640.

Finnberg, N., Klein-Szanto, A. J., and El-Deiry, W. S. (2008). TRAIL-R deficiency in mice promotes susceptibility to chronic inflammation and tumorigenesis. J Clin Invest *118*, 111-123.

Fix, C., Jordan, C., Cano, P., and Walker, W. H. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 10919-10924.

Fong, W. G., Liston, P., Rajcan-Separovic, E., St Jean, M., Craig, C., and Korneluk, R. G. (2000). Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. Genomics *70*, 113-122.

Fossa, S. D., Slee, P. H., Brausi, M., Horenblas, S., Hall, R. R., Hetherington, J. W., Aaronson, N., de Prijck, L., and Collette, L. (2001). Flutamide versus prednisone in patients with prostate cancer symptomatically progressing after androgen-ablative therapy: a phase III study of the European organization for research and treatment of cancer genitourinary group. J Clin Oncol *19*, 62-71.

Fourcade, R. O., Richaud, P., Coloby, P., and Malavaud, B. (2007). [Role of 150 mg bicalutamide in the treatment of prostate cancer: 3rd analysis of the EPC (early prostate cancer) program]. Prog Urol *17*, 891-910.

Frankel, S., Smith, G. D., Donovan, J., and Neal, D. (2003). Screening for prostate cancer. Lancet *361*, 1122-1128.

Freeman, M. R., Cinar, B., and Lu, M. L. (2005). Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer. Trends Endocrinol Metab *16*, 273-279.

Friry-Santini, C., Rouquie, D., Kennel, P., Tinwell, H., Benahmed, M., and Bars, R. (2007). Correlation between protein accumulation profiles and conventional toxicological findings using a model antiandrogenic compound, flutamide. Toxicol Sci *97*, 81-93.

Fujimoto, N., Mizokami, A., Harada, S., and Matsumoto, T. (2001). Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. Urology *58*, 289-294.

Fujimoto, N., Suzuki, T., Honda, H., and Kitamura, S. (2004). Estrogen enhancement of androgen-responsive gene expression in hormone-induced hyperplasia in the ventral prostate of F344 rats. Cancer Sci *95*, 711-715.

Gajewski, T. F. (2007). On the TRAIL toward death receptor-based cancer therapeutics. J Clin Oncol *25*, 1305-1307.

Gao, S., Lee, P., Wang, H., Gerald, W., Adler, M., Zhang, L., Wang, Y. F., and Wang, Z. (2005). The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells. Mol Endocrinol *19*, 1792-1802.

Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the androgen receptor. J Clin Oncol *20*, 3001-3015.

Gershwin, M. E., Merchant, B., Gelfand, M. C., Vickers, J., Steinberg, A. D., and Hansen, C. T. (1975). The natural history and immunopathology of outbred athymic (nude) mice. Clin Immunol Immunopathol *4*, 324-340.

Gleason, D. F., and Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J Urol *111*, 58-64.

Gleave, M., Hsieh, J. T., Gao, C. A., von Eschenbach, A. C., and Chung, L. W. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. Cancer Res *51*, 3753-3761.

Goktas, S., Ziada, A., and Crawford, E. D. (1999). Combined androgen blockade for advanced prostatic carcinoma. Prostate Cancer Prostatic Dis *2*, 172-179.

Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I., and Green, D. R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol *2*, 156-162.

Gong, B., and Almasan, A. (2000). Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene. Biochem Biophys Res Commun *278*, 747-752.

Grataroli, R., Vindrieux, D., Gougeon, A., and Benahmed, M. (2002). Expression of tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in rat testis during development. Biol Reprod *66*, 1707-1715.

Grataroli, R., Vindrieux, D., Selva, J., Felsenheld, C., Ruffion, A., Decaussin, M., and Benahmed, M. (2004). Characterization of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in the adult human testis. Mol Hum Reprod *10*, 123-128.

Gravina, G. L., Festuccia, C., Galatioto, G. P., Muzi, P., Angelucci, A., Ronchi, P., Costa, A. M., Bologna, M., and Vicentini, C. (2007). Surgical and biologic outcomes after neoadjuvant bicalutamide treatment in prostate cancer. Urology *70*, 728-733.

Green, D. R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science *305*, 626-629.

Greenberg, N. M., DeMayo, F., Finegold, M. J., Medina, D., Tilley, W. D., Aspinall, J. O., Cunha, G. R., Donjacour, A. A., Matusik, R. J., and Rosen, J. M. (1995). Prostate cancer in a transgenic mouse. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 3439-3443.

Gregory, C. W., Johnson, R. T., Jr., Mohler, J. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. Cancer Res *61*, 2892-2898.

Griffith, T. S., Wiley, S. R., Kubin, M. Z., Sedger, L. M., Maliszewski, C. R., and Fanger, N. A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. J Exp Med *189*, 1343-1354.

Gronberg, H. (2003). Prostate cancer epidemiology. Lancet *361*, 859-864.

Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev *13*, 1899-1911.

Grosse-Wilde, A., Voloshanenko, O., Bailey, S. L., Longton, G. M., Schaefer, U., Csernok, A. I., Schutz, G., Greiner, E. F., Kemp, C. J., and Walczak, H. (2008). TRAIL-R deficiency in mice enhances lymph node metastasis without affecting primary tumor development. J Clin Invest *118*, 100-110.

Guseva, N. V., Taghiyev, A. F., Sturm, M. T., Rokhlin, O. W., and Cohen, M. B. (2004). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-

associated nuclear factor-kappaB in prostatic carcinoma cell lines. Mol Cancer Res *2*, 574-584.

Haapala, K., Hyytinen, E. R., Roiha, M., Laurila, M., Rantala, I., Helin, H. J., and Koivisto, P. A. (2001). Androgen receptor alterations in prostate cancer relapsed during a combined androgen blockade by orchiectomy and bicalutamide. Lab Invest *81*, 1647-1651.

Haldar, S., Basu, A., and Croce, C. M. (1997). Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. Cancer Res *57*, 229-233.

Hara, T., Miyazaki, J., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., and Miyamoto, M. (2003). Novel mutations of androgen receptor: a possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. Cancer Res *63*, 149-153.

Heinlein, C. A., and Chang, C. (2002). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. Mol Endocrinol *16*, 2181-2187.

Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature *407*, 770-776.

Hengartner, M. O., Ellis, R. E., and Horvitz, H. R. (1992). Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. Nature *356*, 494-499.

Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994). Programmed cell death in Caenorhabditis elegans. Curr Opin Genet Dev *4*, 581-586.

Hesry, V., Piquet-Pellorce, C., Travert, M., Donaghy, L., Jegou, B., Patard, J. J., and Guillaudeux, T. (2006). Sensitivity of prostate cells to TRAIL-induced apoptosis increases with tumor progression: DR5 and caspase 8 are key players. Prostate *66*, 987-995.

Hill, R., Song, Y., Cardiff, R. D., and Van Dyke, T. (2005). Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. Cancer Res *65*, 10243-10254.

Hilliard, B., Wilmen, A., Seidel, C., Liu, T. S., Goke, R., and Chen, Y. (2001). Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol *166*, 1314-1319.

Ho, S. M., and Roy, D. (1994). Sex hormone-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats. Cancer Lett *84*, 155-162.

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

Hobisch, A., Hoffmann, J., Lambrinidis, L., Eder, I. E., Bartsch, G., Klocker, H., and Culig, Z. (2000). Antagonist/agonist balance of the nonsteroidal antiandrogen bicalutamide (Casodex) in a new prostate cancer model. Urol Int *65*, 73-79.

Hodgson, M. C., Astapova, I., Hollenberg, A. N., and Balk, S. P. (2007). Activity of androgen receptor antagonist bicalutamide in prostate cancer cells is independent of NCoR and SMRT corepressors. Cancer Res *67*, 8388-8395.

Holen, I., and Shipman, C. M. (2006). Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. Clin Sci (Lond) *110*, 279-291.

Holzbeierlein, J., Lal, P., LaTulippe, E., Smith, A., Satagopan, J., Zhang, L., Ryan, C., Smith, S., Scher, H., Scardino, P., *et al.* (2004). Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. Am J Pathol *164*, 217-227.

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., and Murphy, G. P. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. Cancer Res *43*, 1809-1818.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. Cell *81*, 495-504.

Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (1999). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. J Biol Chem *274*, 30603-30610.

Huggins, C., and Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. J Urol *168*, 9-12.

Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A., and de Vos, A. M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. Mol Cell *4*, 563-571.

Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. Biochemistry *39*, 633-640.

Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., Wang, Z., Liu, D., Ohtsuka, T., Zhang, H., Mountz, J. D., Koopman, W. J., Kimberly, R. P., and Zhou, T. (2001). Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. Nat Med *7*, 954-960.

Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. Nat Med *11*, 71-76.

Irmler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature *388*, 190-195.

Isaacs, J. T., Lundmo, P. I., Berges, R., Martikainen, P., Kyprianou, N., and English, H. F. (1992). Androgen regulation of programmed death of normal and malignant prostatic cells. J Androl *13*, 457-464.

Iswaran, T. J., Imai, M., Betton, G. R., and Siddall, R. A. (1997). An overview of animal toxicology studies with bicalutamide (ICI 176,334). J Toxicol Sci *22*, 75-88.

Iversen, P., Tveter, K., and Varenhorst, E. (1996). Randomised study of Casodex 50 MG monotherapy vs orchidectomy in the treatment of metastatic prostate cancer. The Scandinavian Casodex Cooperative Group. Scand J Urol Nephrol *30*, 93-98.

Iversen, P., Tyrrell, C. J., Kaisary, A. V., Anderson, J. B., Van Poppel, H., Tammela, T. L., Chamberlain, M., Carroll, K., and Melezinek, I. (2000). Bicalutamide monotherapy compared with castration in patients with nonmetastatic locally advanced prostate cancer: 6.3 years of followup. J Urol *164*, 1579-1582.

Jellinger, K. A. (2001). Cell death mechanisms in neurodegeneration. J Cell Mol Med *5*, 1-17.

Jeremias, I., and Debatin, K. M. (1998). TRAIL induces apoptosis and activation of NFkappaB. Eur Cytokine Netw *9*, 687-688.

Jo, M., Kim, T. H., Seol, D. W., Esplen, J. E., Dorko, K., Billiar, T. R., and Strom, S. C. (2000). Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Nat Med *6*, 564-567.

Jones, H. B., Betton, G. R., Bowdler, A. L., McFarquhar, R. L., Middleton, B. J., and Lunglmayr, G. (1994). Pathological and morphometric assessment of testicular parameters in patients with metastatic prostate cancer following treatment with either the antiandrogen Casodex (ZM176,334) or bilateral orchidectomy. Urol Res *22*, 191-195.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature *410*, 549-554.

Kaarbo, M., Klokk, T. I., and Saatcioglu, F. (2007). Androgen signaling and its interactions with other signaling pathways in prostate cancer. Bioessays *29*, 1227-1238.

Kaisary, A. V., Tyrrell, C. J., Beacock, C., Lunglmayr, G., and Debruyne, F. (1995). A randomised comparison of monotherapy with Casodex 50 mg daily and castration in the treatment of metastatic prostate carcinoma. Casodex Study Group. Eur Urol *28*, 215-222.

Kalach, J. J., Joly-Pharaboz, M. O., Chantepie, J., Nicolas, B., Descotes, F., Mauduit, C., Benahmed, M., and Andre, J. (2005). Divergent biological effects of estradiol and

diethylstilbestrol in the prostate cancer cell line MOP. J Steroid Biochem Mol Biol *96*, 119-129.

Kang, J., Bu, J., Hao, Y., and Chen, F. (2005). Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. Prostate Cancer Prostatic Dis *8*, 274-279.

Karazanashvili, G., and Abrahamsson, P. A. (2003). Prostate specific antigen and human glandular kallikrein 2 in early detection of prostate cancer. J Urol *169*, 445-457.

Kasof, G. M., and Gomes, B. C. (2001). Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. J Biol Chem *276*, 3238-3246.

Kassouf, W., Tanguay, S., and Aprikian, A. G. (2003). Nilutamide as second line hormone therapy for prostate cancer after androgen ablation fails. J Urol *169*, 1742-1744.

Kaya, C., Ozyurek, M., and Turkeri, L. N. (2005). Comparison of microvessel densities in rat prostate tissues treated with finasteride, bicalutamide and surgical castration: a preliminary study. Int J Urol *12*, 194-198.

Kelley, S. K., Harris, L. A., Xie, D., Deforge, L., Totpal, K., Bussiere, J., and Fox, J. A. (2001). Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. J Pharmacol Exp Ther *299*, 31-38.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer *26*, 239-257.

Kim, C. Y., Jeong, M., Mushiake, H., Kim, B. M., Kim, W. B., Ko, J. P., Kim, M. H., Kim, M., Kim, T. H., Robbins, P. D., *et al.* (2006a). Cancer gene therapy using a novel secretable trimeric TRAIL. Gene Ther *13*, 330-338.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2006b). Role of mitochondria as the gardens of cell death. Cancer Chemother Pharmacol *57*, 545-553.

Kim, S. B., Kanno, A., Ozawa, T., Tao, H., and Umezawa, Y. (2007). Nongenomic activity of ligands in the association of androgen receptor with SRC. ACS Chem Biol *2*, 484-492.

Kimura, K., Markowski, M., Bowen, C., and Gelmann, E. P. (2001). Androgen blocks apoptosis of hormone-dependent prostate cancer cells. Cancer Res *61*, 5611-5618.

Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. J Biol Chem *276*, 46639-46646.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., and Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. Biochemistry *25*, 312-318.

Klokk, T. I., Kurys, P., Elbi, C., Nagaich, A. K., Hendarwanto, A., Slagsvold, T., Chang, C. Y., Hager, G. L., and Saatcioglu, F. (2007). Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. Mol Cell Biol *27*, 1823-1843.

Koivisto, P., Kononen, J., Palmberg, C., Tammela, T., Hyytinen, E., Isola, J., Trapman, J., Cleutjens, K., Noordzij, A., Visakorpi, T., and Kallioniemi, O. P. (1997). Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Res *57*, 314-319.

Koksal, I. T., Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Griffith, T. S., and Sanlioglu, S. (2008). Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma. Urol Oncol *26*, 158-165.

Kolvenbag, G. J., Blackledge, G. R., and Gotting-Smith, K. (1998). Bicalutamide (Casodex) in the treatment of prostate cancer: history of clinical development. Prostate *34*, 61-72.

Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ *7*, 1166-1173.

Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., *et al.* (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. Cell *104*, 719-730.

Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. Mol Cell Biol *21*, 8247-8254.

Kucuk, O., Fisher, E., Moinpour, C. M., Coleman, D., Hussain, M. H., Sartor, A. O., Chatta, G. S., Lowe, B. A., Eisenberger, M. A., and Crawford, E. D. (2001). Phase II trial of bicalutamide in patients with advanced prostate cancer in whom conventional hormonal therapy failed: a Southwest Oncology Group study (SWOG 9235). Urology *58*, 53-58.

Kuil, C. W., Berrevoets, C. A., and Mulder, E. (1995). Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. J Biol Chem *270*, 27569-27576.

Kumar, S., and Colussi, P. A. (1999). Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. Trends Biochem Sci *24*, 1-4.

Labrie, F., Cusan, L., Gomez, J. L., Candas, B., Belanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., and Simard, J. (2003). [From the gene to the clinic: prostate cancer death can now be an exception?]. Med Sci (Paris) *19*, 910-919.

Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Cusan, L., Lacourciere, Y., Monfette, G., Laberge, J. G., Emond, J. P., Fazekas, A. T., Raynaud, J. P., and Husson, J. M. (1982). New hormonal therapy in prostatic carcinoma: combined treatment with an LHRH agonist and an antiandrogen. Clin Invest Med *5*, 267-275.

Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., St-Arnaud, R., Giguere, M., Lacourciere, Y., Emond, J., and Monfette, G. (1986). Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. Endocr Rev *7*, 67-74.

Lagace, M., Xuan, J. Y., Young, S. S., McRoberts, C., Maier, J., Rajcan-Separovic, E., and Korneluk, R. G. (2001). Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. Genomics *77*, 181-188.

Lai, J. S., Brown, L. G., True, L. D., Hawley, S. J., Etzioni, R. B., Higano, C. S., Ho, S. M., Vessella, R. L., and Corey, E. (2004). Metastases of prostate cancer express estrogen receptor-beta. Urology *64*, 814-820.

Lam, J. S., Leppert, J. T., Vemulapalli, S. N., Shvarts, O., and Belldegrun, A. S. (2006). Secondary hormonal therapy for advanced prostate cancer. J Urol *175*, 27-34.

Lambard, S., Silandre, D., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bourguiba, S., and Carreau, S. (2005). Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. J Steroid Biochem Mol Biol *95*, 63-69.

Lamhamedi-Cherradi, S. E., Zheng, S. J., Maguschak, K. A., Peschon, J., and Chen, Y. H. (2003). Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. Nat Immunol *4*, 255-260.

Lau, K. M., LaSpina, M., Long, J., and Ho, S. M. (2000). Expression of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta in normal and malignant prostatic epithelial cells: regulation by methylation and involvement in growth regulation. Cancer Res *60*, 3175-3182.

Lau, K. M., Leav, I., and Ho, S. M. (1998). Rat estrogen receptor-alpha and -beta, and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the Noble rats. Endocrinology *139*, 424-427.

Lawrence, D., Shahrokh, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., *et al.* (2001). Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. Nat Med *7*, 383-385.

Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature *371*, 346-347.

Leav, I., Lau, K. M., Adams, J. Y., McNeal, J. E., Taplin, M. E., Wang, J., Singh, H., and Ho, S. M. (2001). Comparative studies of the estrogen receptors beta and alpha and the androgen receptor in normal human prostate glands, dysplasia, and in primary and metastatic carcinoma. Am J Pathol *159*, 79-92.

LeBlanc, H. N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ *10*, 66-75.

Lee, D. K., and Chang, C. (2003). Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. J Clin Endocrinol Metab *88*, 4043-4054.

Lee, E. C., Zhan, P., Schallhom, R., Packman, K., and Tenniswood, M. (2003). Antiandrogen-induced cell death in LNCaP human prostate cancer cells. Cell Death Differ *10*, 761-771.

Lee, J. T., Jr., Steelman, L. S., and McCubrey, J. A. (2004). Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. Cancer Res *64*, 8397-8404.

Lee, S. O., Pinder, E., Chun, J. Y., Lou, W., Sun, M., and Gao, A. C. (2008). Interleukin-4 stimulates androgen-independent growth in LNCaP human prostate cancer cells. Prostate *68*, 85-91.

Leotoing, L., Meunier, L., Manin, M., Mauduit, C., Decaussin, M., Verrijdt, G., Claessens, F., Benahmed, M., Veyssiere, G., Morel, L., and Beaudoin, C. (2008). Influence of nucleophosmin/B23 on DNA binding and transcriptional activity of the androgen receptor in prostate cancer cell. Oncogene *27*, 2858-2867.

Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J. D. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. Nature *416*, 345-347.

Li, Z., Szabolcs, M., Terwilliger, J. D., and Efstratiadis, A. (2006). Prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma in mice expressing a probasin-Neu oncogenic transgene. Carcinogenesis *27*, 1054-1067.

Liao, C. P., Zhong, C., Saribekyan, G., Bading, J., Park, R., Conti, P. S., Moats, R., Berns, A., Shi, W., Zhou, Z., *et al.* (2007). Mouse models of prostate adenocarcinoma with the capacity to monitor spontaneous carcinogenesis by bioluminescence or fluorescence. Cancer Res *67*, 7525-7533.

Lim, D. J., Liu, X. L., Sutkowski, D. M., Braun, E. J., Lee, C., and Kozlowski, J. M. (1993). Growth of an androgen-sensitive human prostate cancer cell line, LNCaP, in nude mice. Prostate *22*, 109-118.

Lin, H. K., Hu, Y. C., Lee, D. K., and Chang, C. (2004). Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor

suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. Mol Endocrinol *18*, 2409-2423.

Lin, J. H., Deng, G., Huang, Q., and Morser, J. (2000). KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. Biochem Biophys Res Commun *279*, 820-831.

Lindsey, J. S., and Wilkinson, M. F. (1996). Pem: a testosterone- and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. Dev Biol *179*, 471-484.

Liston, P., Fong, W. G., and Korneluk, R. G. (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene *22*, 8568-8580.

Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell *104*, 487-501.

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

Lu, M. L., Schneider, M. C., Zheng, Y., Zhang, X., and Richie, J. P. (2001). Caveolin-1 interacts with androgen receptor. A positive modulator of androgen receptor mediated transactivation. J Biol Chem *276*, 13442-13451.

Lukka, H., Waldron, T., Klotz, L., Winquist, E., and Trachtenberg, J. (2006). Maximal androgen blockade for the treatment of metastatic prostate cancer-a systematic review. Curr Oncol *13*, 81-93.

Ma, X., Ziel-van der Made, A. C., Autar, B., van der Korput, H. A., Vermeij, M., van Duijn, P., Cleutjens, K. B., de Krijger, R., Krimpenfort, P., Berns, A.*, et al.* (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. Cancer Res *65*, 5730-5739.

MacFarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. Toxicol Lett *139*, 89-97.

MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. J Biol Chem *272*, 25417-25420.

MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S. L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, D. B., Dyer, M. J., and Cohen, G. M. (2005). Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1. Cell Death Differ *12*, 773-782.

Maggiolini, M., Recchia, A. G., Carpino, A., Vivacqua, A., Fasanella, G., Rago, V., Pezzi, V., Briand, P. A., Picard, D., and Ando, S. (2004). Oestrogen receptor beta is required for androgen-stimulated proliferation of LNCaP prostate cancer cells. J Mol Endocrinol *32*, 777-791.

Majumder, P. K., Yeh, J. J., George, D. J., Febbo, P. G., Kum, J., Xue, Q., Bikoff, R., Ma, H., Kantoff, P. W., Golub, T. R., *et al.* (2003). Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7841-7846.

Makridakis, N., Ross, R. K., Pike, M. C., Chang, L., Stanczyk, F. Z., Kolonel, L. N., Shi, C. Y., Yu, M. C., Henderson, B. E., and Reichardt, J. K. (1997). A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. Cancer Res *57*, 1020-1022.

Malhi, H., and Gores, G. J. (2006). TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? Oncogene *25*, 7333-7335.

Marcelli, M., Haidacher, S. J., Plymate, S. R., and Birnbaum, R. S. (1995). Altered growth and insulin-like growth factor-binding protein-3 production in PC3 prostate carcinoma cells stably transfected with a constitutively active androgen receptor complementary deoxyribonucleic acid. Endocrinology *136*, 1040-1048.

Marcelli, M., Ittmann, M., Mariani, S., Sutherland, R., Nigam, R., Murthy, L., Zhao, Y., DiConcini, D., Puxeddu, E., Esen, A., *et al.* (2000). Androgen receptor mutations in prostate cancer. Cancer Res *60*, 944-949.

Marcelli, M., Stenoien, D. L., Szafran, A. T., Simeoni, S., Agoulnik, I. U., Weigel, N. L., Moran, T., Mikic, I., Price, J. H., and Mancini, M. A. (2006). Quantifying effects of ligands on androgen receptor nuclear translocation, intranuclear dynamics, and solubility. J Cell Biochem *98*, 770-788.

Marker, P. C., Donjacour, A. A., Dahiya, R., and Cunha, G. R. (2003). Hormonal, cellular, and molecular control of prostatic development. Dev Biol *253*, 165-174.

Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. Curr Biol *7*, 1003-1006.

Masiello, D., Cheng, S., Bubley, G. J., Lu, M. L., and Balk, S. P. (2002). Bicalutamide functions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor. J Biol Chem *277*, 26321-26326.

McLeod, D. G., Iversen, P., See, W. A., Morris, T., Armstrong, J., and Wirth, M. P. (2006). Bicalutamide 150 mg plus standard care vs standard care alone for early prostate cancer. BJU Int *97*, 247-254.

McNeal, J. E. (1988). Normal histology of the prostate. Am J Surg Pathol *12*, 619-633.

McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., and Stamey, T. A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. Am J Surg Pathol *12*, 897-906.

McPherson, S. J., Ellem, S. J., Simpson, E. R., Patchev, V., Fritzemeier, K. H., and Risbridger, G. P. (2007). Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. Endocrinology *148*, 566-574.

Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006). Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. Mol Cell Biol *26*, 7046-7055.

Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. J Biol Chem *277*, 45162-45171.

Micheau, O., and Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. Cell *114*, 181-190.

Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M. V., Ametrano, D., Zannini, M. S., Abbondanza, C., and Auricchio, F. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. Embo J *19*, 5406-5417.

Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwieg, E. A., and Yuan, J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. Cell *75*, 653-660.

Miyamoto, H., Yeh, S., Wilding, G., and Chang, C. (1998). Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 7379-7384.

Mohamad, N., Gutierrez, A., Nunez, M., Cocca, C., Martin, G., Cricco, G., Medina, V., Rivera, E., and Bergoc, R. (2005). Mitochondrial apoptotic pathways. Biocell *29*, 149-161.

Mongkolsapaya, J., Grimes, J. M., Chen, N., Xu, X. N., Stuart, D. I., Jones, E. Y., and Screaton, G. R. (1999). Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. Nat Struct Biol *6*, 1048-1053.

Morgante, E., Gradini, R., Realacci, M., Sale, P., D'Eramo, G., Perrone, G. A., Cardillo, M. R., Petrangeli, E., Russo, M., and Di Silverio, F. (2001). Effects of long-term treatment with the anti-androgen bicalutamide on human testis: an ultrastructural and morphometric study. Histopathology *38*, 195-201.

Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U. R., and Schafer, H. (2004). Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. Cancer Res *64*, 1331-1337.

Muhlenbeck, F., Haas, E., Schwenzer, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., and Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. J Biol Chem *273*, 33091-33098.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. Cell *88*, 355-365.

Nantermet, P. V., Xu, J., Yu, Y., Hodor, P., Holder, D., Adamski, S., Gentile, M. A., Kimmel, D. B., Harada, S., Gerhold, D., *et al.* (2004). Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. J Biol Chem *279*, 1310-1322.

Nastiuk, K. L., Kim, J. W., Mann, M., and Krolewski, J. J. (2003). Androgen regulation of FLICE-like inhibitory protein gene expression in the rat prostate. J Cell Physiol *196*, 386-393.

Ng, C. P., and Bonavida, B. (2002). X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) blocks Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of prostate cancer cells in the presence of mitochondrial activation: sensitization by overexpression of second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pl (Smac/DIABLO). Mol Cancer Ther *1*, 1051-1058.

Ngan, E. S., Hashimoto, Y., Ma, Z. Q., Tsai, M. J., and Tsai, S. Y. (2003). Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer. Oncogene *22*, 734-739.

Nickerson, T., and Pollak, M. (1999). Bicalutamide (Casodex)-induced prostate regression involves increased expression of genes encoding insulin-like growth factor binding proteins. Urology *54*, 1120-1125.

Nicotera, P., and Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. Oncogene *23*, 2757-2765.

Nieh, P. T. (1995). Withdrawal phenomenon with the antiandrogen casodex. J Urol *153*, 1070-1072; discussion 1072-1073.

Nimmanapalli, R., Perkins, C. L., Orlando, M., O'Bryan, E., Nguyen, D., and Bhalla, K. N. (2001). Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels. Cancer Res *61*, 759-763.

Nomura, T., Mimata, H., Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Miyamoto, E., and Nomura, Y. (2003). The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells. Urol Res *31*, 37-44.

O'Kane, H. F., Watson, C. J., Johnston, S. R., Petak, I., Watson, R. W., and Williamson, K. E. (2006). Targeting death receptors in bladder, prostate and renal cancer. J Urol *175*, 432-438.

Olanow, C. W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007. Mov Disord *22*, S335-S342.

Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D., and Cunha, G. R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. Cancer Res *59*, 5002-5011.

Omezzine, A., Chater, S., Mauduit, C., Florin, A., Tabone, E., Chuzel, F., Bars, R., and Benahmed, M. (2003a). Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. Endocrinology *144*, 648-661.

Omezzine, A., Mauduit, C., Tabone, E., Nabli, N., Bouslama, A., and Benahmed, M. (2003b). Caspase-3 and -6 expression and activation are targeted by hormone action in the rat ventral prostate during the apoptotic cell death process. Biol Reprod *69*, 752-760.

Orlando, M., Chacon, M., Salum, G., and Chacon, D. R. (2000). Low-dose continuous oral fosfestrol is highly active in 'hormone-refractory' prostate cancer. Ann Oncol *11*, 177-181.

Orso, F., Cottone, E., Hasleton, M. D., Ibbitt, J. C., Sismondi, P., Hurst, H. C., and De Bortoli, M. (2004). Activator protein-2gamma (AP-2gamma) expression is specifically induced by oestrogens through binding of the oestrogen receptor to a canonical element within the 5'-untranslated region. Biochem J *377*, 429-438.

O'Shaughnessy, P. J., Willerton, L., and Baker, P. J. (2002). Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. Biol Reprod *66*, 966-975.

Osman, I., Scher, H. I., Drobnjak, M., Verbel, D., Morris, M., Agus, D., Ross, J. S., and Cordon-Cardo, C. (2001). HER-2/neu (p185neu) protein expression in the natural or treated history of prostate cancer. Clin Cancer Res *7*, 2643-2647.

Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science *277*, 815-818.

Pan, G., Ni, J., Yu, G., Wei, Y. F., and Dixit, V. M. (1998). TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. FEBS Lett *424*, 41-45.

Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science *276*, 111-113.

Pandini, G., Genua, M., Frasca, F., Squatrito, S., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2007). 17beta-estradiol up-regulates the insulin-like growth factor receptor through a nongenotropic pathway in prostate cancer cells. Cancer Res *67*, 8932-8941.

Pang, S. T., Dillner, K., Wu, X., Pousette, A., Norstedt, G., and Flores-Morales, A. (2002). Gene expression profiling of androgen deficiency predicts a pathway of prostate apoptosis that involves genes related to oxidative stress. Endocrinology *143*, 4897-4906.

Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. Nature *217*, 370-371.

Parker, T. L., Eggett, D. L., and Christensen, M. J. (2007). Estrogen receptor activation and estrogen-regulated gene expression are unaffected by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. J Nutr Biochem *18*, 746-752.

Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., and Goeddel, D. V. (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. Nature *312*, 724-729.

Petrylak, D. P., Tangen, C. M., Hussain, M. H., Lara, P. N., Jr., Jones, J. A., Taplin, M. E., Burch, P. A., Berry, D., Moinpour, C., Kohli, M., *et al.* (2004). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. N Engl J Med *351*, 1513-1520.

Pfeil, K., Eder, I. E., Putz, T., Ramoner, R., Culig, Z., Ueberall, F., Bartsch, G., and Klocker, H. (2004). Long-term androgen-ablation causes increased resistance to PI3K/Akt pathway inhibition in prostate cancer cells. Prostate *58*, 259-268.

Pienta, K. J., and Bradley, D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. Clin Cancer Res *12*, 1665-1671.

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., *et al.* (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. Nature *396*, 699-703.

Pretlow, T. G., Delmoro, C. M., Dilley, G. G., Spadafora, C. G., and Pretlow, T. P. (1991). Transplantation of human prostatic carcinoma into nude mice in Matrigel. Cancer Res *51*, 3814-3817.

Prins, G. S. (1992). Neonatal estrogen exposure induces lobe-specific alterations in adult rat prostate androgen receptor expression. Endocrinology *130*, 2401-2412.

Prins, G. S., Birch, L., Couse, J. F., Choi, I., Katzenellenbogen, B., and Korach, K. S. (2001). Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alphaERKO and betaERKO mice. Cancer Res *61*, 6089-6097.

Quigley, C. A., De Bellis, A., Marschke, K. B., el-Awady, M. K., Wilson, E. M., and French, F. S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. Endocr Rev *16*, 271-321.

Rahman, F., and Christian, H. C. (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. Trends Endocrinol Metab *18*, 371-378.

Rajcan-Separovic, E., Liston, P., Lefebvre, C., and Korneluk, R. G. (1996). Assignment of human inhibitor of apoptosis protein (IAP) genes xiap, hiap-1, and hiap-2 to chromosomes Xq25 and 11q22-q23 by fluorescence in situ hybridization. Genomics *37*, 404-406.

Rao, M. K., Wayne, C. M., Meistrich, M. L., and Wilkinson, M. F. (2003). Pem homeobox gene promoter sequences that direct transcription in a Sertoli cell-specific, stage-specific, and androgen-dependent manner in the testis in vivo. Mol Endocrinol *17*, 223-233.

Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., *et al.* (1998). Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. Cell Death Differ *5*, 271-288.

Reinhold, W. C., Kouros-Mehr, H., Kohn, K. W., Maunakea, A. K., Lababidi, S., Roschke, A., Stover, K., Alexander, J., Pantazis, P., Miller, L., *et al.* (2003). Apoptotic susceptibility of cancer cells selected for camptothecin resistance: gene expression profiling, functional analysis, and molecular interaction mapping. Cancer Res *63*, 1000-1011.

Riedinger, J.M. L'apport du PSA. Journal d'information médicale n°52 avril 1998 (Article français).

Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., Guseva, N. V., Glover, R. A., Chumakov, P. M., Kravchenko, J. E., and Cohen, M. B. (2005). Androgen regulates apoptosis induced by TNFR family ligands via multiple signaling pathways in LNCaP. Oncogene *24*, 6773-6784.

Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., Guseva, N. V., Glover, R. A., Syrbu, S. I., and Cohen, M. B. (2002). TRAIL-DISC formation is androgen-dependent in the human prostatic carcinoma cell line LNCaP. Cancer Biol Ther *1*, 631-637.

Roth, W., Isenmann, S., Nakamura, M., Platten, M., Wick, W., Kleihues, P., Bahr, M., Ohgaki, H., Ashkenazi, A., and Weller, M. (2001). Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. Cancer Res *61*, 2759-2765.

Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., and Goeddel, D. V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. Cell *83*, 1243-1252.

Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. Embo J *16*, 6914-6925.

Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., and et al. (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Cell *80*, 167-178.

Ruiz de Almodovar, C., Lopez-Rivas, A., and Ruiz-Ruiz, C. (2004). Interferon-gamma and TRAIL in human breast tumor cells. Vitam Horm *67*, 291-318.

Saez, J. M. (1994). Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. Endocr Rev *15*, 574-626.

Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Koksal, I. T., Griffith, T. S., and Sanlioglu, S. (2007a). DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells. Cancer Gene Ther *14*, 976-984.

Sanlioglu, A. D., Koksal, I. T., Ciftcioglu, A., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2007b). Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. J Urol *177*, 359-364.

Sarma, A. V., and Schottenfeld, D. (2002). Prostate cancer incidence, mortality, and survival trends in the United States: 1981-2001. Semin Urol Oncol *20*, 3-9.

Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T., and Ogasawara, K. (2001). Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. Eur J Immunol *31*, 3138-3146.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. Embo J *17*, 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. J Biol Chem *274*, 22532-22538.

Schafer, Z. T., and Kornbluth, S. (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. Dev Cell *10*, 549-561.

Schneider, P., Olson, D., Tardivel, A., Browning, B., Lugovskoy, A., Gong, D., Dobles, M., Hertig, S., Hofmann, K., Van Vlijmen, H., *et al.* (2003). Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). J Biol Chem *278*, 5444-5454.

Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J. L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997). TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. Immunity *7*, 831-836.

Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., *et al.* (2004). Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. Immunity *21*, 415-428.

Schroder, F. H. (1998). Antiandrogens as monotherapy for prostate cancer. Eur Urol *34 Suppl 3*, 12-17.

Screaton, G. R., Mongkolsapaya, J., Xu, X. N., Cowper, A. E., McMichael, A. J., and Bell, J. I. (1997). TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. Curr Biol *7*, 693-696.

Sedger, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C., Kanaly, S. T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., and Gliniak, B. (2002). Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. Eur J Immunol *32*, 2246-2254.

Sedger, L. M., Shows, D. M., Blanton, R. A., Peschon, J. J., Goodwin, R. G., Cosman, D., and Wiley, S. R. (1999). IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. J Immunol *163*, 920-926.

Seethammagari, M. R., Xie, X., Greenberg, N. M., and Spencer, D. M. (2006). EZC-prostate models offer high sensitivity and specificity for noninvasive imaging of prostate cancer progression and androgen receptor action. Cancer Res *66*, 6199-6209.

Seidenfeld, J., Samson, D. J., Hasselblad, V., Aronson, N., Albertsen, P. C., Bennett, C. L., and Wilt, T. J. (2000). Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. Ann Intern Med *132*, 566-577.

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

Shankar, S., Chen, X., and Srivastava, R. K. (2005). Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. Prostate *62*, 165-186.

Shankar, S., Ganapathy, S., Chen, Q., and Srivastava, R. K. (2008). Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. Mol Cancer *7*, 16.

Shankar, S., Singh, T. R., and Srivastava, R. K. (2004). Ionizing radiation enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer in vitro and in vivo: Intracellular mechanisms. Prostate *61*, 35-49.

Shen, R., Sumitomo, M., Dai, J., Harris, A., Kaminetzky, D., Gao, M., Burnstein, K. L., and Nanus, D. M. (2000). Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells is mediated by increased levels of neutral endopeptidase. Endocrinology *141*, 1699-1704.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., *et al.* (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. Science *277*, 818-821.

Shi, X. B., Ma, A. H., Tepper, C. G., Xia, L., Gregg, J. P., Gandour-Edwards, R., Mack, P. C., Kung, H. J., and deVere White, R. W. (2004). Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence. Prostate *60*, 257-271.

Shivapurkar, N., Toyooka, S., Toyooka, K. O., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., Shigematsu, H., Takahashi, T., Parikh, G., Pass, H. I., *et al.* (2004). Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types. Int J Cancer *109*, 786-792.

Siegel, T., Moul, J. W., Spevak, M., Alvord, W. G., and Costabile, R. A. (2001). The development of erectile dysfunction in men treated for prostate cancer. J Urol *165*, 430-435.

Signoretti, S., and Loda, M. (2001). Estrogen receptor beta in prostate cancer: brake pedal or accelerator? Am J Pathol *159*, 13-16.

Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., *et al.* (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell *89*, 309-319.

Sirotnak, F. M., She, Y., Lee, F., Chen, J., and Scher, H. I. (2002). Studies with CWR22 xenografts in nude mice suggest that ZD1839 may have a role in the treatment of both androgen-dependent and androgen-independent human prostate cancer. Clin Cancer Res *8*, 3870-3876.

Skarda, J. (2003). Bioassay of steroid hormone agonist and antagonist activities of anti-androgens on mammary gland, seminal vesicles and spleen of male mice. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med *50*, 204-212.

Smith, D. C., Redman, B. G., Flaherty, L. E., Li, L., Strawderman, M., and Pienta, K. J. (1998). A phase II trial of oral diethylstilbesterol as a second-line hormonal agent in advanced prostate cancer. Urology *52*, 257-260.

Smith, D. S., and Catalona, W. J. (1994). Rate of change in serum prostate specific antigen levels as a method for prostate cancer detection. J Urol *152*, 1163-1167.

Sobel, R. E., and Sadar, M. D. (2005a). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 1. J Urol *173*, 342-359.

Sobel, R. E., and Sadar, M. D. (2005b). Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines--part 2. J Urol *173*, 360-372.

Song, K., Chen, Y., Goke, R., Wilmen, A., Seidel, C., Goke, A., and Hilliard, B. (2000). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. J Exp Med *191*, 1095-1104.

Song, Z., Wu, X., Powell, W. C., Cardiff, R. D., Cohen, M. B., Tin, R. T., Matusik, R. J., Miller, G. J., and Roy-Burman, P. (2002). Fibroblast growth factor 8 isoform B overexpression in prostate epithelium: a new mouse model for prostatic intraepithelial neoplasia. Cancer Res *62*, 5096-5105.

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., and de Jong, S. (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. J Histochem Cytochem *52*, 821-831.

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity *12*, 599-609.

Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Ottilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J.*, et al.* (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. J Biol Chem *272*, 18542-18545.

Stanford, J. L., Feng, Z., Hamilton, A. S., Gilliland, F. D., Stephenson, R. A., Eley, J. W., Albertsen, P. C., Harlan, L. C., and Potosky, A. L. (2000). Urinary and sexual function after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. Jama *283*, 354-360.

Stocco, D. M. (2002). Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Cell Endocrinol *191*, 19-25.

Subong, E. N., Shue, M. J., Epstein, J. I., Briggman, J. V., Chan, P. K., and Partin, A. W. (1999). Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. Prostate *39*, 298-304.

Sun, C., Shi, Y., Xu, L. L., Nageswararao, C., Davis, L. D., Segawa, T., Dobi, A., McLeod, D. G., and Srivastava, S. (2006). Androgen receptor mutation (T877A) promotes prostate cancer cell growth and cell survival. Oncogene *25*, 3905-3913.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. Mol Cell *8*, 613-621.

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. J Biol Chem *273*, 7787-7790.

Takahashi, Y., Perkins, S. N., Hursting, S. D., and Wang, T. T. (2007). 17beta-Estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta- and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. Mol Carcinog *46*, 117-129.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. J Exp Med *195*, 161-169.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. Cell Immunol *214*, 194-200.

Tannock, I. F., de Wit, R., Berry, W. R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K. N., Oudard, S., Theodore, C., James, N. D., Turesson, I.*, et al.* (2004). Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med *351*, 1502-1512.

Tannock, I. F., Osoba, D., Stockler, M. R., Ernst, D. S., Neville, A. J., Moore, M. J., Armitage, G. R., Wilson, J. J., Venner, P. M., Coppin, C. M., and Murphy, K. C. (1996). Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. J Clin Oncol *14*, 1756-1764.

Taplin, M. E., Bubley, G. J., Ko, Y. J., Small, E. J., Upton, M., Rajeshkumar, B., and Balk, S. P. (1999). Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. Cancer Res *59*, 2511-2515.

Taplin, M. E., Bubley, G. J., Shuster, T. D., Frantz, M. E., Spooner, A. E., Ogata, G. K., Keer, H. N., and Balk, S. P. (1995). Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. N Engl J Med *332*, 1393-1398.

Taplin, M. E., and Ho, S. M. (2001). Clinical review 134: The endocrinology of prostate cancer. J Clin Endocrinol Metab *86*, 3467-3477.

Taplin, M. E., Rajeshkumar, B., Halabi, S., Werner, C. P., Woda, B. A., Picus, J., Stadler, W., Hayes, D. F., Kantoff, P. W., Vogelzang, N. J., and Small, E. J. (2003). Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663. J Clin Oncol *21*, 2673-2678.

Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell *74*, 845-853.

Themmen, A. P. N., and Huhtaniemi, I. T. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. Endocr Rev *21*, 551-583.

Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M.*, et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature *386*, 517-521.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. Science *281*, 1312-1316.

Tolcher, A. W., Mita, M., Meropol, N. J., von Mehren, M., Patnaik, A., Padavic, K., Hill, M., Mays, T., McCoy, T., Fox, N. L.*, et al.* (2007). Phase I pharmacokinetic and biologic

correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. J Clin Oncol *25*, 1390-1395.

Tong, X., and Li, H. (2004). eNOS protects prostate cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Cancer Lett *210*, 63-71.

Tostain, J., Rossi, D., and Martin, P. M. (2004). [Physiology of androgens in adult men]. Prog Urol *14*, 639-660.

Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., and Wajant, H. (2006). TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. Oncogene *25*, 7434-7439.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A.*, et al.* (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. J Biol Chem *275*, 23319-23325.

Tsuji, S., Hosotani, R., Yonehara, S., Masui, T., Tulachan, S. S., Nakajima, S., Kobayashi, H., Koizumi, M., Toyoda, E., Ito, D.*, et al.* (2003). Endogenous decoy receptor 3 blocks the growth inhibition signals mediated by Fas ligand in human pancreatic adenocarcinoma. Int J Cancer *106*, 17-25.

Tsujimoto, Y. (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. J Cell Physiol *195*, 158-167.

Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Dang, T. D., Ayala, G. E., and Rowley, D. R. (2002). Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. Cancer Res *62*, 3298-3307.

Tyagi, R. K., Lavrovsky, Y., Ahn, S. C., Song, C. S., Chatterjee, B., and Roy, A. K. (2000). Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. Mol Endocrinol *14*, 1162-1174.

Tyrrell, C. J., Denis, L., Newling, D., Soloway, M., Channer, K., and Cockshott, I. D. (1998). Casodex 10-200 mg daily, used as monotherapy for the treatment of patients with advanced prostate cancer. An overview of the efficacy, tolerability and pharmacokinetics from three phase II dose-ranging studies. Casodex Study Group. Eur Urol *33*, 39-53.

Ueda, T., Bruchovsky, N., and Sadar, M. D. (2002). Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. J Biol Chem *277*, 7076-7085.

Unni, E., Sun, S., Nan, B., McPhaul, M. J., Cheskis, B., Mancini, M. A., and Marcelli, M. (2004). Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. Cancer Res *64*, 7156-7168.

van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Salomons, G. S., Voute, P. A., Pieters, R., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Versteeg, R. (2002). Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. Cancer Res *62*, 2157-2161.

van Weerden, W. M., and Romijn, J. C. (2000). Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. Prostate *43*, 263-271.

Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A. O., and Mulder, E. (1992a). The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. J Steroid Biochem Mol Biol *41*, 665-669.

Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Zegers, N. D., van der Kwast, T. H., Grootegoed, J. A., and Mulder, E. (1992b). Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. Biochemistry *31*, 7422-7430.

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

Viguier-Martinez, M. C., Hochereau de Reviers, M. T., Barenton, B., and Perreau, C. (1983). Endocrinological and histological changes induced by flutamide treatment on the hypothalamo-hypophyseal testicular axis of the adult male rat and their incidences on fertility. Acta Endocrinol (Copenh) *104*, 246-252.

Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinanen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1995). In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet *9*, 401-406.

Volle, D. H., Duggavathi, R., Magnier, B. C., Houten, S. M., Cummins, C. L., Lobaccaro, J. M., Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. Genes Dev *21*, 303-315.

Von Ahsen, O., Waterhouse, N. J., Kuwana, T., Newmeyer, D. D., and Green, D. R. (2000). The 'harmless' release of cytochrome c. Cell Death Differ *7*, 1192-1199.

Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (2000). ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. Curr Biol *10*, 1359-1366.

Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T.*, et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. Nat Med *5*, 157-163.

Walker, W. H., and Cheng, J. (2005). FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. Reproduction *130*, 15-28.

Wallach, D., Arumugam, T. U., Boldin, M. P., Cantarella, G., Ganesh, K. A., Goltsev, Y., Goncharov, T. M., Kovalenko, A. V., Rajput, A., Varfolomeev, E. E., and Zhang, S. Q. (2002). How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF-kappaB activation by members of the TNF/NGF receptor family. Arthritis Res *4 Suppl 3*, S189-196.

Waller, A. S., Sharrard, R. M., Berthon, P., and Maitland, N. J. (2000). Androgen receptor localisation and turnover in human prostate epithelium treated with the antiandrogen, casodex. J Mol Endocrinol *24*, 339-351.

Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M., Yao, X., Puck, J. M., Straus, S. E., and Lenardo, M. J. (1999). Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. Cell *98*, 47-58.

Wang, M., Liu, Y., Liu, S., and Zheng, D. (2004). 8-Chloro-adenosine sensitizes a human hepatoma cell line to TRAIL-induced apoptosis by caspase-dependent and -independent pathways. Oncol Rep *12*, 193-199.

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.

Weldon, V. E., Tavel, F. R., and Neuwirth, H. (1997). Continence, potency and morbidity after radical perineal prostatectomy. J Urol *158*, 1470-1475.

Wen, Y., Hu, M. C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D. H., and Hung, M. C. (2000). HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. Cancer Res *60*, 6841-6845.

White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. Genes Dev *10*, 1-15.

Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. Immunity *3*, 673-682.

Wilson, M. J., and Sinha, A. A. (1997). Human prostate tumor angiogenesis in nude mice: metalloprotease and plasminogen activator activities during tumor growth and neovascularization of subcutaneously injected matrigel impregnated with human prostate tumor cells. Anat Rec *249*, 63-73.

Wirth, M. P., See, W. A., McLeod, D. G., Iversen, P., Morris, T., and Carroll, K. (2004). Bicalutamide 150 mg in addition to standard care in patients with localized or locally

advanced prostate cancer: results from the second analysis of the early prostate cancer program at median followup of 5.4 years. J Urol *172*, 1865-1870.

Wirtzfeld, L. A., Wu, G., Bygrave, M., Yamasaki, Y., Sakai, H., Moussa, M., Izawa, J. I., Downey, D. B., Greenberg, N. M., Fenster, A., *et al.* (2005). A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. Cancer Res *65*, 6337-6345.

Wise, G. J., Marella, V. K., Talluri, G., and Shirazian, D. (2000). Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. J Urol *164*, 722-725.

Wu, J. D., Haugk, K., Woodke, L., Nelson, P., Coleman, I., and Plymate, S. R. (2006). Interaction of IGF signaling and the androgen receptor in prostate cancer progression. J Cell Biochem *99*, 392-401.

Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature *284*, 555-556.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol *68*, 251-306.

Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol *142*, 67-77.

Xu, X. F., Zhou, S. W., Zhang, X., Ye, Z. Q., Zhang, J. H., Ma, X., Zheng, T., and Li, H. Z. (2006). Prostate androgen-regulated gene: a novel potential target for androgen-independent prostate cancer therapy. Asian J Androl *8*, 455-462.

Yamaguchi, Y., Shiraki, K., Fuke, H., Inoue, T., Miyashita, K., Yamanaka, Y., Saitou, Y., Sugimoto, K., and Nakano, T. (2005). Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death. Oncol Rep *14*, 1311-1316.

Yang, L., Wang, L., Lin, H. K., Kan, P. Y., Xie, S., Tsai, M. Y., Wang, P. H., Chen, Y. T., and Chang, C. (2003). Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun *305*, 462-469.

Yeh, S., Lin, H. K., Kang, H. Y., Thin, T. H., Lin, M. F., and Chang, C. (1999). From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 5458-5463.

Yeh, S., Miyamoto, H., Shima, H., and Chang, C. (1998). From estrogen to androgen receptor: a new pathway for sex hormones in prostate. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 5527-5532.

Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. Nature *369*, 321-323.

Yoshida, T., Kinoshita, H., Segawa, T., Nakamura, E., Inoue, T., Shimizu, Y., Kamoto, T., and Ogawa, O. (2005). Antiandrogen bicalutamide promotes tumor growth in a novel androgen-dependent prostate cancer xenograft model derived from a bicalutamide-treated patient. Cancer Res *65*, 9611-9616.

Yoshimoto, M., Cutz, J. C., Nuin, P. A., Joshua, A. M., Bayani, J., Evans, A. J., Zielenska, M., and Squire, J. A. (2006). Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. Cancer Genet Cytogenet *169*, 128-137.

Youngblood, G. L., and Payne, A. H. (1992). Isolation and characterization of the mouse P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17): transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MA-10 Leydig cells. Mol Endocrinol *6*, 927-934.

Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1992). The Caenorhabditis elegans cell death gene ced-4 encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. Development *116*, 309-320.

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell *75*, 641-652.

Yuan, T. C., Veeramani, S., and Lin, M. F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. Endocr Relat Cancer *14*, 531-547.

Zaccheo, T., Giudici, D., Panzeri, A., and di Salle, E. (2000). Combined treatment of Dunning R3327 rat prostatic tumor with the 5alpha-reductase inhibitor PNU 157706 and the antiandrogen bicalutamide. Cancer Chemother Pharmacol *45*, 31-37.

Zhan, P., Lee, E. C., Packman, K., and Tenniswood, M. (2002). Induction of invasive phenotype by Casodex in hormone-sensitive prostate cancer cells. J Steroid Biochem Mol Biol *83*, 101-111.

Zhang, J., Thomas, T. Z., Kasper, S., and Matusik, R. J. (2000). A small composite probasin promoter confers high levels of prostate-specific gene expression through regulation by androgens and glucocorticoids in vitro and in vivo. Endocrinology *141*, 4698-4710.

Zhang, X., Jin, T. G., Yang, H., DeWolf, W. C., Khosravi-Far, R., and Olumi, A. F. (2004). Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer. Cancer Res *64*, 7086-7091.

Zhou, B. P., Hu, M. C., Miller, S. A., Yu, Z., Xia, W., Lin, S. Y., and Hung, M. C. (2000). HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. J Biol Chem *275*, 8027-8031.

Zhu, Y. S., Cai, L. Q., Huang, Y., Fish, J., Wang, L., Zhang, Z. K., and Imperato-McGinley, J. L. (2005). Receptor isoform and ligand-specific modulation of dihydrotestosterone-induced prostate specific antigen gene expression and prostate tumor cell growth by estrogens. J Androl *26*, 500-508; discussion 509-510.

Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. Biochim Biophys Acta *1551*, F1-37.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell *90*, 405-413.

RESUME

L'hormonothérapie permet une régression du cancer de la prostate métastatique par apoptose des cellules tumorales. L'évolution inéluctable de la maladie vers un stade hormono-indépendant et apoptose-résistant souligne l'importance de l'étude des gènes androgéno-sensibles impliqués dans l'apoptose de la prostate normale et pathologique, tels que le ligand TRAIL et ses récepteurs DR4 et DR5 pro et, DcR1 et DcR2 anti-apoptotiques.
Nous rapportons une corrélation entre la régulation du récepteur DcR2, le statut hormonal et l'apoptose dans la prostate de rat et dans la lignée humaine hormonosensible de cancer prostatique, LNCaP. Nous montrons que l'expression de DcR2 joue un rôle régulateur de l'apoptose TRAIL-induite dans la cellule LNCaP. Enfin, dans un modèle de cancer prostatique humain hormonosensible greffé chez la souris nude traitée par un anti-androgène nous montrons l'expression des récepteurs au TRAIL, et de certains gènes renseignant sur la relation entre croissance tumorale et statut hormonal.

English title

Study of TRAIL ligand and receptors in normal and cancer prostate related to hormonal state

English summary

Hormonotherapy is used to control metastatic prostate cancer by apoptosis induction. However, tumours will always escape to androgen deprivation leading to apoptosis resistance. This explains the importance of studying relations between androgen sensitive genes involved in prostate apoptosis. In this thesis, we focused on TRAIL ligand and its death (DR4, DR5) and decoy receptors (DcR1, DcR2). We show an androgen regulation of DcR2 receptor expression in rat ventral prostate and in androgen-sensitive prostate carcinoma cell line LNCaP. We report that hormone modulation of DcR2 expression plays a role as a regulator of TRAIL-induced apoptosis in LNCaP cells. Finally, we report the TRAIL-receptors expression in an experimental model of human prostate cancer xenografted in mice with an anti-androgen treatment. In this model we report also androgen sensitive genes expression to understand the relation between tumour growth and hormonal background.

Keywords: apoptosis, TRAIL, death receptor, prostate, cancer, androgen

DISCIPLINE
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

MOTS-CLES
Apoptose, TRAIL, Récepteurs de mort, Prostate, Cancer, Androgènes

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :
INSERM U407-Communications cellulaires en biologie de la Reproduction
Faculté de médecine Lyon-Sud
BP12 69921 Oullins Cedex