Journal de la Société de Biologie, 196 (2), 223-239 (2002)

Récepteur des androgènes : Pathologie moléculaire

Ch. Sultan[1-2], J. Gobinet[2], B. Terouanne[2], F. Paris[2], Ch. Belon[2], S. Jalaguier[2], V. Georget[2], N. Poujol[2], G. Auzou[2] et S. Lumbroso[2]

[1]*Unité d'Endocrinologie-Gynécologie Pédiatriques, Service de Pédiatrie I, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHU Montpellier*
[2]*Service d'Hormonologie (Développement et Reproduction), Hôpital Lapeyronie et INSERM U. 439 (Pathologie Moléculaire des Récepteurs Nucléaires), CHU Montpellier*

Adresse pour correspondance : Professeur Charles SULTAN, INSERM U.439, Pathologie Moléculaire des Récepteurs Nucléaires, 70 Rue de Navacelles, 34100 MONTPELLIER, Tél. : 04 67 33 86 96, Fax : 04 67 33 83 27, e-mail : ch.sultan@u439.montp.inserm.fr

Reçu le 2 juillet 2002

RÉSUMÉ

Les androgènes sont responsables de la différenciation, du développement et du maintien du phénotype masculin en participant à la régulation de nombreux organes androgéno-dépendants, à travers un récepteur nucléaire, le récepteur des androgènes (RcA). Après liaison de la testostérone ou de la dihydrotestosterone, le RcA se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques et active la transcription de gènes-cibles. Des progrès considérables ont été accomplis dans les domaines moléculaires et structuraux du RcA comme dans celui de la régulation transcriptionnelle des gènes androgéno-régulés. Ils permettent d'envisager une meilleure approche de la relation structure/fonction du RcA à partir de l'analyse moléculaire des syndromes d'insensibilité aux androgènes (l'étiologie la plus fréquente des pseudo-hermaphrodismes masculins), des cancers de la prostate hormono-résistants, de l'amyotrophie spino-bulbaire (Maladie de Kennedy), de stérilité isolée.

La génétique moléculaire permet aujourd'hui d'affirmer le diagnostic de l'une de ces affections par l'identification d'une mutation du gène du RcA, par la confirmation de ses conséquences *in vitro* après reconstruction de la mutation, par l'analyse tri-dimensionnelle du RcA et des conséquences de la mutation sur la structure du RcA.

Dans le domaine des insensibilités aux androgènes, l'absence d'identification de mutation du RcA a fait envisager la responsabilité d'anomalie de cofacteurs transcriptionnels. Dans ce sens, l'analyse du profil d'expression de ces cofacteurs couplée à l'expertise de la fonctionnalité du RcA endogène sur fibroblastes du patient s'avère prometteuse. En réalité, la mise en évidence de gènes-cibles (au niveau des organes génitaux externes) constituera l'étape fondamentale pour évaluer le degré de l'action cellulaire et moléculaire des androgènes.

SUMMARY

Androgens play a crucial role in the development, maintenance and regulation of male phenotype and reproductive physiology through the androgen receptor, a transcription factor.

Testosterone or dihydrotestosterone binding induces a transconformation of the androgen receptor and allows its translocation into the nucleus, where it recognizes specific DNA sequences. Recent developments in molecular genetics, as well as structural analysis of the androgen receptor, allow a better understanding of the structure/function relationship of this nuclear receptor. Molecular analyses of androgen insensitivity syndrome, as well as hormone-resistant prostate cancer, Kennedy's disease and isolated male infertility, have been proved useful as privileged models for this purpose.

In the absence of identified AR receptor mutations in androgen insensitivity syndromes, abnormalities of transcriptional cofactor should be considered. Finally, identification of androgen-dependent genes will be helpful for evaluating the degree of the molecular defect of androgen action within target cells.

Les androgènes sont responsables de la différenciation, du développement, du maintien du phénotype masculin, et participent à la croissance, au développement et à l'activité d'une grande variété de types cellulaires ou d'organes. Ces effets sont médiés par un récepteur nucléaire qui, après liaison de la testostérone (T) ou dihydrotestostérone (DHT), se fixe sur des séquences d'ADN spécifiques, en amont de gènes cibles, et active (ou réprime) la transcription de ces derniers. Nous rapporterons d'abord les progrès récents observés dans les domaines moléculaires et structuraux du récepteur des androgènes (RcA) et des récepteurs nucléaires en général. Nous préciserons ensuite les différentes étapes conduisant à l'activation transcriptionnelle de gènes androgéno-régulés.

Toute altération de l'une des étapes de cette transmission du message androgénique peut conduire au développement d'anomalies aussi diverses que le syndrome d'insensibilité aux androgènes (1), des processus néoplasiques (cancer de la prostate et cancer du sein chez l'homme) une atteinte neuro-dégénérative (maladie de Kennedy) ou une stérilité isolée. Ces affections représentent de véritables " modèles expérimentaux " qui contribuent à mieux cerner le mécanisme d'action des androgènes au sein de leurs tissus cibles.

L'une de ces affections, le syndrome d'insensibilité aux androgènes, représente plus de la moitié des cas de pseudo-hermaphrodisme masculin (2). Son expression clinique est très variable, allant d'un phénotype féminin complet à un phénotype masculin avec ou sans ambiguïté sexuelle (pour revue, *voir* (3). La génétique moléculaire permet aujourd'hui d'affirmer le diagnostic de l'affection par l'identification de mutations du gène du récepteur des androgènes, mais elle contribue encore assez peu à la prise en charge thérapeutique et pronostique de l'affection. Sera-t-il possible à terme, après avoir identifié une mutation en période néonatale, de prédire le phénotype en période pubertaire, et donc guider le choix du sexe d'orientation d'un nouveau-né porteur d'une ambiguité génitale ?

Cet aspect essentiel, comme celui du rôle du RcA dans le développement du cancer de la prostate, du cancer du sein chez l'homme et de la maladie de Kennedy, ne pourra être envisagé qu'après avoir établi une carte structure-fonction détaillée du récepteur des androgènes, précisé ses multiples partenaires et élucidé le mode d'action cellulaire et moléculaire des androgènes.

1. ACTION CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE DES ANDROGENES

1.1. Le récepteur des androgènes

Le récepteur des androgènes (RcA) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend :

– les récepteurs d'hormones stéroïdes, androgènes (RcA A et isoforme B), glucocorticoïdes (GRα, β), minéralocorticoïdes (MR), progestérone (PRα, β) et œstrogènes (ERα, β) ;

– les récepteurs de différents ligands hydrophobes tels que les hormones thyroïdiennes (TRa, b), l'acide rétinoïque (RRcA α, β, γ et RXR α, β, γ)

– les récepteurs activant la prolifération des peroxysomes (PPAR) ;

– de nombreux récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand spécifique n'est identifié (pour revue, voir (4)

Le RcA est organisé, comme l'ensemble des récepteurs nucléaires, selon une structure modulaire avec des domaines fonctionnels interchangeables (figure 1 : b, c) :

– le domaine amino-terminal impliqué dans l'activation de la transcription (AF1) et participant à la spécificité d'action tissulaire et cellulaire ;

– le domaine central de liaison à l'ADN (DBD pour DNA-binding domain), fortement conservé au sein de la superfamille. Il participe aussi au processus de dimérisation ;

– le domaine charnière abritant un signal de localisation nucléaire (NL1, pour nuclear localization) ;

– le domaine carboxy-terminal responsable de la liaison de l'hormone (LBD, pour ligand binding domain) mais possédant également une surface d'interaction pour les protéines de choc thermique (hsp), une fonction de transactivation dépendant de la liaison du ligand (AF2), une surface impliquée dans les processus de dimérisation et un signal de localisation nucléaire hormono-dépendant (NL2).

1.2. Le gène du RcA

Le gène du RcA est situé sur le chromosome X, en position qll-ql2 et s'étend sur environ 90 kb (figure 1 : a). Le cadre ouvert de lecture comprend 8 exons et s'étend sur 2,7 kb. Plusieurs isoformes d'ARNm ont été décrites chez l'homme.

Exprimé dans la plupart des tissus, le RcA présente un taux d'expression variant d'un facteur 2 à 3. En outre, de profondes différences d'expression peuvent être observées (5) au sein d'une même cellule, en fonction du développement ou de l'âge. Le promoteur du RcA ne possède pas de boîtes TATA, ni CAAT. En revanche, il possède un élément de réponse à l'AMPc, des sites potentiels de liaison pour une vingtaine de facteurs transcriptionnels tels que SRY, SF1, le RcA lui-même, ER ou encore NFκB. Deux sites de liaison du RcA ont aussi été décrits dans l'exon 5 (6]. Enfin, nous avons observé une régulation biphasique de l'expression de l'ARNm du récepteur des androgènes par les androgènes (7).

Rappelons qu'au niveau de certains tissus androgéno-dépendants (organes génitaux externes, prostate, glande sébacée...), la 5α-réductase (5α-R), enzyme membranaire microsomale, NADPH-dépendante assure la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT). Deux gènes différents codant pour deux enzymes différentes ont été identifiés. Ces deux enzymes, 5α-R de type 1 et de type 2, bien qu'exerçant la même activité

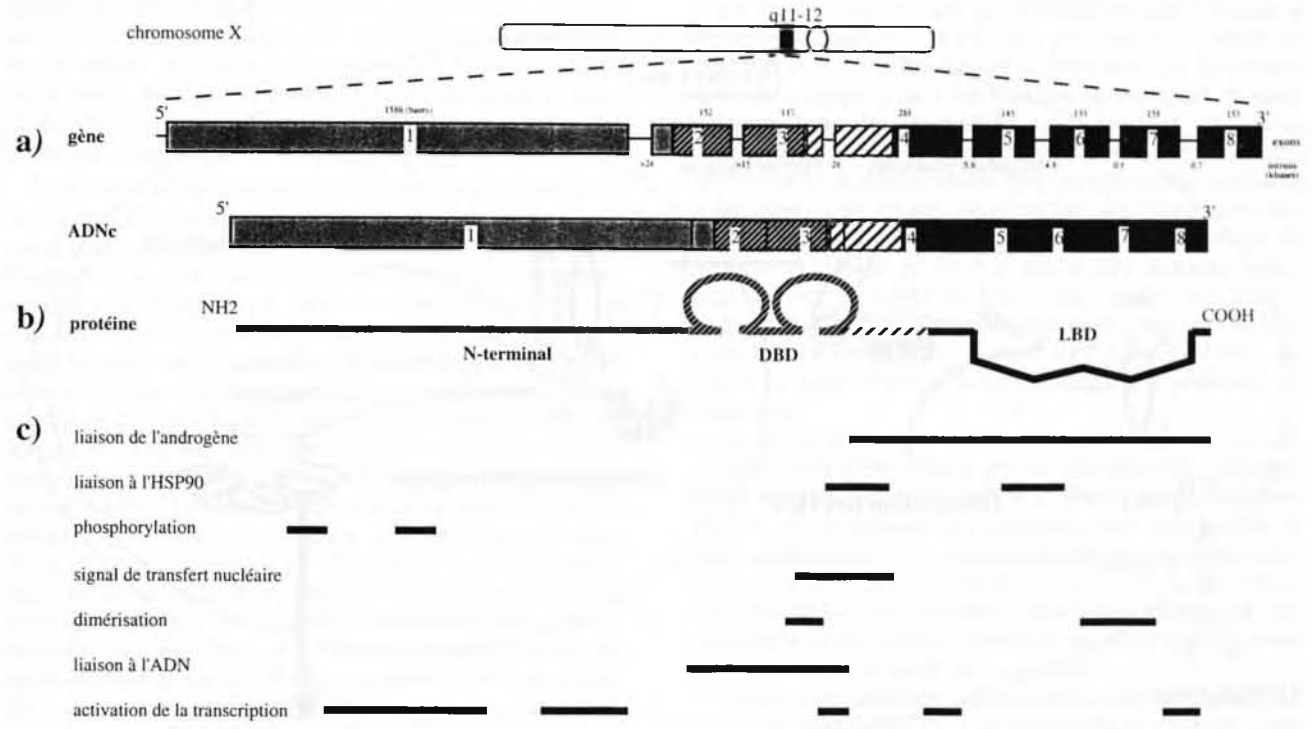

FIG 1. – Organisation fonctionnelle du RcA.

enzymatique sur les mêmes substrats, ne présentent qu'environ 50 % d'homologie de composition en acides aminés. Elles se distinguent :

– par un pH optimal d'activité (basique pour le type 1, acide pour le type 2)

– et par leur distribution tissulaire et l'ontogenèse de leur expression. La 5αR de type 1 est essentiellement exprimée dans le foie, la peau non génitale et le follicule pilo-sébacé, alors que la 5αR de type 2 est retrouvée au niveau des organes génitaux externes masculins et la peau génitale.

1.3. Les différentes étapes de l'action cellulaire et moléculaire (Fig. 2)

1.3.1. La liaison de l'hormone

L'existence de divers domaines structuraux au sein des récepteurs des stéroïdes a été révélée par des expériences de protéolyse ménagée. La résolution des structures tridimensionnelles des LBD de plusieurs récepteurs de la superfamille en l'absence de ligand (apo-), en présence d'agoniste (holo-), d'antagoniste ainsi que la prédiction d'une architecture générale commune à tous les LBD ont par la suite considérablement accru nos connaissances en matière d'activation des récepteurs nucléaires.

Tous ces LBDs présentent donc une architecture comparable avec 12 hélices α (H1 à H12) et un feuillet ß (S1/S2). Les hélices H4, 5, 6, 8, 9 sont prises en sandwich entre H1, 2 et 3 d'une part et H7, 10 et 11 d'autre part.

L'ensemble de ces structures a révélé une extrême conservation de la poche de liaison, le ligand étant scellé au cœur de la molécule sans accès possible. Cette poche est principalement composée de résidus issus de H3, de H5, boucle L7-8, H8, H11, H12 et de S1/S2. Les ligands sont reconnus par 2 types de contacts : liaisons hydrogènes aux extrémités et liaisons hydrophobes de type van der Waals pour tout le corps du ligand. La poche est en effet tapissée de résidus dont le caractère hydrophobe est complémentaire du caractère apolaire des ligands et quelques rares résidus polaires assurent l'ancrage et la sélectivité de reconnaissance (fig. 3, d'après (53).

L'importance d'un motif en position carboxy-terminale du LBD, dénommé AF2-AD, dans les phénomènes d'activation transcriptionnelle a été démontrée par mutagenèse dirigée bien avant la résolution des structures tridimensionnelles. Or, la comparaison des structures apo- et holo- de RRcAγ et RXRα a révélé un positionnement différent de certains éléments structuraux, notamment de la dernière hélice α, H12, conduisant Renaud et coll. (8) à proposer un mécanisme d'activation commun à tous les récepteurs nucléaires, le " piège à souris ".

Pour schématiser, après la liaison du ligand, H12 va adopter l'une des deux (au moins) positions stables, conformément aux caractéristiques de liaison du ligand. Alors que le positionnement agoniste actif de H12 génère une surface favorisant le recrutement de co-acti-

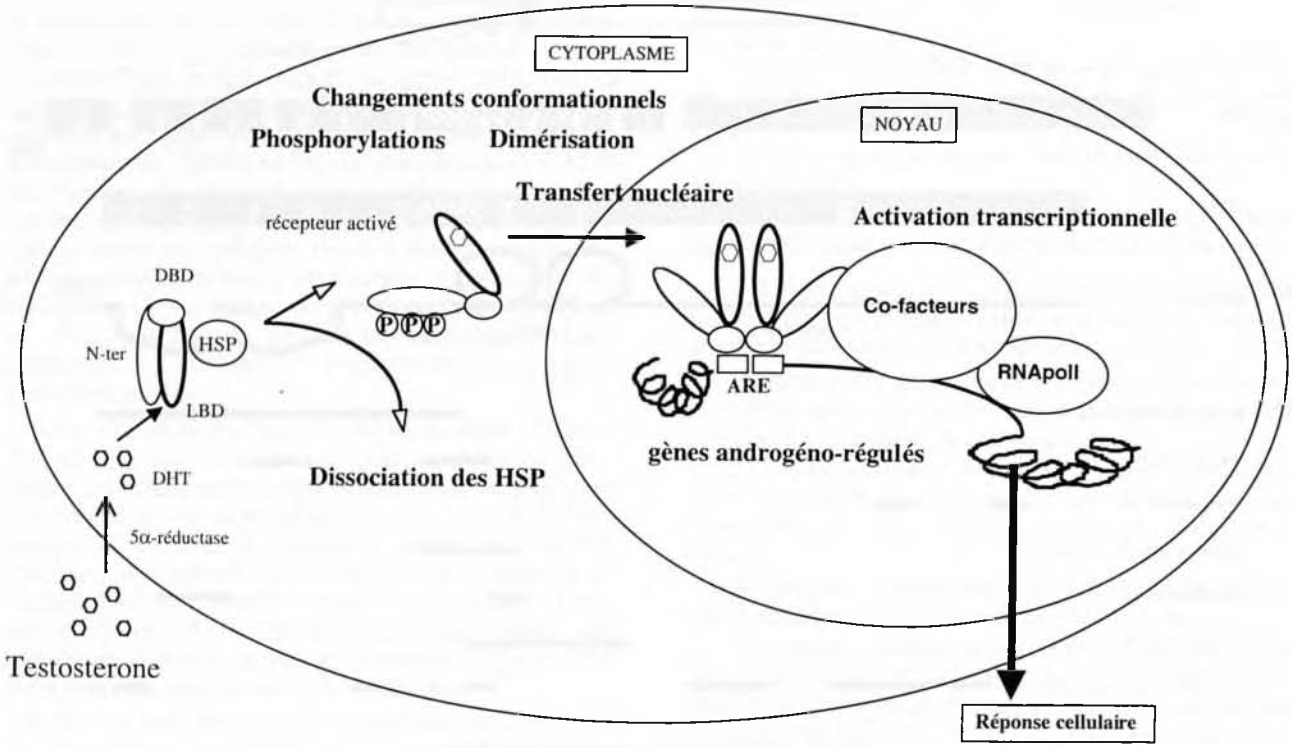

FIG 2. – Les différentes étapes du mécanisme d'action des androgènes.

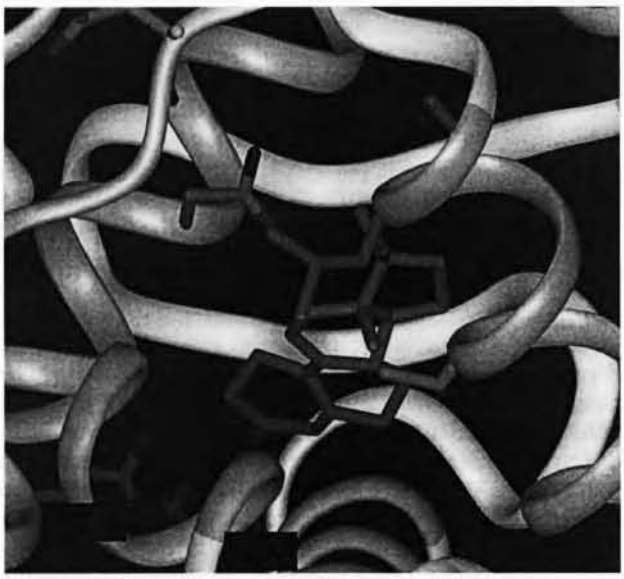

FIG 3. – Représentation tri-dimensionnelle de la poche de liaison des androgènes duRcA.

vateurs, tout autre positionnement modifie la forme et la distribution de charges de cette surface de reconnaissance, empêchant tout ou partie du recrutement. Donc, tout ligand induisant une position de H12 non holo va agir plus ou moins comme un antagoniste.

1.3.2. ACTIVATION ET TRANSLOCATION NUCLÉAIRE

L'ancrage du ligand dans la poche, et les modifications de conformation induites, représentent les premières étapes de l'activation du récepteur des androgènes. Les étapes ultérieures visent à transformer ce récepteur cytoplasmique en l'absence d'hormone, formant un complexe avec des protéines de choc thermique (hsp), en facteur transcriptionnel nucléaire actif, donc capable de se lier à l'ADN et d'enclencher la transcription.

En l'absence de ligand, le RcA est extrait des cellules sous la forme d'hétérocomplexes de masse moléculaire importante (250-300 kDa) ayant un coefficient de sédimentation d'environ 10 secondes.

En présence de ligand, les protéines formant ce complexe se dissocient, le RcA sédimente à 4 à 5 s et acquiert la capacité de se lier à l'ADN. De nombreuses protéines constituant cet hétérocomplexe ont déjà été identifiées, telles que hsp90, hsp70 et FKBP52 (9).

Hsp 90 se lie au LBD, et permet le maintien d'une conformation du RcA apte à lier l'hormone. Hsp 70, cytoplasmique, se lie très rapidement aux protéines en cours de synthèse et participe à l'assemblage d'oligomères. Un monomère d'hsp70 interagit directement avec le LBD du RcA, contrairement à FKBP52, associée aux hsp90 avec Le RcA, le PR, le GR, et l'ER dans l'hétérocomplexe.

La vitesse de dissociation des hsp correspond à la vitesse d'apparition d'un récepteur apte à lier l'ADN. Le

départ des hsp démasque le LBD, les sites de dimérisation et le signal de localisation nucléaire. Les techniques de protéolyse ménagée ont permis de démontrer l'acquisition d'une structure plus compacte du récepteur et d'appréhender les modifications de conformation induites par la liaison d'agonistes ou d'antagonistes (10).

La fixation d'androgènes s'accompagne d'une augmentation de la phosphorylation du récepteur, selon un processus commun aux récepteurs des stéroïdes et à d'autres facteurs de transcription. A l'état inactif, le récepteur est déjà phosphorylé, mais cette hyperphosphorylation concerne de nouveaux sites (11). Le rôle des phosphorylations dans l'activation des récepteurs nucléaires n'est pas clairement défini, mais plusieurs travaux tendent à démontrer son importance, même en l'absence de ligand, notamment dans l'activation de kinases dépendantes des cyclines et de MAP-kinases par des facteurs de croissance. Ainsi les phosphorylations de sérines spécifiques du domaine d'activation AF1 de ERβ (12) et de SF1 (13) induites par les MAPK, aboutissent au recrutement de co-activateurs et à une activation transcriptionnelle. Le contrôle des récepteurs nucléaires par ces phosphorylations reste tout de même mal connu, puisqu'en particulier leur spécificité d'action n'est pas clairement démontrée, leurs rôles physiologiques demeurant ainsi hypothétiques.

Le transfert nucléaire est sélectif, actif et nécessite un ou plusieurs NLS. La première étape de ce transtert est la liaison de la protéine aux pores nucléaires. Cette étape est indépendante de l'énergie, contrairement à la deuxième étape de translocation à travers les pores nucléaires. L'utilisation de deux inhibiteurs de synthèse d'ATP (désoxyglucose et azide de sodium) nous a permis de bloquer l'entrée dans le noyau d'une protéine de fusion GFP-RcA, démontrant clairement cette dépendance énergétique. Aujourd'hui, nous savons que le transport nucléaire est relayé par des récepteurs saturables qui effectuent un mouvement de va-et-vient entre le cytoplasme et le noyau (pour revue, *voir* (14)).

1.3.3. La liaison à l'ADN

L'effet hormonal nécessite la liaison du récepteur à de courtes séquences d'ADN mises en évidence principalement au niveau de la région promotrice de gènes cibles et appelées hormone responsive element (HRE). Afin d'identifier une séquence spécifique du RcA, ou ARE, Roche *et al.* (15) ont utilisé un ensemble d'oligonucléotides et une protéine composée du seul DBD de RcA. L'ARE alors sélectionné présente la séquence consensus GG (A/T) ACAnnnTGTTCT, très proche de la séquence consensus du GR. Tout ARE détecté coïncide avec un GRE, confortant la notion selon laquelle GR/AR/PR/M. reconnaissent la même séquence, même si pour un certains nombre de gènes (mouse vas deferens protein, secretory component...) le RcA semble plus efficace que le GR (16, 17). Ceci soulève immédiatement le problème de la spécificité d'action dans les cellules exprimant les divers récepteurs.

La majeure partie des connaissances acquises sur le DBD des récepteurs nucléaires provient des études de GR, ER et RXR. Huit des neuf cystéines qui le composent sont engagées dans des liaisons tétraédriques de coordination avec des atomes de zinc, formant ainsi deux structures en doigt de zinc (18). Toutes ces structures présentent une organisation tridimensionnelle similaire, reflet de la très haute conservation des séquences primaires. Nous avons ainsi pu construire par homologie un modèle du DBD de RcA à partir des connaissances acquises sur le DBD de GR. Nous observons ainsi 2 monomères se liant à chacun des demi-sites, tête-à-tête. L'orientation est telle que la boîte P (G577SCKV581), qui assure la spécificité de reconnaissance, est présentée au demi-site.

La triple approche clinique-modèle in silico-expérimentation in vitro nous a permis de démontrer l'importance des résidus V581 et R585* dans l'interaction avec l'ADN, et de préciser les répercussions structurales de leur substitution (19). Une approche en tout point identique pour les substitutions R607Q et R608K, identifiées dans des IPA et des cancers du sein chez l'homme, a mis en évidence une surface d'interaction potentielle au sommet du deuxième doigt de zinc (20).

Il est communément admis que les récepteurs des stéroïdes se lient à l' ADN sous forme d'homodimères. Ceci semble s'expliquer par la formation d'un pont salin entre deux résidus, strictement conservés dans le RcA, le GR, le MR, le PR (R598 et D600 pour le RcA). La formation d'hétérodimères GR/RcA (21) a cependant été rapportée, mais avec des capacités transcriptionnelles contradictoires et sans aucune comparaison avec le rôle-clé de l'hétérodimérisation dans la régulation transcriptionnelle d'autres membres de la superfamille, tels que RXR qui interagit avec plusieurs récepteurs (RAR, TR, VDR, PPAR...).

D'autres régions du récepteur participent aussi à la dimérisation. Ainsi, un récepteur tronqué de la partie A/B présente une capacité de dimérisation plus faible que la protéine entière (22), alors que la fonction majeure de dimérisation de l'ER se situe au niveau du LBD, notamment par l'intermédiaire de H10.

1.4. Régulation de la transcription

La transcription de gènes cibles du RcA nécessite la liaison préalable du récepteur sur ses éléments de réponse (*cf.* 1.3.3). Cette liaison lui permettra de recruter directement ou indirectement les effecteurs de la transcription du gène cible, l'ensemble des composants de la machinerie transcriptionnelle et particulièrement la RNA polymérase II (RNAP II) chez les mammifères. L'ADN n'étant pas toujours sous sa forme accessible, c'est à dire décondensé, il est nécessaire que des cofacteurs transcriptionnels se liant aux récepteurs nucléaires interviennent. Ces derniers, par leur activité enzymatique, (par exemple les acétylases) vont permettre une décompaction locale de l'ADN autour des histones et par là même faciliter l'accès à la RNAP II vers le promoteur du gène cible. Ces cofacteurs interagissent aussi bien avec les récepteurs nucléaires qu'avec la machine-

rie transcriptionnelle formant un pont et modulant la transcription.

1.4.1. Interactions directes

Les premières études de la transcription dans un système acellulaire ont montré que les récepteurs des stéroïdes augmentaient la formation du complexe de préinitiation. Mc Ewan et coll (23) ont récemment démontré que la transactivation induite par le RcA implique le recrutement direct de la machinerie transcriptionnelle de base *via* TFIIF. Des interactions in vitro mais aussi dans des systèmes cellulaires entre le domaine amino terminal de RcA et TFIIF ont été observées.

A côté de ces interactions directes entre récepteur des stéroïdes et complexe d'initiation de la transcription, des interactions indirectes relayées par des facteurs intermédiaires de transcription ou coactivateurs, sont décrites.

1.4.2. Interactions indirectes

L'utilisation des techniques de double-hybride dans la levure ainsi que la mise en évidence d'interaction directe entre protéines par Far Western blotting, utilisant comme sonde des protéines hybrides correspondant aux LBD de différents récepteurs couplés à la GST (Glutation S transférase) ont permis l'isolement et la caractérisation de nombreux cofacteurs impliqués dans la modulation transcriptionnelle de le RcA.

En effet, on considère qu'une balance activateurs/inhibiteurs variables en fonction des tissus, favoriserait une réponse cellulaire spécifique à une hormone donnée. Ces cofacteurs sont organisés dans des complexes multiprotéiques qui permettent de faciliter l'accès des récepteurs nucléaires et de la machinerie transcriptionnelle vers leurs gènes cibles en remodelant la chromatine et l'organisation des histones. Nombre de ces cofacteurs interagissent non seulement avec les récepteurs nucléaires mais aussi avec d'autres facteurs de transcription (24). Parmi ces cofacteurs, différentes classes ont été décrites, elles comprennent la famille des p160, CBP/p300, les complexes pCAF/GCN5 et TRAP/DRIP activateurs ainsi que les complexes NCoR/Sin3/RPD3 inhibiteurs comprenant de nombreuses protéines possédant ou non des activités variées telles que des acétylases/désacétylases, des méthylases et des kinases/phosphatases. Le niveau de transcription de gènes régulés par les androgènes pourrait dépendre de l'équipement des cellules cibles en cofacteurs transcriptionnels, capables de moduler l'activité transcriptionnelle du RcA. Le nombre de coactivateurs ou coinhibiteurs des récepteurs nucléaires (25) rend difficile la compréhension de leur rôle physiologique.

1.4.2.1. Les coactivateurs

Parmi les coactivateurs décrits pour le RcA (Tableau. 1), deux d'entre eux récemment isolés, FHL2 (Four and an Half Lim-only protein 2) et PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated STAT-1), semblent, par leur spécificité d'action et d'expression, être de bons acteurs du contrôle spécifique de l'action du RcA dans une cellule cible donnée.

FHL2, isolé par la méthode de double hybride, est une protéine de 32 kDa qui possède une capacité de transactivation intrinsèque (26). Les tests d'interaction *in vitro* démontrent que FHL2 interagit directement avec le RcA. Les investigations *in vivo*, sur des promoteurs naturels, démontrent que FHL2 augmente l'activité transcriptionnelle du RcA de manière significative en présence de ligand agoniste. Par contre, FHL2 n'a aucun effet sur le MR, le PR et sur le GR qui appartiennent tous à la famille des récepteurs stéroïdes. FHL2 semble, à ce jour, être le premier coactivateur spécifique du RcA.

Les analyses structure-fonction ont permis de démontrer que la partie amino terminale et la partie carboxy terminale du récepteur sont nécessaires pour l'interaction entre FHL2 et RcA. La délétion de l'hélice H12 du LBD du RcA contenant le domaine AF-2 entraîne une incapacité de RcA à interagir avec FHL2. Le LBD est, certes, nécessaire mais pas suffisant à l'interaction : la délétion de la partie amino terminale du récepteur abolit l'interaction FHL2-RcA. Il est vraisemblable que les parties amino et carboxy terminales du récepteur génèrent une surface d'interaction avec le coactivateur. Il est à noter que, contrairement à la famille des p160 qui interagissent avec la partie LBD du RcA par l'intermédiaire de motifs LXXLL (27, 28), FHL2 ne possède pas de tels motifs. Les motifs du RcA impliqués dans cette interaction n'ont pas été mis à jour.

L'expression de FHL2 semble spécifique de la prostate et du myocarde. Des études de northern blot et des analyses d'immunohistochimie ont permis de détecter que la protéine FHL2 était présente dans les cellules épithéliales de prostate. Dans cet organe, le RcA régule de manière spécifique l'expression de nombreux gènes tels que la probasine (29). FHL2 apparaît donc comme régulateur potentiel de l'expression génique dans la prostate. Il serait intéressant d'évaluer le rôle de FHL2 sur le RcA dans le développement du cancer de la prostate.

PIAS1, isolé par la méthode de double hybride, est une protéine de 76 kDa. C'est un coactivateur du RcA et du GR (30). Il agit comme un corépresseur du PR. Il interagit avec le RcA *in vitro* et *in vivo*. Les tests d'interaction *in vitro* démontrent que la partie amino terminale de PIAS1 interagit avec la partie DBD du RcA. Il est à noter que la partie amino terminale de PIAS1 contient trois motifs LXXLL, leur implication dans l'interaction de PIAS1 avec le DBD du RcA n'a pas, jusqu'à lors, été démontrée. Les expérimentations in vivo démontrent que PIAS1 augmente de manière significative l'activité transcriptionnelle du RcA en présence de ligand agoniste et celle du RcA constitutivement actif (tronqué de sa partie LBD).

PIAS1 est une protéine multifonctionnelle, qui interagit avec différents récepteurs nucléaires, avec STAT-1 mais aussi avec la Gu RNA hélicase bien que le rôle de cette interaction ne soit pas encore défini. Il reste à déterminer en quoi la liaison d'hélicase par PIAS1 peut

influencer les interactions de PIAS1 avec les récepteurs nucléaires et STAT1.

TABLEAU I. – Les principaux co-facteurs transcriptionnels du RcA.

Facteurs intervenant sur la transcription de AR
Activateurs
ARA70 (Yeh *et al.*, 1996)
SRC1 (Ikonen *et al.*, 1997)
TIF2 (Berrevoets *et al.*, 1998)
CBP (Fronsdal *et al.*, 1998)
SNURF (Moilanen *et al.*, 1998)
ANPK (Moilanen *et al.*, 1998)
Rb (Yeh *et al.*, 1998)
BAG-1L (Froesh *et al.*, 1998)
Tip60 (Brady *et al.*, 1999)
Ubc9 (Poukka *et al.*, 1999)
ARA54 (Kang *et al.*, 1999)
ARA55 (Fujimoto *et al.*, 1999)
ARA24/Ran (Hsiao *et al.*, 1999)
ARA160 (Hsiao *et al.*, 1999)
CARM1 (Chen *et al.*, 1999)
Cycline E (Yamamoto et al., 2000)
PIAS1 (Tan *et al.*, 2000)
FHL2 (Müller *et al.*, 2000)
TRAM-1 (Tan *et al.*, 2000)
BRCA1 (Park *et al.*, 2000)
CAK (Lee *et al.*, 2000)
Miz1 (Kotaja *et al.*, 2000)
Caveolin-1 (Lu *et al.*, 2001)
DJ-1 (Takahashi *et al.*, 2001)
ARA267-a (Wang *et al.*, 2001)
PIAS3 (Grosset *et al.*, 2001)
GT198 (Ko *et al.*, 2002)
Inhibiteurs
Akt (Lin *et al.*, 1998)
ARIP3 5Moilanen *et al.*, 1999)
TR4 (Lee *et al.*, 1999)
HB01 (Lee *et al.*, 2000)
SMAD3 (Hayes *et al.*, 2001)
AES (Yu *et al.*, 20001)
PAK6 (Yang *et al.*, 2001)
SHP (Gobinet *et al.*, 2001)
PIASg (Gross *et al.*, 2001)
Cycline D1 (Petre *et al.*, 2002)
DAX-1 (Holter *et al.*, 2002)

Les ARNm de PIAS1 ont été détectés dans le testicule humain adulte et chez le primate, *Macaca mulatta*. Chez le Rat, par contre, on peut observer une expression des ARNm de PIAS1 faible à un âge de 20 à 25 jours puis une augmentation de cette expression à un âge de 30 à 75 jours dans les cellules spermatiques en développement. Dans le testicule de l'homme et de la souris, PIAS1 et le RcA sont coexprimés dans les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig. Il est démontré que la stimulation de la spermatogenèse par les androgènes est relayée par la régulation de l'expression de gènes cibles (31). PIAS1 est un modulateur potentiel de nombreux mécanismes cellulaires dans le testicule incluant la transactivation de STAT-1, le RcA et d'autres récepteurs nucléaires. PIAS1 pourrait être le relais d'interactions fonctionnelles entre les voies de transduction de STAT-1 et de RcA modulant la spermatogenèse. De plus, de par son interaction avec les hélicases, il pourrait influencer le remodelage de la chromatine.

En conclusion, même s'il reste à déterminer le rôle et les mécanismes d'action précis de ces deux coactivateurs du RcA, on peut supposer que FHL2, par sa spécificité d'action et d'expression soit impliqué dans le développement hyperplasique ou néoplasique des cellules de la prostate, et que PIAS1 joue un rôle dans la maturation des spermatozoïdes. Nul doute que les études ultérieures permettront de préciser la fonction *in vivo*, de ces deux protéines et la possibilité de les utiliser comme d'éventuelles cibles thérapeutiques.

1.4.2.2. Les coinhibiteurs

Certains récepteurs en absence de ligand voire en présence d'antagonistes recrutent des protéines et des complexes a activité inhibitrice forte. Ils entraînent une désacétylation des histones conduisant ainsi à la répression de la transcription, favorisant la condensation de la chromatine. La liaison du ligand agoniste, au contraire, conduit au remplacement de ce complexe répresseur par un complexe activateur constitué entre autres de plusieurs protéines à activité histone acétylase favorisant une décondensation de la chromatine. Ceci permet un meilleur accès aux sites d'initiation de la transcription à l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle et l'activation de la transcription.

Cependant, le récepteur des androgènes ayant lié un agoniste peut également recruter des protéines à fort potentiel inhibiteur (*cf.* tableau. 1). Ces protéines modulent l'activité du récepteur ayant lié son ligand à différents niveaux, aussi bien en entrant en compétition avec les coactivateurs, en recrutant les protéines ou des complexes à activité histone désacétylase, et en séquestrant le récepteur dans le cytoplasme, diminuant sa capacité à lier l'ADN. Parmi ces corepresseurs, nous avons travaillé sur l'implication de la protéine SHP dans la régulation de l'activité transcriptionnelle dépendante du RcA.

La protéine SHP (Short Heterodimer Partner) a été isolée pour son interaction avec CAR. Ce récepteur nucléaire orphelin ne possède ni partie amino terminale, ni domaine classique de liaison de l'ADN. Par contre, il présente un domaine de liaison au ligand potentiel comme le récepteur DAX-1, son homologue le plus proche dans la superfamille des récepteurs nucléaires. SHP est une protéine de 260 acides aminés avec un poids moléculaire apparent de 29 kDa qui possède un domaine d'inhibition intrinsèque et trois motifs "LXXLL-like". SHP a été décrit pour son interaction avec des récepteurs nucléaires (ER et RXR) et l'inhibition de leur activité transcriptionnelle (32, 33).

Nous avons observé, au cours d'expériences de transfection transitoire, que SHP inhibe jusqu'à 97 % de l'activité dépendante de RcA activé par son ligand (34). Des tests de liaison ligand-récepteur nous ont permis de vérifier que SHP n'agit pas en diminuant la quantité de récepteurs présents dans la cellule. De manière à approfondir notre compréhension du mécanisme de régulation de RcA par SHP, nous avons pratiqué des expériences de

transfection transitoire dans les mêmes conditions que les expériences sus-citées, en utilisant des coactivateurs du RcA, les protéines FHL2 et TIFII. Nous avons pu observer que l'adjonction de doses croissantes de SHP reverse la suractivation du récepteur par ces coactivateurs. Ces derniers, à l'inverse sont capables de relever l'inhibition apportée par SHP sur l'activité dépendante de RcA et ce de manière dépendante de la dose. SHP pourrait, outre son activité inhibitrice propre, inhiber l'activation du RcA en entrant en compétition avec les coactivateurs.

Dans le but d'examiner l'interaction potentielle entre SHP et RcA, nous avons pratiqué des expériences de double-hybride dans la levure en utilisant les protéines de fusion GAL4DBD-SHP et GAL4AD-RcA. Il existe une interaction basale entre SHP et RcA, mais celle-ci est augmentée de manière significative en présence de concentrations saturantes de ligand agoniste. Pour confirmer ces résultats nous avons exécuté des expériences de GST pull-down, en utilisant la protéine de fusion GST-SHP purifiée et le RcA, exprimé in vitro, marqué radioactivement par du ^{35}S. Nous pouvons observer que GST-SHP retient efficacement le RcA radioactif tandis que la GST seule ne retient pas du tout le récepteur. SHP interagit de manière dépendante du ligand avec le récepteur *in vivo* et de manière directe *in vitro*.

La protéine SHP a été décrite comme possédant 3 motifs LXXL/IL, appelés "NR-boxes". Ces motifs ont été précédemment décrits pour des protéines de type coactivateur comme la famille des p160 (35). Pour déterminer dans quelle mesure ces motifs sont impliqués dans l'interaction entre SHP et RcA, nous avons utilisé des mutants de SHP dans lesquels les motifs ont été mutés un à un. Sur chaque motif LXXL/IL, les acides aminés +1 et +4 ont été mutés en alanine. Une analyse *in vivo* de ces mutants a été effectuée dans la levure. La mutation du deuxième motif LXXL/IL ($SHPmt_2$) suffit, à elle seule, à abolir entièrement l'interaction dépendante du ligand entre RcA et SHP. En parallèle nous nous sommes intéressés aux effets de ces mutations sur la capacité de SHP à inhiber l'activation dépendante de RcA. Il conserve la capacité d'inhiber RcA mais dans des proportions moindres. On peut donc conclure que la NR-box 2 est impliquée dans les phénomènes d'inhibition de l'activation de RcA par SHP et dans la capacité de ce dernier à interagir avec le récepteur.

En conclusion, cette protéine présente un potentiel intéressant dans la compréhension de la régulation le l'activité transcriptionnelle du RcA. Une étude ultérieure des mécanismes de l'inhibition du RcA par SHP pourrait nous permettre de mieux comprendre les phénomènes de dérégulation de l'activation du RcA.

La compréhension de la spécificité et de la réalité physiologique de ces régulations des récepteurs nucléaires par ces nombreux cofacteurs reste encore à élucider. Les mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires impliquent de nombreux facteurs protéiques qui interagissent avec les autres voies de régulations de la cellule. L'intégration de ces données en un ensemble de mécanismes interdépendants permettrait une meilleure compréhension de la régulation des gènes (fig. 4).

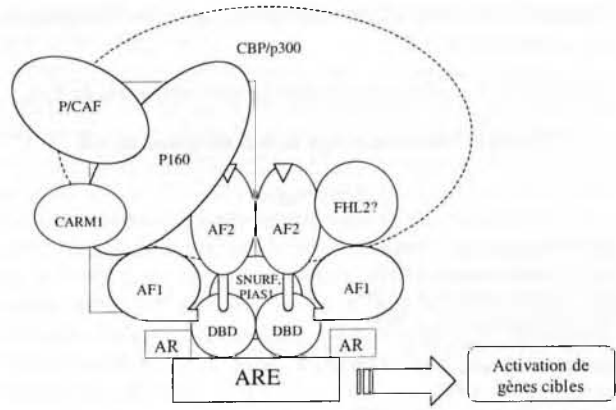

FIG 4. – Régulation transcriptionnelle du RcA.

2. PATHOLOGIE MOLÉCULAIRE DU RÉCEPTEUR DES ANDROGENES

2.1. Les insensibilités aux androgènes

Les insensibilités aux androgènes (IA) représentent plus de la moitié des cas de pseudohermaphrodismes masculins d'étiologie connue (36) et relèvent d'une anomalie du récepteur des androgènes responsable d'un défaut de l'action cellulaire des androgènes au niveau des tissus cibles. Il s'agit d'une affection récessive liée au chromosome X, se manifestant par un défaut plus ou moins important de virilisation chez des individus 46, XY.

Classiquement on distingue deux grandes formes d'IA : l'insensibilité complète aux androgènes (ICA), typiquement monomorphe, et les insensibilités partielles aux androgènes (IPA), très hétérogènes. Ces situations correspondent à la grande diversité quantitative et qualitative des déficits fonctionnels du récepteur des androgènes. Le spectre très large des anomalies de la différenciation sexuelle rencontrée dans les IPA a conduit à la description de "syndromes" (Lubs, Rosewater, Gilbert-Dreyfus...) dont la signification est limitée, s'agissant de phénotypes souvent partiellement redondants. La clarification de ce groupe des IPA, impose l'utilisation de cadres descriptifs précis comme la classification de Prader (37), ou celle plus détaillée récemment proposée par Quigley (3). Plus précise et complète, en 6/7 stades, elle rend mieux compte de ce qui constitue, en fait, un véritable continuum clinique depuis la forme la plus sévère de résistance aux androgènes, jusqu'à la forme mineure se manifestant chez un homme sans ambiguïté génitale par une stérilité isolée (Tableau. II). La plus grande rigueur dans la description des anomalies génitales est donc indispensable à l'élaboration d'une relation entre le phénotype et les déficits fonctionnels et structuraux du récepteur des androgènes.

2.1.1. Insensibilité complète aux androgènes (ICA)

Le diagnostic d'ICA peut être porté à différents âges. A la naissance, et durant la petite enfance, le signe d'appel essentiel est une hernie inguinale, uni ou bilatérale

TABLEAU II. – Les différents stades de l'insensibilité aux androgènes d'après Quigley (3).

stades	1	2	3	4	5	6	7
phénotype	M	M	anbigu	ambigu	F	F	F
micropénis	-	±	+	+	-	-	-
hypospadias	-	±	+	+	-	-	-
scrotum bifide	-	-	+	-	-	-	-
cryptorchidie	-	-	+	+	+	+	+
organe péno-clitoridien	-	-		+	+		
repli labio-scrotal	-	-		+			
fusion post. grandes lèvres	-	-	-	-	+	-	-
orifice périnéal unique	-	-	-	+	+	+	+
pilosité pubienne/puberté	N	N	↓	↓	↓	↓	0
gynécomastie/puberté	±	+	+	+	+	GM	GM
spermatogénèse	-	±N	-	-	-	-	-

chez une fille sans ambiguïté génitale. Le tableau clinique est monomorphe. Les organes génitaux externes sont féminins, sans ambiguïté. Le vagin est présent et "borgne" (il se termine en cul-de-sac), plus souvent court, rarement de taille presque normale. Les testicules sont présents et fonctionnels, donc sécrétant de l'hormone anti-müllérienne, et on ne retrouve pas de dérivés müllériens, c'est-à-dire ni utérus, ni trompes. Cependant la persistance partielle de résidus mülleriens n'est pas exceptionnelle (38).A la puberté, le signe d'appel est l'aménorrhée primaire, avec un morphotype parfaitement féminin et un développement mammaire harmonieux. La pilosité pubienne et axillaire est par contre absente. Ces jeunes filles ne présentent pas d'acné, autre témoin de l'absence d'action des androgènes sur les tissus cibles. Enfin, il est important de souligner que les patientes présentant une ICA ont un comportement sexuel féminin.

2.1.2. INSENSIBILITÉ PARTIELLE AUX ANDROGENES (IPA)

Contrairement à la forme complète, l'IPA est extrêmement hétérogène, et recouvre un très large spectre, avec des phénotypes correspondant à tous les degrés de perte fonctionnelle du récepteur des androgènes.

A une extrémité de ce spectre, la forme la plus sévère d'IPA est représentée par ce que certains auteurs (39) (40) appellent insensibilité incomplète aux androgènes. Dans cette forme, les organes génitaux sont féminins, sans ambiguïté ou marqués par une hypertrophie modérée du clitoris qui survient à la puberté. Pour Quigley (3), l'apparition à la puberté de poils pubiens, même rares et même en l'absence de toute ambiguïté génitale, doit faire éliminer le diagnostic de forme complète, car la pilosité témoigne d'un degré de réponse aux androgènes.

A l'autre extrémité, la forme la moins sévère d'IA est représentée par le groupe des hommes stériles sans aucune ambiguïté génitale, forme connue sous le nom de syndrome d'Aiman, mais plus communément dénommée aujourd'hui *minimal AIS (MAIS)*. Il a également été décrit des insensibilités aux androgènes marquées uniquement par une gynécomastie ou un hypospadias sans conséquence sur la fertilité (41).

Entre ces formes "limites", tous les degrés d'insuffisance de virilisation existent. Certains patients présentent un phénotype féminin avec une clitoromégalie et/ou une discrète fusion des grandes lèvres, d'autres ont une ambiguïté génitale plus profonde qui pose de graves problèmes de choix de sexe d'élevage, choix souvent retardé, et dont on conçoit les conséquences familiales et, à terme, personnelles. Chez un certain nombre de patients, le phénotype est masculin, ne posant pas de problème d'orientation du sexe d'élevage, mais avec une virilisation très insuffisante et un phénotype comportant, à des degrés divers et selon des associations variables, micropénis, hypospadias, scrotum bifide et cryptorchidie. Ces formes d'IPA sont souvent regroupées sous le terme de syndrome de Reifenstein. En ce qui concerne les organes génitaux internes, leur développement dépend là aussi du degré de résistance aux androgènes, et l'épididyme, le canal déférent et la vésicule séminale peuvent être de rudimentaires à normalement développés.

Au total, affirmer un diagnostic d'insensibilité aux androgènes en particulier en période néonatale, uniquement sur des arguments cliniques est extrêmement délicat. Un certain nombre d'investigations complémentaires est indispensable pour étayer le diagnostic afin de prendre en charge de façon rapide mais adaptée ces enfants.

2.1.3. INVESTIGATIONS RADIOLOGIQUES

L'échographie et la génitographie sont le plus souvent indispensables, aussi bien sur le plan diagnostique (développement des dérivés wolffiens et müllériens), que comme outil d'évaluation des possibilités chirurgicales, dans le cadre du choix du sexe d'élevage d'un nouveau-né avec ambiguïté génitale sévère.

2.1.4. DOSAGES HORMONAUX

A côté du dosage de la testostérone et des gonadotrophines plasmatiques, deux paramètres biologiques peuvent être utilisés pour renforcer le diagnostic d'insensibilité aux androgènes : les dosages de la SHBG et de l'AMH.

Dosages de testostérone, de FSH et LH

Précisons que les résultats de ces dosages doivent être interprétés en fonction des valeurs de références masculines (si les testicules sont encore en place). L'ICA et l'IPA sont classiquement caractérisées, en période post-pubertaire, par des taux de T et de LH normaux ou élevés. En période pré-pubertaire, les taux sont normaux pour l'âge. En période néonatale, pour les ICA, LH et T ne sont pas nécessairement augmentées ; de même, le pic de LH et celui de T, observés vers 6 semaines chez le garçon normal, peuvent ne pas apparaître, suggérant une sensibilisation in utero, androgéno-dépendante, de l'axe hypothalamo-hypophysaire nécessaire à la survenue du pic néonatal de LH.

En période néonatale, les IPA se caractérisent par des valeurs de T et de LH habituellement élevées.

Test de stimulation par l'HCG

Devant toute ambiguïté sexuelle (néonatale), à caryotype XY, nous réalisons systématiquement un dosage de la testostérone (toujours associé à celui de la DHT et de la D4 androstènedione pour rechercher un déficit en 5α réductase ou en 17β hydroxystéroide déshydrogénase) avant et après injection de HCG (6 ou 7 fois 1500 UI, 1 jour/2). Dans ces conditions de stimulation, la réponse en testostérone doit être supérieure à 3 ng/ml si la fonction leydigienne est normale. L'insensibilité aux androgènes se caractérise fréquemment, mais pas toujours, par une réponse exagérée de la testostérone plasmatique en fin de test (> 10 ng/ml).

Test au stanozolol

Le test au Stanozolol évalue la capacité d'un androgène à diminuer la synthèse de SHBG. Une absence de diminution de la SHBG plus ou moins complète traduirait une résistance aux androgènes (42). Ce test est malheureusement ininterprétable en période néonatale (immaturité hépatique), ce qui en réduit son intérêt.

La détermination du taux circulant d'hormone anti-Müllérienne (AMH)

Elle mesure la capacité des androgènes à inhiber la sécrétion d'AMH sertolienne. L'AMH est ainsi souvent augmentée dans les insensibilités partielles aux androgènes, davantage en période néo-natale qu'à la puberté (43).

Soulignons qu'aucun de ces dosages et test ne saurait être définitif pour l'affirmation du diagnostic d'IA puisque, pour chacun d'eux, faux positifs et faux négatifs ne sont pas rares.

2.1.5. Méthodes de biologie cellulaire

Capacité de liaison du RcA sur fibroblastes de peau génitale

Il est possible à partir d'une simple biopsie de peau génitale d'établir une culture de fibroblastes et d'étudier, sur les propres cellules du patient, les caractéristiques de liaison du récepteur pour son ligand (Bmax, nombre de sites de liaison, et Kd, constante de dissociation), par courbe de saturation et représentation de Scatchard.

Il est important de noter que le développement de techniques différentes de mesure pose des problèmes de comparaison des résultats provenant de différents laboratoires (par exemple la nature du ligand utilisé). De plus, il est fondamental de préciser à quel niveau est effectuée la biopsie cutanée. En effet, la capacité de liaison des androgènes est environ 3 fois plus importante (en moyenne 400 à 900 fmoles/mg d'ADN) dans les fibroblastes de peau génitale (replis labiaux, scrotum, prépuce) que dans les fibroblastes de peau pubienne (200 à 400 fmoles/mg d'ADN) ou non génitale (100 à 200 fmoles/mg d'ADN). Par contre l'affinité pour les androgènes est similaire dans ces différents tissus.

L'étude de la capacité de liaison des androgènes sur les fibroblastes de peau génitale en culture a constitué pendant longtemps le seul outil biologique de diagnostic des IA à l'origine d'une classification biochimique des IA en 4 groupes :

– absence de liaison aux androgènes
– liaison quantitativement diminuée
– liaison qualitativement anormale (thermolabilité du récepteur, constante de dissociation augmentée, altération de la spécificité de liaison)
– liaison normale

Il existe donc une importante hétérogénéité biochimique, parallèle à l'hétérogénéité clinique des IA et les différentes équipes s'accordent pour reconnaître qu'il n'existe pas de corrélation directe entre la sévérité clinique de l'insensibilité et les caractéristiques de liaison des fibroblastes de peau génitale, même si l'absence totale de liaison est en général associée à une forme complète.

La difficulté de la technique, le temps de mise en œuvre peu adapté à un diagnostic rapide, et surtout l'avènement de la biologie moléculaire, ont fait diminuer l'intérêt porté à l'étude de la capacité de liaison du RcA sur fibroblastes de peau génitale. Elle conserve cependant une utilité sur le plan diagnostique (une étude de l'activité 5a réductase peut ainsi être réalisée, permettant parfois une réorientation du diagnostic). La disponibilité de cellules du patient permet également d'étudier :

– La taille et le niveau d'expression du récepteur des androgènes (par western blot).
– Le niveau de l'ARNm du RcA (par northern blot ou RT-PCR semi-quantitative ou quantitative (7)).

2.1.6. Test(s) thérapeutique(s)

Il n'existe aucun consensus concernant l'utilisation d'un test thérapeutique d'évaluation de la sensibilité périphérique aux androgènes : en période néonatale, la posologie de l'androgénothérapie varie, selon les groupes, de 50 mg de testostérone retard IM, 1 injection/2 semaines pendant 3 mois à 100 mg IM/2

semaines pendant plusieurs mois ! Pour notre part, nous proposons une injection de 50 mg d'heptylate de testostérone par mois IM pendant 3 mois.

La réponse positive aux androgènes se caractérise par :

– une augmentation de longueur de la verge (> 2,5 cm)
– un développement du scrotum
– l'apparition de quelques poils pubiens

Un défaut de réponse est en faveur d'une insensibilité aux androgènes, mais une réponse normale n'élimine pas la possibilité d'une forme modérée de résistance aux androgènes. De plus, rares sont les groupes qui ont pu vérifier l'apparition d'une virilisation pubertaire spontanée d'un garçon porteur d'une IPA avec réponse positive au test thérapeutique en période néonatale.

2.1.7. Les outils de biologie moléculaire dans l'analyse des insensibilités aux androgenes : intérets et limites

Les mutations du gène du récepteur des androgènes

Le clonage et le séquençage du gène du récepteur des androgènes à la fin des années 80 (44) (45) et l'avènement des techniques de biologie moléculaire ont profondément modifié l'abord des insensibilités aux androgènes en permettant la recherche de mutations du gène.

L'identification des anomalies géniques peut, aujourd'hui, s'effectuer relativement facilement et rapidement par séquençage direct sur produits de PCR. Cependant des techniques de dépistage initial telles que la DGGE *(denaturing gradient gel electrophoresis)* ou la SSCP *(single strand conformation polymorphism)* sont également utilisées.

A ce jour, plus de 250 mutations différentes du gène du RcA ont été décrites (46). Les mutations identifiées par notre groupe sont rapportées sur la figure 5.

La première remarque qui s'impose est *le nombre très élevé de mutations*, qui caractérisent le récepteur des androgènes par rapport aux autres membres de la famille des récepteurs nucléaires et qui en fait un modèle privilégié d'analyse des relations structure-fonction des différents membres de cette famille de récepteurs.

La deuxième caractéristique de ces mutations est leur *extrême diversité*, de type (macrodélétions, microdélétions, insertion, codons stop, rupture du cadre ouvert de lecture, épissage aberrant, substitutions ponctuelles) et de localisation. Quelques "points chauds" mutationnels ont été identifiés (en particulier dans l'exon 7, (*voir* (46)) mais en dehors de ceux-ci, l'anomalie peut siéger n'importe où sur le cadre ouvert de lecture. Il n'existe donc pas, au contraire d'autres affections, de mutation qui soit suffisamment fréquente pour être recherchée en priorité. Enfin, soulignons que les substitutions d'acide aminé sont, de loin l'anomalie la plus souvent retrouvée (environ 90 % des cas).

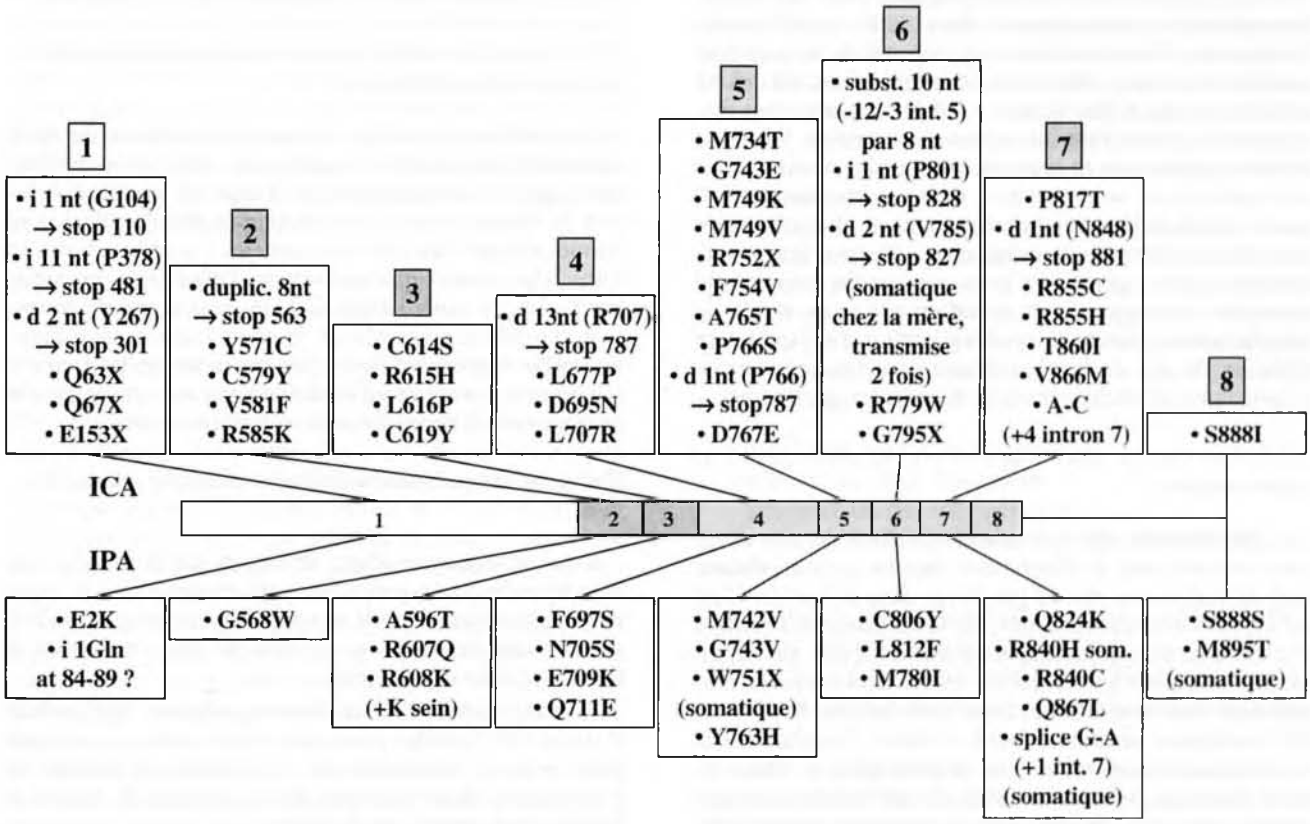

Fig. 5. – Principales mutations du RcA identifiées à Montpellier chez des patients porteurs d'ICA et d'IPA.

Au total, dans les ICA (sporadiques ou familiales) et dans les IPA familiales cliniquement et biologiquement bien définies la mutation est retrouvée dans 85 à 90 % des cas. La situation où aucune mutation n'est identifiée pourrait correspondre à des anomalies siégeant en dehors du cadre ouvert de lecture (sur les régions introniques par exemple), à des anomalies de facteurs (inconnus) agissant en amont ou en aval du RcA, à des anomalies de cofacteurs transcriptionnels.

La situation est très différente pour les "IPA" sporadiques, c'est-à-dire sans autre cas familial d'ambiguïté génitale. Dans notre expérience, dans les cas de pseudohermaphrodismes masculins avec testostéronémie normale ou élevée, et une réponse supérieure à 3 ng/ml après stimulation par HCG, nous ne retrouvons de mutation du récepteur des androgènes que dans 10 à 15 % des cas. Ces résultats soulignent l'absence de critères formels permettant de suspecter une insensibilité partielle aux androgènes devant une ambiguïté génitale néonatale et posent le problème de la définition d'une IPA : doit-elle être clinique, biologique, moléculaire ? Précisons que la recherche d'anomalies d'autres gènes de la différenciation sexuelle est également le plus souvent négative dans les cas de PHM sporadiques.

2.1.8. Le cas particulier des mutations somatiques

Dans la grande majorité des cas, la mutation identifiée chez un patient est constitutionnelle : présente dès la fécondation et donc retrouvée dans toutes les cellules de l'organisme. Dans quelques cas, cependant, la mutation est dite somatique : elle survient après la fécondation, en post-zygotique. Cette situation est à l'origine d'une distribution en mosaïque de cellules anormales. Mise en évidence relativement récemment pour les insensibilités aux androgènes, cette situation n'est pas exceptionnelle : nous l'avons retrouvée chez 4 patients et chez une mère de patient. Outre les conséquences, essentielles, sur le plan du conseil génétique (voir paragraphe suivant), le caractère somatique de la mutation est responsable de manifestations cliniques variables, parfois d'interprétation difficile, du fait de la coexistence de cellules normales (répondant aux androgènes) et de cellules anormales.

2.1.9. Le conseil génétique des insensibilités aux androgenes

L'identification de la mutation du RcA permet d'une part de confirmer le diagnostic chez un patient, d'autre part de réaliser un conseil génétique dans la famille. C'est un aspect tout à fait essentiel, car la naissance d'un enfant porteur d'un pseudohermaphrodisme masculin par insensibilité aux androgènes est un évènement toujours dramatique dans une famille. Dans certains cas, la sévérité de l'ambiguïté génitale conduit à élever l'enfant dans le sens féminin ; parfois le délai imposé pour le choix du sexe d'élevage crée une situation encore plus angoissante pour les parents. De plus, dans le cas d'une insensibilité partielle le patient élevé dans le sens masculin développe, à la puberté, une gynécomastie et présente une faible virilisation qui peuvent conduire à de graves troubles psychologiques. On comprend donc l'importance du conseil génétique pour les familles "à risques", que ce soit dans le cadre d'un diagnostic d'hétérozygotie (pour la mère et les femmes apparentées) ou pour un diagnostic prénatal lors d'une deuxième grossesse.

Dans environ 70 % des cas la mère du patient est porteuse de la mutation. Elle présente un risque théorique de 1/2 de transmettre le chromosome X atteint. La connaissance initiale de la mutation causale, à partir du premier cas familial, permet, sur biopsie de villosités choriales de rechercher, s'il s'agit d'un fœtus 46XY, la présence de la mutation du gène du récepteur des androgènes (47).

Dans 30 % des cas, la mutation est dite *de novo*, c'est-à-dire qu'elle n'est pas retrouvée sur l'ADN extrait des leucocytes circulant chez la mère. Rarement, il s'agira d'une mutation somatique chez l'enfant, ce qui permet de rassurer les parents pour une grossesse ultérieure. Si la mutation est constitutionnelle chez l'enfant, rien ne permet de déterminer a priori, si la mutation n'a concerné qu'un seul ovocyte, ou si plusieurs cellules germinales sont touchées. Il existe donc un risque théorique de transmission de l'affection, même si la mutation n'est pas détectable dans le sang maternel. Le risque est sans doute très faible puisqu'un seul cas a été rapporté dans la littérature (48), et que nous-même ne l'avons rencontré qu'une seule fois, mais ce risque existe et impose un suivi rigoureux de la grossesse.

2.1.10. Analyse de la relation structure-fonction du récepteur des androgènes

Le nombre important de mutants naturels du RcA représente un outil privilégié pour aborder la problématique plus fondamentale de la relation structure-fonction du récepteur afin de décrypter le détail moléculaire du mécanisme d'action du récepteur. Outre les études in vitro "classiques" qui permettent d'étudier les propriétés d'un RcA muté, l'analyse de la dynamique du récepteur sur cellules vivantes et la modélisation tri-dimensionnelle constituent des outils qui, à terme, participent à la mise au point et à l'étude de nouveaux agonistes et antagonistes à activités plus spécifiques (49).

Etudes in vitro *des mutations du récepteur des androgènes*

Les conséquences d'une mutation sur la fonction du récepteur des androgènes, peuvent être étudiées in vitro, après reproduction de la mutation par mutagenèse dirigée, en examinant les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du récepteur :

– la transfection de cellules eucaryotes, qui permet d'obtenir de grandes quantités de récepteur, est utilisée pour réaliser les études de la capacité de liaison de l'androgène (Kd et Bmax), de la capacité de liaison à l'ADN (gel retard), de la taille et du niveau d'expression de la protéine (western blot).

– la cotransfection est utilisée pour analyser les caractéristiques de transactivation d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur régulé par les androgènes.

Dynamique intra-cellulaire du RcA

Nous avons récemment analysé la dynamique intracellulaire du récepteur des androgènes sauvage par l'utilisation d'une protéine de fusion entre le RcA et la Green Fluorescent Protein (GFP). Cette protéine chimère (GFP-RcA), tout en conservant les caractéristiques fonctionnelles du RcA, permet de suivre la localisation intracellulaire du récepteur *in vivo* et en temps réel. Nous avons appliqué cette nouvelle approche à l'analyse de mutants décrits lors d'insensibilités aux androgènes (50) puis à l'expertise du mécanisme d'action d'antiandrogènes (51).

Analyse tri-dimensionnelle des domaines de liaison de l'ADN et des androgènes

A partir des structures cristallines du DBD de GR et ER, nous avons, par homologie, construit in silico un modèle du DBD du RcA (19) qui a permis de démontrer l'importance de certains résidus dans l'interaction avec l'ADN et les conséquences de leurs mutations sur la structure du DBD.

La résolution, en absence ou en présence d'agonistes ou antagonistes, des structures cristallines des LBD de plusieurs récepteurs nucléaires a considérablement amélioré les connaissances sur la structure du domaine de liaison de l'hormone de cette famille de récepteur (52). Par homologie avec les structures de RARγ, ERα et PR, nous avons développé un modèle tri-dimensionnel du LBD du RcA (53) qui a permis de déterminer les modalités d'ancrage du ligand et les résidus participant à des interactions protéine-protéine.

2.1.11. La relation génotype-phénotype et la notion de variabilité phénotypique

Le nombre important de mutations du RcA et la présence de certains points chauds mutationnels permettent d'aborder avec un recul suffisant le problème de la relation génotype/phénotype dans les insensibilités aux androgènes. C'est une question essentielle puisqu'il s'agit en fait de savoir si la connaissance de la mutation chez un patient peut contribuer, au-delà du diagnostic, à une meilleure prise en charge. En d'autres termes, la connaissance de la mutation en période néonatale est-elle susceptible de prédire le phénotype clinique en période pubertaire ? Cette analyse repose essentiellement sur la comparaison des propriétés du récepteur muté (et donc du caractère de l'acide aminé substitué) et du phénotype observé.

Que l'on s'intéresse au caractère conservé ou non (au sein de la famille des récepteurs nucléaires) de l'acide aminé substitué ou au type de substitution, conservative ou non (c'est-à-dire le degré d'homologie physico-chimique entre les deux acides aminés concernés), aucune relation directe ne peut être établie entre l'importance *théorique* de la mutation et le phénotype observé chez le patient. L'approche *in vitro* et structurale, à l'aide des modèles tri-dimensionnels, est bien sûr plus précise, mais certainement pas définitive et de toute façon peu adaptée au caractère urgent de la décision du sexe d'orientation.

De plus, l'analyse des mutations identiques (points chauds) retrouvées à plusieurs reprises, met en évidence une variabilité d'expression phénotypique parfois importante entre des familles différentes et même, plus rarement, au sein d'une même famille (54). Les bases de cette variabilité phénotypique ne sont pas connues et seules quelques hypothèses peuvent être avancées. Une variabilité du phénotype avec l'âge, c'est-à-dire avec l'imprégnation androgénique pubertaire, peut a priori être discutée. Ainsi, certains patients initialement considérés comme porteurs d'ICA ont été décrits, dans des publications ultérieures et par les mêmes auteurs, comme porteurs d'insensibilité partielle (exemple de la substitution R840H). On ne saurait également exclure une variation interindividuelle de la description de l'ambiguïté génitale. On peut également évoquer, par exemple, un rôle joué par les fluctuations de concentration de testostérone à la période critique du développement. Par ailleurs, la mise à jour du rôle majeur joué par les cofacteurs dans l'action des récepteurs nucléaires permet d'envisager que l'action cellulaire des androgènes est modulée par un certain nombre de facteurs qui interagissent avec le RcA et dont le rôle dans la mise en place du phénotype (aux différents âges de la vie) reste à démontrer. Enfin, les interactions fonctionnelles entre le récepteur des androgènes et d'autres voies de signalisations comme celle des facteurs de croissance, participent très probablement à la modulation de l'action des androgènes sur leurs tissus cibles.

Au total, la découverte, en période néonatale, d'une ambiguïté sexuelle pose de difficiles problèmes diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques. Le problème essentiel devant un PHM, pour les stades 3, 4 et 5 de Quigley (Tableau. I), reste le choix du sexe d'orientation.

En pratique, devant un nouveau-né suspect d'insensibilité aux androgènes, il faut :

– définir les stades de Quigley
– réaliser un bilan biologique
– effectuer un test thérapeutique
– rechercher une mutation du gène du récepteur des androgènes

La présence d'une mutation signe, en pratique, le diagnostic d'insensibilité aux androgènes.

Deux cas de figure peuvent être différenciés :

a) La mutation identifiée a été rapportée à plusieurs reprises

– si les résultats décrits dans la littérature sont concordants en matière de réponse au test thérapeutique et de virilisation pubertaire : l'orientation du sexe tiendra compte de ces données.

– dans le cas contraire (variabilité phénotypique), la décision est délicate et repose sur la discussion de tous les membres de l'équipe soignante et des parents

b) Si la mutation n'a jamais été décrite ou rapportée à une seule reprise, l'existence d'une variabilité phénotypique est toujours possible et l'absence de corrélation génotype/phénotype ne permet pas de proposer a priori un sexe d'orientation sur la seule connaissance de la mutation.

En conclusion, le choix d'orientation d'un nouveau-né porteur d'une IPA dépend, en premier lieu, du milieu socio-culturel, de l'environnement émotionnel, de l'avis chirurgical et de la réponse clinique au traitement par les androgènes. La présence d'une mutation du gène du RcA constitue un élément diagnostique certain dont la valeur pronostique (degré de virilisation pubertaire) reste à démontrer. Elle représente par contre un prérequis indispensable pour le conseil génétique dans les familles à risque. Par ailleurs, l'identification de nouvelles mutations participe aux études plus fondamentales sur la relation stucture-fonction du récepteur des androgènes.

2.2. Les autres pathologies moléculaires du récepteur des androgènes

Des anomalies moléculaires du récepteur des androgènes sont la cause et/ou sont associées à plusieurs autres situations pathologiques : la maladie de Kennedy, le cancer de la prostate, le cancer du sein chez l'homme. Nous évoquerons également la notion de variation de longueur du segment polyCAG comme facteurs de risque de plusieurs affections : cancer de prostate, hypofertilité masculine, hirsutisme.

2.2.1 La maladie de Kennedy

L'amyotrophie spino-bulbaire liée à l'X (ASB) ou maladie de Kennedy est une affection rare du motoneurone, caractérisée par l'apparition tardive, à l'âge adulte, de tremblements, crampes et fasciculations des muscles proximaux, de dysphagie souvent et surtout d'une faiblesse musculaire correspondant à une amyotrophie d'évolution progressive (55). Les hommes atteints présentent fréquemment, mais pas toujours, des signes évocateurs d'insensibilité partielle aux androgènes (gynécomastie, hypofertilité). Ces caractéristiques cliniques, la localisation dans la même région du chromosome X du gène du récepteur des androgènes (Xq11-q12) et du locus de la maladie de Kennedy (Xq12-21) et le rôle connu des androgènes dans la croissance du motoneurone ont conduit La Spada *et coll.* à rechercher des anomalies du gène du récepteur des androgènes chez des patients présentant une maladie de Kennedy (56). L'anomalie moléculaire est une expansion anormale du nombre de triplets CAG au niveau de l'exon 1 du gène du RcA : alors que dans la population normale, le nombre de CAG varie de 11 à 35, chez tous les patients ce nombre est supérieur à 40, pouvant aller jusqu'à 65.

La maladie de Kennedy fait partie d'un groupe d'affections neurodégénératives partageant la même cause moléculaire : une expansion anormale de triplets CAG à l'origine de l'expansion d'un segment polyglutamine au sein de la protéine. On y retrouve la maladie de Huntington (HD), l'atrophie héréditaire dentatorubrale-pallidoluysienne (DRPLA), et le groupe des ataxies spinocerébelleuses de types 1, 3, 6 et 7 (pour revue *voir* (57)). Il est admis que l'expansion du nombre de glutamines est à l'origine, au niveau neuronal, non pas d'une perte de fonction de la protéine mais d'un "gain de fonction", c'est-à-dire de l'acquisition de nouvelles propriétés conduisant à une toxicité neuronale. La physiopathologie des affections à expansion de polyglutamines est cependant à l'heure actuelle inconnue, même si de nombreuses hypothèses sont avancées (58).

2.2.2. Cancer de la prostate et mutations du récepteur des androgenes

Le cancer de la prostate est la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme. La glande prostatique est dépendante des androgènes pour sa croissance, son intégrité fonctionnelle et sa maintenance. De plus, les tumeurs prostatiques sont sensibles aux androgènes et les traitements visant à supprimer l'action des androgènes (castration chimique ou chirurgicale, anti-androgènes) permettent d'obtenir un fort pourcentage de rémissions initiales. Cependant, la très grande majorité des cancers prostatiques deviennent, plus ou moins tôt, résistants aux traitements androgéno-suppresseurs. Ces données plaident en faveur du rôle possible d'altérations du récepteur des androgènes, médiateur intra-cellulaire de l'action des androgènes, dans l'évolution du cancer de la prostate et en particulier dans le phénomène d'échappement thérapeutique.

Le groupe de Brinkmann (59) a été le premier à décrire une mutation du gène du récepteur des androgènes associée à un cancer de prostate, sur la lignée cellulaire tumorale LNCaP qui dérive d'une lésion métastatique ganglionnaire d'un carcinome prostatique humain. Il s'agit d'une substitution Thr-Ala en position 877 qui altère la spécificité de liaison hormonale au récepteur. Ainsi, le récepteur des androgènes mutant lie et est activé par les androgènes, l'hydroxyflutamide (un anti-androgène), la progestérone et les estrogènes (59). Ces différents ligands stimulent la croissance des cellules LNCaP.

Depuis le travail initial de Newmark *et al* (60), de nombreuses équipes ont mis en évidence des mutations somatiques du RcA dans des tissus tumoraux prostatiques ou métastatiques. Une quarantaine de mutations différentes ont été identifiées (pour une liste exhaustive *voir* (46)), la majorité étant située dans le domaine de liaison de l'hormone. Cependant, la démonstration in vitro de la perte de spécificité pour le ligand n'a été établie que dans de rares cas. La plupart des mutations ont été identifiées dans des tumeurs résistantes ou des métastases et très peu dans les tumeurs primaires, ce qui constitue un argument en faveur de la participation de ces mutations du RcA au phénomène d'échappement théra-

peutique. Les mécanismes précis de ces phénomènes restent cependant non élucidés, car extrêmement complexes et probablement plurifactoriels (61).

2.2.3. Cancer du sein chez l'homme et mutations du récepteur des androgenes

Wooster *et al.* ont mis en évidence en 1992 une mutation de RcA chez deux frères atteints de cancer du sein et porteurs d'insensibilité partielle aux androgènes (62). Il s'agit de la substitution de l'arginine 607 en une glutamine localisée dans le second doigt de zinc du domaine de liaison de l'ADN. Notre groupe rapportait, quelques mois plus tard, l'identification d'une seconde mutation chez un homme présentant également l'association cancer du sein et IPA (63). La mutation identifiée est directement adjacente à celle décrite par Wooster : substitution Arg608Lys. A ce jour, les deux mutations identifiées dans un cancer du sein sont des mutations germinales. L'étude *in vitro* de ces mutations révèle une liaison à l'hormone normale mais une diminution de la liaison du récepteur muté à l'ADN. Le modèle tridimensionnel du DBD du RcA élaboré dans notre équipe montre que la formation de dimère est fortement perturbée par les mutations (20). Ces deux acides aminés sont à la surface du DBD et pourraient être impliqués dans des interactions protéine-protéine. Leur mutation perturberait des interactions avec certains facteurs accessoires et pourrait ainsi induire un gain de fonction. La deuxième hypothèse serait une réduction de l'effet protecteur des androgènes. Aucune de ces deux hypothèses n'a pu être démontrée à ce jour et le caractère causal de ces mutations sur le développement du cancer du sein reste hypothétique.

2.2.4. Pathologies associées aux variations du nombre de CAG de l'exon 1 du gene du récepteur des androgenes

Rappelons que le polymorphisme CAG relève de la présence, près de l'extrémité 5' de l'exon 1, d'un motif répétitif de triplets CAG (qui codent pour des résidus glutamine), dont la longueur est variable, en moyenne 21 ± 2 triplets, avec des extrêmes allant de 11 à 35 dans la population normale. Les études réalisées in vitro ont montré une corrélation négative entre le nombre de CAG et l'activité transcriptionnelle du récepteur des androgènes : l'augmentation du nombre de CAG entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle du RcA alors que la délétion des CAG jusqu'à 0 CAG induit une activité transcriptionnelle supérieure au récepteur sauvage (64, 65). Ainsi, l'expansion importante, anormale, du nombre de CAG dans la maladie de Kennedy est probablement responsable des manifestations d'insensibilité partielle aux androgènes.

Sur cette base, un certain nombre d'études épidémiologiques ont été menées pour déterminer si les variations du nombre de CAG étaient associées à certaines pathologies dépendantes des androgènes et donc pouvant, au moins pour partie, dépendre d'une activité exagérée ou au contraire diminuée du récepteur des androgènes.

a) Cancer de prostate

La prévalence des allèles comportant un nombre faible de triplets CAG (<22) est plus importante chez les noirs américains qui présentent le plus haut risque de cancer de prostate, alors que cette prévalence est nettement inférieure chez les sujets asiatiques pour qui le risque de cancer est faible (66). Il a également été montré une association positive entre un nombre de CAG faible et une sévérité plus importante de l'affection, voire avec le potentiel métastatique de la tumeur (67). Cependant, un travail européen récent ne montre pas d'association entre le nombre de CAG et le cancer de prostate (68).

b) Hypofertilité masculine

A l'inverse du cancer de prostate, l'hypothèse dans cette situation est qu'un nombre de CAG élevé, en réduisant l'activité du RcA, pourraient altérer la spermatogenèse. Dowsing et al ont montré une relation entre l'infertilité masculine et l'expansion du nombre de CAG (69). Les patients porteurs de 28 CAG ou plus ont un risque multiplié par 4 de spermatogenèse réduite (70). A l'inverse, un nombre de CAG inférieur à 20 est retrouvé 6 fois plus souvent chez les hommes fertiles par rapport aux hommes présentant une anomalie de la spermatogenèse.

c) Cancer du sein chez la femme

Un travail récent mené chez les femmes porteuses de mutations de BRCA1 montre que le diagnostic de cancer du sein a été porté plus tôt chez celles qui portent sur un allèle un nombre de CAG élevé (71). Ainsi, le diagnostic a été fait en moyenne 6,3 ans plus tôt chez les femmes dont le nombre de CAG est de 30 ou plus.

d) Pathologies cutanées

La peau, en particulier le follicule pilo-sébacé est un tissu androgéno-dépendant. Des travaux récents suggèrent une association entre un nombre de CAG faible et le développement de l'hirsutisme (72), de l'acné ou de l'alopécie androgénétique (73).

Au total, les modifications de longueur du segment polyCAG pourraient participer au développement de nombreuses pathologies. Les études menées sur le cancer de prostate semblent les plus abouties bien que non consensuelles. Pour les autres affections citées, le faible nombre de publications incite à la plus grande prudence : ils se doivent d'être confirmés par d'autres équipes.

CONCLUSION

Par delà sa responsabilité majeure dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes, le RcA est impliqué dans de nombreuses situations cliniques dans lesquelles la résistance ou l'hypersensibilité aux androgènes joue un rôle clé.

L'accumulation récente des données biochimiques, structurales et moléculaires en matière de récepteur nucléaire en général et du RcA en particulier comme l'identification de phenotypes cliniques particuliers font espérer une résolution prochaine de la carte structure/fonction de ce récepteur avec les conséquences cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques qui en découleront.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sultan C., Lobaccaro J. Génétique moléculaire des syndromes d'insensibilité aux androgènes. *M/S.*, 1991, *7*, 697-704.
2. Sultan C., Savage M.O. Intersex states. In : Grossman A. éd. Clinical Endocrinology, second edition., 1998, 795-809.
3. Quigley C.A., Debellis A., Marschke K.B., Elawady M.K., Wilson E.M., French F.S. Androgen receptor defects : historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Rev.*, 1995, *16*, 271-321.
4. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K. *et al.* The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell.*, 1995, *83*, 835-9.
5. Supakar P.C., Song C.S., Jung M.H., Slomczynska M.A., Kim J.M., Vellanoweth R.L. *et al.* A novel regulatory element associated with age-dependent expression of the rat androgen receptor gene. *J. Biol. Chem.*, 1993, *268*, 26400-8.
6. Dai J.L., Burnstein K.L. Two androgen response elements in the androgen receptor coding region are required for cell-specific up-regulation of receptor messenger RNA. *Mol. Endocrinol.*, 1996, *10*, 1582-94.
7. Nirdé P., Georget V., Térouanne B., Galifer R.B., Belon C., Sultan C. Quantification of androgen receptor messenger RNA from genital skin fibroblasts by reverse transcription- competitive polymerase chain reaction. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 1998, *66*, 35-43.
8. Renaud J.P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H. *et al.* Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid. *Nature*, 1995, *378*, 681-9.
9. Veldscholte J., Berrevoets C.A., Zegers N.D., Vanderkwast T.H., Grootegoed J.A., Mulder E. Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex - use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors. *Biochemistry* 1992, *31*, 742-7430.
10. Kuil C.W., Berrevoets C.A., Mulder E. Ligand-induced conformational alterations of the androgen receptor analyzed by limited trypsinization. Studies on the mechanism of antiandrogen action. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 27569-76.
11. Kuiper G.G.J.M., Brinkmann A.O. Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor : detection of a hormone-induced phosphopeptide. *Biochemistry.*, 1995, *34*, 1851-1857.
12. Tremblay A., Tremblay G.B., Labrie F., Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol. Cell.*, 1999, *3*, 513-9.
13. Hammer G.D., Krylova I., Zhang Y., Darimont B.D., Simpson K., Weigel N.L. *et al.* Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment : integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol. Cell.*, 1999, *3*, 521-6.
14. Gorlich D. Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.*, 1998, *17*, 2721-7.
15. Roche P.J., Hoare S.A., Parker M.G. A consensus DNA-Binding site for the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.*, 1992, *6*, 2229-2235.
16. Fabre S., Manin M., Pailhoux E., Veyssiere G., Jean C. Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase-like protein specific to the mouse vas deferens. *J. Biol. Chem.*, 1994, *269*, 5857-64.
17. Haelens A., Verrijdt G., Schoenmakers E., Alen P., Peeters B., Rombauts W. *et al.* The first exon of the human sc gene contains an androgen responsive unit and an interferon regulatory factor element. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1999, *153*, 91-102.
18. Freedman L.P. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine Review.*, 1992, *13*, 129-145.
19. Lobaccaro J.M., Poujol N., Chiche L., Lumbroso S., Brown T.R., Sultan C. Molecular modeling and in vitro investigations of the human androgen receptor DNA-binding domain : application for the study of two mutations. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1996, *116*, 137-147.
20. Poujol N., Lobaccaro J.M., Chiche L., Lumbroso S., Sultan C. Functional and structural analysis of R607Q and R608K androgen receptor substitutions associated with male breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997, *130*, 43-51.
21. Chen S., Wang J., Yu G., Liu W., Pearce D. Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 14087-92.
22. Eriksson P., Wrange O. Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. *J. Biol. Chem.*, 1990, *265*, 3535-42.
23. McEwan I.J., Gustafsson J. Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, *94*, 8485-90.
24. Xu L., Glass C.K., Rosenfeld M.G. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. Curr. *Opin. Genet. Dev.*, 1999, *9*, 140-7.
25. Robyr D., Wolffe A.P., Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulators in action : diversity for shared tasks. *Mol. Endocrinol.*, 2000, *14*, 329-47.
26. Müller J.M., Isele U., Metzger E., Rempel A., Moser M., Pscherer A. *et al.* FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO. J.*, 2000, *19*, 359-69.
27. Berrevoets C.A., Doesburg P., Steketee K., Trapman J., Brinkmann A.O. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol. Endocrinol.*, 1998, *12*, 1172-83.
28. Poujol N., Sultan C. Action moléculaire des androgènes et relation structure-fonction du récepteur des androgènes. *M/S.*, 2000, *16*, 793-802.
29. Trapman J., Brinkmann A.O. The androgen receptor in prostate cancer. *Pathol. Res. Pract.*, 1996, *192*, 752-60.
30. Tan J., Hall S.H., Hamil K.G., Grossman G., Petrusz P., Liao J. *et al.* Protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis. *Mol. Endocrinol.*, 2000, 14 h 14-26.
31. Bremner W.J., Millar M.R., Sharpe R.M., Saunders P.T. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis : evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology.*, 1994, *135*, 1227-34.
32. Johansson L., Thomsen J.S., Damdimopoulos A.E., Spyrou G., Gustafsson J.A., Treuter E. The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274*, 345-53.

33. Seol W., Hanstein B., Brown M., Moore D.D. Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner). *Mol. Endocrinol.*, 1998, *12*, 1551-7.
34. Gobinet J., Auzou G., Nicolas J.C., Sultan C., Jalaguier S. Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry.*, 2001, *40*, 15369-77.
35. Heery D.M., Kalkhoven E., Hoare S., Parker M.G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.*, 1997, *387*, 733-6.
36. Sultan C., Lobaccaro J.M., Lumbroso S., Poujol N. Disorders of sexual differentiation : recent molecular and clinical advances. In : *Kelnar CJH. éd. Baillere's Clinical Pædiatrics. London.*, 1996 221-243.
37. Prader A. Der genitalbefund beim pseuhermaphroditismus feminus des kongenitalen adrenogenitalen syndroms. *Helv. Pædiatr. Acta.*, 1954, *9*, 231-248.
38. Rutgers J.L., Scully R.E. The androgen insensitivity syndrome (testicular feminization) : a clinicopathological study of 43 cases. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 1991, *10*, 126-144.
39. Griffin J.E. Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. N. Engl. J. Med., 1992, *326*, 611-618.
40. McPhaul M.J., Marcelli M., Zoppi S., Griffin J.E., Wilson J.D. Genetic basis of endocrine disease 4. The spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, *76*, 17-23.
41. Batch J.A., Evans B.A., Hughes I.A., Patterson M.N. Mutations of the androgen receptor gene identified in perineal hypospadias. *J. Med. Genet.*, 1993, *30*, 198-201.
42. Sinnecker G.H., Hiort O., Nitsche E.M., Holterhus P.M., Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. *Eur. J. Pediatr.*, 1997, *156*, 7-14.
43. Rey R.A., Belville C., Nihoul-Fekete C., Michel-Calemard L., Forest M.G., Lahlou N. *et al.* Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum antimullerian hormone measurement. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1999, *84*, 627-31.
44. Chang C., Kokontis J., Liao S. Molecular cloning of human and rat cDNA encoding androgen receptors. *Science.*, 1988, *240*, 324-326.
45. Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H., Larson R.E. *et al.* The human androgen receptor : complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.*, 1988, *2*, 1265-1275.
46. Gottlieb B., Beitel L.K., Lumbroso R., Pinsky L., Trifiro M. Update of the androgen receptor gene mutations database. *Hum. Mutat.*, 1999, *14*, 103-14.
47. Lumbroso S., Lobaccaro J.M., Belon C., Boulot P., Amram S., Sultan C. Molecular prenatal exclusion of Reifenstein syndrome. *Eur. J. Endocrinol.*, 1994, *130*, 327-332.
48. Boehmer A.L., Brinkmann A.O., Niermeijer M.F., Bakker L., Halley D.J., Drop S.L. Germ-line and somatic mosaicism in the androgen insensitivity syndrome : implications for genetic counseling (letter). *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, *60*, 1003-6.
49. Negro-Vilar A. Selective androgen receptor modulators (SARMs) : a novel approach to androgen therapy for the new millennium. J. Clin. Endocrinol. Metab., 1999, *84*, 3459-62.
50. Georget V., Terouanne B., Lumbroso S., Nicolas J.C., Sultan C. Trafficking of androgen receptor mutants fused to green fluorescent protein : a new investigation of partial androgen insensitivity syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, *83*, 3597-603.
51. Georget V., Nicolas J.C., Sultan C. La Green Fluorescent Protein : application à la dynamique intracellulaire des récepteurs stéroïdiens. *Med/Sci.*, 1999, 15 h 45-55.
52. Wurtz J.M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D. *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, *3*, 87-94.
53. Poujol N., Wurtz J.M., Tahiri B., Lumbroso S., Nicolas J.C., Moras D. *et al.* Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. A structure-fonction study. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 24022-31.
54. Rodien P., Mebarki F., Mowszowicz I., Chaussain J.L., Young J., Morel Y. *et al.* Different phenotypes in a family with androgen insensitivity caused by the same M780I point mutation in the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996, *81*, 2994-2998.
55. Kennedy W.R., Alter M., Sung J.H. Progressive proximal spinal and bulbar muscular atrophy of late onset : a sex-linked recessive trait. *Neurology.*, 1968, *18*, 671-680.
56. La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.*, 1991, *352*, 77-79.
57. Cummings C.J., Zoghbi H.Y. Fourteen and counting : unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 2000, *9*, 909-16.
58. Paulson H.L. Toward an understanding of polyglutamine neurodegeneration. *Brain. Pathol.*, 2000, *10*, 293-9.
59. Vedscholte J., Ris-Stalpers C., Kuiper G.G.J.M., Jenster G., Berrevoets C., Claassen E. *et al.* A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, *173*, 534-540.
60. Newmark J.R., Hardy D.O., Tonb D.C., Carter B.S., Epstein J.I., Isaacs W.B. *et al.* Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1992, *89*, 6319-6323.
61. Sultan C., Terouanne B., Tahiri B., Lumbroso S., Avances C., Orio F., J.-R. (Androgen-independent prostate carcinoma and androgen-receptor : recent progress in molecular genetics). *Bull. Cancer.*, 1999, *86*, 618-21.
62. Wooster R., Mangion J., Eeles R., Smith S., Dowsett M., Averill D. *et al.* A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome. *Nat. Genet.*, 1992, *2*, 132-134.
63. Lobaccaro J., Lumbroso S., Belon C., Galtier-Dereure F., Bringer J., Lesimple T. *et al.* Male breast cancer and androgen receptor gene. *Nat. Genet.*, 1993, *5*, 109-110.
64. Mahtre A.N., Trifiro M.A., Kaufman M., Kazemi-Esfarjani P., Figlewicz D., Rouleau G. *et al.* Reduced transcription regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat. Genet.*, 1993, *5*, 184-188.
65. Chamberlain N.L., Driver E.D., Miesfeld R.L. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic. Acids. Res.*, 1994, *22*, 3181-6.
66. Irvine R.A., Yu M.C., Ross R.K., Coetzee G.A. The C.A.G. and G.G.C. microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer. Res.*, 1995, *55*, 1937-1940.
67. Giovannucci E., Stampfer M.J., Krithivas K., Brown M., Dahl D., Brufsky A. *et al.* The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer (published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, *Jul.*, 22, 94 (15) : 8272). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, *94*, 3320-3.
68. Correa-Cerro L., Wohr G., Haussler J., Berthon P., Drelon E., Mangin P. *et al.* (CAG) nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with pros-

tate cancer in a French-German population. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1999, *7*, 357-62.
69. Dowsing A.T., Yong E.L., Clark M., McLachlan R.I., de Kretser D.M., Trounson A.O. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene (see comments). *Lancet.*, 1999, *354*, 640-3.
70. Tut T.G., Ghadessy F.J., Trifiro M.A., Pinsky L., Yong E.L. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, *82*, 3777-82.
71. Rebbeck T.R., Kantoff P.W., Krithivas K., Neuhausen S., Blackwood M.A., Godwin A.K. *et al.* Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, *64*, 1371-7.
72. Vottero A., Stratakis C.A., Ghizzoni L., Longui C.A., Karl M., Chrousos G.P. Androgen receptor-mediated hypersensitivity to androgens in women with nonhyperandrogenic hirsutism : skewing of X-chromosome inactivation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999, *84*, 1091-5.
73. Sawaya M.E., Shalita A.R. Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. J. Cutan. Med. Surg., *1998*, 3 h 9-15.

Séance du 19 septembre 2001