

Synthèse et régulation de la protéine de liaison des androgènes chez l'homme

CHRISTINE MERCIER-BODARD *

INSERM U33,80 rue du Gal Leclerc, 94276 Bicêtre Cedex

INTRODUCTION

Dans le plasma humain, les stéroïdes sexuels tels la dihydrotestostérone (DHT), la testostérone (T) et l'oestradiol (E2) circulent liés à une protéine spécifique, la SBP (Sex Steroid Binding Plasma Protein) ou SHBG (Sex Hormone Binding Globulin), [1, 2]. La constante de dissociation à l'équilibre mesurée pour la DHT est trois fois inférieure à celle de T, elle-même étant la moitié de celle de E2.

L'albumine, protéine majoritaire du plasma, présente une grande capacité mais une faible affinité pour ces hormones et la liaison suit la loi de polarité selon laquelle des stéroïdes peu polaires, tel E2, se lient préférentiellement, T et DHT étant principalement transportées par la SBP.

Enfin 1 à 2% de ces hormones sont sous forme libre, non complexée à des protéines et longtemps considérée comme la fraction biologiquement active régulée par la concentration plasmatique de SBP.

Contrairement à la transcortine ou CBG (Corticosteroid Binding Globulin), qui transporte spécifiquement les glucocorticostéroïdes, la SBP n'a pas été identifiée dans le plasma de rat et de souris. De plus, en dehors de l'homme et des primates, la SBP des mammifères est essentiellement une protéine de liaison des androgènes [3].

Une protéine testiculaire liant les androgènes, l'ABP (Androgen Binding Protein) présente de nombreuses caractéristiques physico-chimiques communes avec la SBP [4]. Elle maintiendrait un environnement local élevé en androgènes favorable à la maturation des spermatozoïdes.

STRUCTURE DES PROTÉINES SBP ET ABP

La SBP est une glycoprotéine, contenant 14% d'hydrates de carbone et 373 acides aminés. C'est un homodimère de 90 kd présentant un site de liaison par molécule de dimère. En conditions dénaturantes. L'analyse électrophorétique montre qu'elle est constituée de deux sous-unités de 52 et 49 kd, présentes dans un rapport de 10:1, une troisième de 56 kd est détectée chez certains individus ; cette hétérogénéité est principalement le fait de différences de glycosylation, bien qu'une mutation ou une délétion d'un acide aminé dans la région N-terminale ait été parfois rapportée.

Le précurseur de la SBP comporte un signal peptide hydrophobe de 29 amino-acides, présentant une séquence inhabituelle de leucines répétitives. La protéine a un site de O-glycosylation à l'extrémité N-terminale, deux sites de N-glycosylation dans la partie C-terminale et deux boucles formées par des ponts disulfures [5]. La glycosylation aurait une spécificité cellulaire, n'interviendrait ni dans la liaison hormonale, ni dans l'assemblage des

* présenté à la 1^{re} Journée Scientifique de la S.A.L.F., Tours, 18 juin 1993

sous-unités mais serait essentielle pour la reconnaissance du site récepteur membranaire et la sécrétion de la protéine. Le site de liaison n'est pas complètement défini mais serait localisé dans la moitié C-terminale.

SBP et ABP présentent une homologie de 68% dans leurs séquences en amino-acides et de 80% dans l'enchaînement des nucléotides, une structure identique du signal peptide et le même positionnement des ponts disulfures. Les différences portent essentiellement sur la position et la composition des deux chaînes N-glycosylées ainsi que sur l'absence de site de O-glycosylation dans l'ABP.

Aucune identité n'est retrouvée ni avec la CBG ni avec les récepteurs intracellulaires des hormones stéroïdes. Par contre, un degré limité d'homologie a été montré avec la région C-terminale de la protéine S, dépendante de la vitamine K [6] ainsi qu'avec le domaine globulaire de la chaîne A de la laminine et de la mérosine [7]. Ainsi SBP et ABP pourraient, en plus de leur capacité de liaison hormonale, être impliquées dans la différenciation et le développement.

Les lieux de synthèse sont le foie pour la SBP, les cellules de Sertoli pour l'ABP. Leurs régulations hormonales diffèrent puisque la concentration de SBP plasmatique est augmentée par E2 et les hormones thyroïdiennes, diminuée par les androgènes alors que l'ABP est régulée positivement par FSH et T

STRUCTURE DU GENE DE LA SBP/ABP

Les clonages simultanés des gènes de l'ABP [8] et de la SBP [9, 10] ont conduit à montrer la présence d'une seule copie dans le génome humain, localisée sur le chromosome 17, d'un gène unique complexe codant pour les deux protéines.

Le gène SBP/ABP est constitué de 8 exons séparés par 7 introns courts, limités par les séquences consensus GTAG. La comparaison des gènes SBP humain et ABP de rat montre

que les positions des jonctions introns/exons sont parfaitement conservées bien qu'il y ait d'importantes différences dans la taille et la séquence des introns. Les séquences déduites du signal peptide de la SBP et de l'ABP présentent des grandes similarités. Le premier exon du gène SBP contient un site d'initiation potentiel de démarrage de la transcription du précurseur. Le site majeur pour le gène ABP serait localisé à 36 bases en amont du démarrage de la traduction.

Ni boîte TATA, ni boîte CAT, ni élément de réponse hormonale n'ont pu être identifiés. En amont du site d'initiation de la transcription du gène ABP, les cent premières bases contiennent 60% de GC ce qui est souvent retrouvé en l'absence de boîte TATA; de même, des groupes riches en GA et CT forment de courtes séquences répétées directes ou inversées.

Enfin, dans le gène de l'ABP de rat un consensus de réponse à l'AMPC et dans le gène de la SBP humaine un élément homologue à un amplificateur spécifique du foie ont été mis en évidence.

SECRETION ET SYNTHÈSE HÉPATIQUES DE LA SBP HUMAINE

Des observations immunohistochimiques initiées chez le macaque [11] puis reprises chez l'homme [12] ont montré qu'un antigène type-SBP était présent dans le foie, lieu présumé de la synthèse de cette protéine.

L'étude de la régulation hormonale de la sécrétion de la SBP par une lignée cellulaire (H5A/HepG2) d'hépatocarcinome humain a permis de tirer les conclusions suivantes :

- 1- la SBP sécrétée présente les mêmes paramètres de liaison de la DHT et possède des déterminants antigéniques communs avec la SBP plasmatique.
- 2- E2 et l'anti-oestrogène tamoxifène induisent une discrète augmentation de la sécrétion

de 1,2 à 1,5 fois respectivement. L'induction la plus significative est observée après stimulation par T3 [12]. Ces résultats ne reflètent pas les fortes variations de la SBP plasmatique suivant un traitement par les oestrogènes ou les hormones thyroïdiennes. Une corrélation a alors été recherchée entre le contrôle hormonal de la synthèse hépatique de la SBP et celui de la concentration plasmatique de la protéine.

Dans les cellules H5A, un ARNm spécifique de la SBP et de taille identique à celui trouvé dans le foie normal [13] a été mis en évidence. L'accumulation de cet ARNm est augmentée respectivement de 120 à 130% par E2, 150% par le tamoxifène et 200% par T3. La progestérone (P) et son antagoniste le RU486 ainsi que l'anti-androgène, l'acétate de cyprotérone, sont sans effet (Fig. 1). Une inhibition est observée après traitement par la DHT et l'insuline. L'induction consécutive à une stimulation oestrogénique ou thyroïdienne est une réponse directe à ces hormones, ne nécessitant pas la néosynthèse d'autres facteurs protéiques puisqu'elle n'est pas modifiée en présence de cycloheximide [14].

La faible amplitude de la réponse oestrogénique peut être le fait des cellules H5A elles-mêmes qui se comporteraient différemment des hépatocytes normaux. L'oestradiol pourrait aussi agir en synergie avec d'autres facteurs non stéroïdes et également induire une forme plus glycosylée de la SBP dont la clairance métabolique serait réduite.

Le tamoxifène agit en agoniste plus actif que l'oestradiol ce qui est en accord avec les données *in vivo* [15]. Par contre l'effet inhibiteur de la DHT, reflétant les observations faites *in vivo*, demande à être confirmé puisque, à concentration pharmacologique, l'androgène a été décrit comme stimulant *in vitro* la sécrétion de la protéine des cellules HepG2 [16]

Enfin, de nombreuses observations de physiologie suggèrent que l'insuline serait un régula-

teur direct de la synthèse ou du métabolisme de la SBP. La diminution de la SBP plasmatique observée dans l'obésité, le syndrome de l'ovaire polykystique ou la résistance à l'insuline due à une hyperinsulinémie serait médiée par l'insuline, mais selon un mécanisme d'action non élucidé [17].

SYNTHESE DE SBP DANS LES ORGANES CIBLES HUMAINS

La présence chez l'homme d'un antigène type-SBP dans les organes cibles des hormones stéroïdes [18] pose la question de son origine : endocytose à partir des espaces extra-cellulaires médiée par un récepteur membranaire ou synthèse *in situ* de la protéine. La seconde hypothèse implique la présence de l'ARNm de la SBP dans les cellules.

Cet ARNm a été recherché, par transfert de Northern, dans différentes lignées cellulaires établies à partir des tissus cibles cancéreux ou de leurs métastases, stimulées ou non par E2, T ou T3.

Quelles que soient les conditions de culture, aucun ARNm spécifique de la SBP n'a été détecté dans les cellules MCF7 et RL95.2 issues respectivement de tissu mammaire et d'endomètre.

Une seconde lignée provenant d'un adénocarcinome de l'endomètre, les cellules Ishikawa, possède en l'absence de toute stimulation hormonale, un ARNm de 1,6 kb hybridant spécifiquement avec l'ADNc de la SBP et qui serait inductible par T3. Enfin, la lignée cellulaire LNCaP, isolée à partir d'une métastase prostatique, possède un ARNm de la SBP après stimulation oestrogénique alors que trois signaux sont détectés après traitement par T.

Ces différentes lignées contiennent des récepteurs oestrogènes et/ou androgènes mais leur réponse à une stimulation hormonale en terme de synthèse de protéines spécifiques est variable, reflétant un état de différenciation

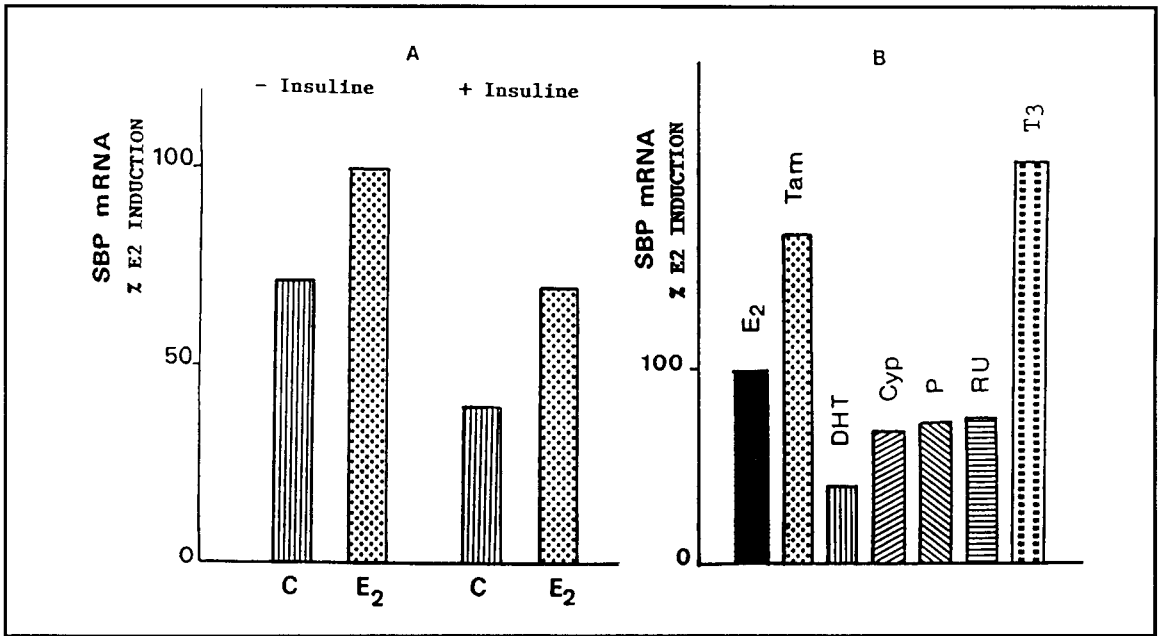


Figure 1. Régulation hormonale de l'accumulation d'ARNm SBP.

L'ARNm SBP est mesuré dans les cellules H5A par transfert de Northern et densitométrie, les résultats sont exprimés en se référant à l'induction par E₂ en absence d'insuline, prise comme 100%.

A- Les cellules sont stimulées par E₂ ou non (C) en absence ou en présence d'insuline.

B- Effet des stéroïdes (E₂, T, P), de leurs antagonistes (Tamoxifène: Tam, Acétate de cyprotérone: Cyp, RU 486) et de T₃.

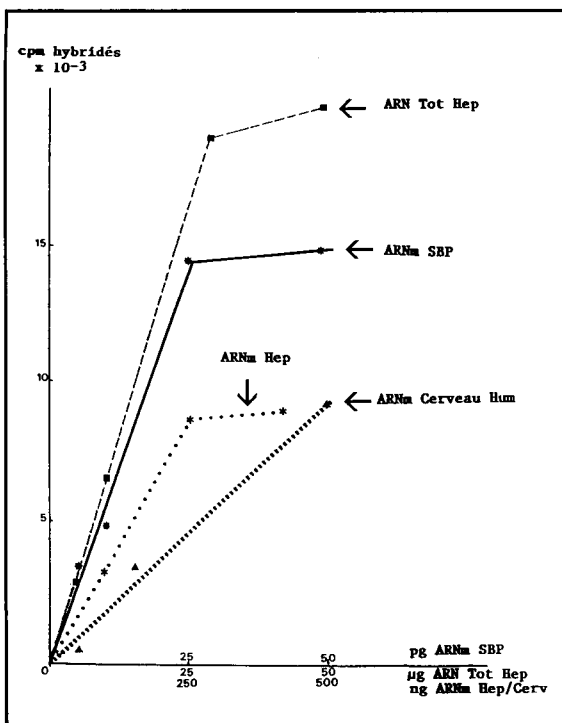


Figure 2. Mesure des ARN par protection à la ribonucléase.

Des concentrations croissantes d'ARN total ou d'ARNm d'hépatomes, d'ARNm de cerveau humain sont hybridés avec un large excès de 35S ARNC SBP. Les ARN simple brin sont digérés par un mélange de ribonucléases. Les complexes hybridés sont quantifiés par rapport à une courbe standard établie en hybridant 35S ARNC et ARNm SBP.

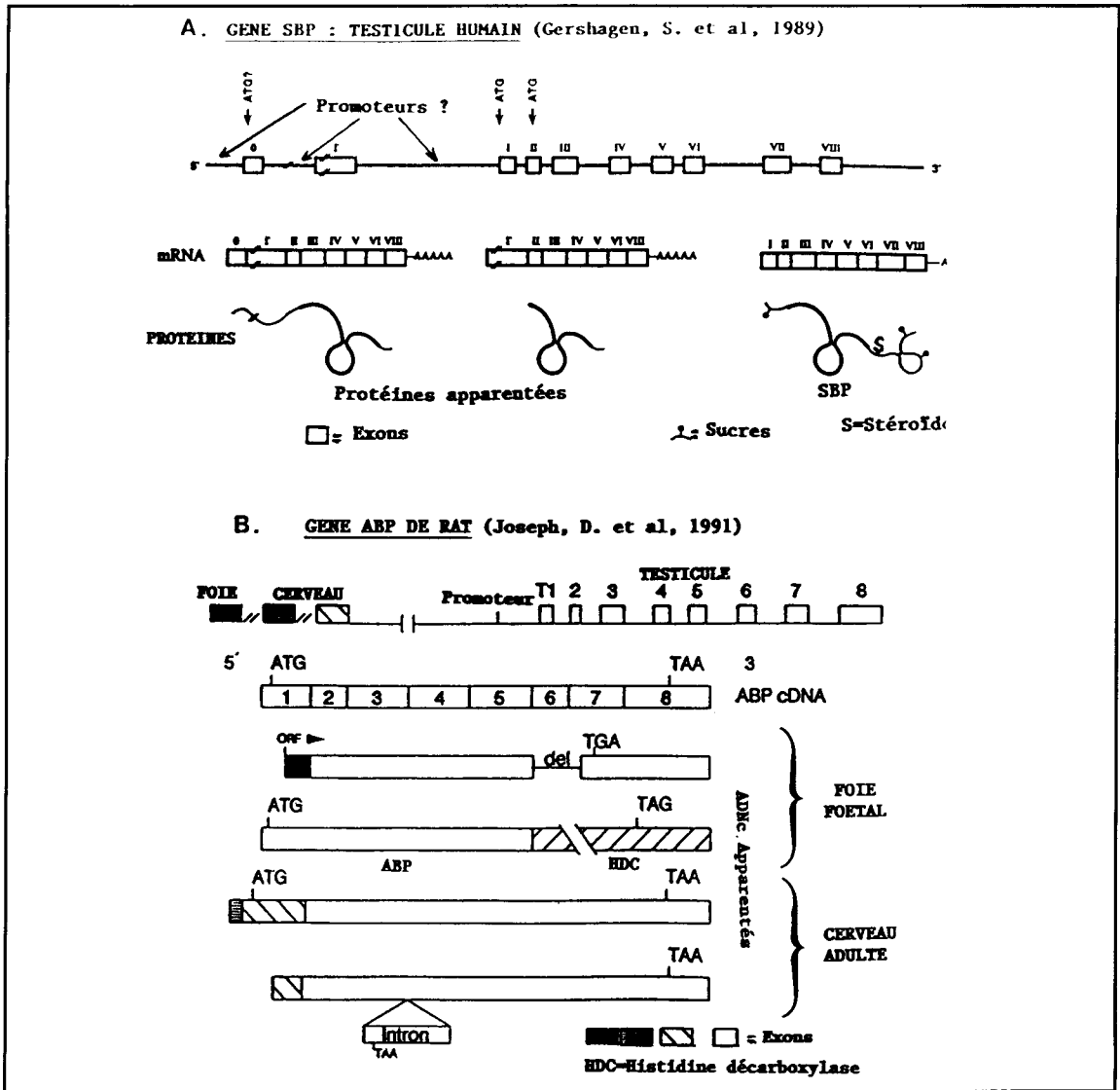


Figure 3 . Organisation du gène SBP/ABP.

Les exons sont représentés par des chiffres romains (A) ou cardinaux (B).

A - Gène SBP du testicule humain, ses transcrits produits d'un épissage alternatif et les protéines correspondantes. L'exon alternatif en 5' est désigné par I'. Les séquences différant dans la SBP et les protéines apparentées sont représentées par un trait fin.

B - Gène ABP de rat et ADNc isolés du testicule, du foie foetal et du cerveau adulte. T1 à 8 : exons testiculaires ; TP : promoteur testiculaire; ORF : c.à.d. del : délétion ; HDC : histidine décarboxylase.

plus ou moins marqué. Ces résultats demandent à être confirmés dans des organes cibles humains normaux après amplification par PCR des ARNm.

La présence de trois ARNm dans les cellules prostatiques traduit une double spécificité tissulaire et hormonale et pourrait résulter d'un épissage alternatif. Des ADNc apparentés à celui de la SBP-ABP ont également été détectés dans les testicules humains [9, 10], le foie foetal et le cerveau adulte de rat [18]. Tous présentent des séquences uniques à l'extrémité 5' et des délétions plus ou moins importantes de la région 3' résultant en la perte de la liaison hormonale (Fig. 2) ; ils seraient eux aussi les produits tissu-spécifiques d'épissage alternatif.

La très faible représentation de l'ARNm de la SBP rend peu fiable sa quantification par transfert de Northern. Une évaluation fine de la régulation hormonale des transcrits peut être faite en utilisant une analyse basée sur la protection à la ribonucléase [19]. De plus, la transcription de l'intégralité de l'ADNc ou de fragments de ce dernier permet de discriminer entre transcrits de la SBP ou de protéines apparentées plus ou moins délétées. La sensibilité de cette méthode est dix fois supérieure et nous a permis de mettre en évidence l'ARNm de la SBP dans le cerveau humain (Fig. 3).

La détection d'ARNm codant pour la SBP et des protéines apparentées est la preuve directe de la synthèse *in situ* de la SBP dans les organes cibles des androgènes et des oestrogènes. Simultanément, un récepteur spécifique de la SBP a été caractérisé dans les membranes plasmiques de ces mêmes tissus [20] ainsi que l'endocytose de la protéine humaine dans des organes cibles hétérologues [21].

Ces observations sont fondamentales car elles conduisent à rechercher un nouveau rôle pour la SBP tant au niveau de la captation des hormones par les cellules cibles que de leur

mécanisme d'action intra-cellulaire. De nombreuses questions restent ouvertes concernant notamment la caractérisation du promoteur du gène et d'éléments tissu-spécifiques, la signification physiologique des protéines codées par les ADNc apparentés et le contrôle de leur expression dans divers organes, le mécanisme d'action du complexe SBP-récepteur membranaire lié ou non à une hormone. Enfin les homologies de séquence avec la laminine et la mérosine ainsi que l'existence d'un épissage alternatif suggèrent que la SBP et l'ABP pourraient être impliquées au cours de la différenciation et du développement

RÉFÉRENCES

1. MERCIER C, ALFSEN A, BAULIEU EE. A testosterone binding globulin. In Androgens in normal and pathological conditions. Int Congr Ser. Excerpta Medica Foundation. 1966 ; 101 : 212.
2. WESTPHAL U. Steroid-protein interactions. Monogr Endocr, Springer-Verlag, NY, Heidelberg, Berlin. 1971 ; 27.
3. RENOIR JM, MERCIER-BODARD C, BAULIEU EE. Hormonal and immunological aspects of the phylogeny of sex steroid binding plasma proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1980 ; 77 : 4578-4582.
4. CHENG CY, FRICK J, GUNSALUS GL, MUSTO NA, BARDIN CW. Human testicular androgen-binding protein shares immunodeterminants with testosterone-estradiol binding globulin. Endocrinology 1984 ; 114 : 1395-1401.
5. HAMMOND GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. Endocr Rev. 1990 ; 11 : 65-79.
6. BAKER ME, FRENCH FS, JOSEPH DR. Vit K-dependent protein S is similar to rat androgen-binding protein. Biochem J. 1987 ; 243 : 293-296.
7. JOSEPH DR, BAKER ME. Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein, and vit K-dependent protein S are homologous to laminin A, meroisin and Drosophila crumbs protein. Faseb 1992 ; 6 : 2477-2481.
8. JOSEPH DR, HALL SH, CONTI M, FRENCH FS. The gene structure of rat androgen-binding protein: identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle-stimulating hormone-regulated protein. Molec Endocr. 1988 ; 2 : 3-13.

9. GERSHAGEN S, LUNDWALL A, FERLUND P. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res.* 1989 ; 7 : 9245-9258.
10. HAMMOND GL, UNDERHILL DA, RYKSE H, SMITH CL. The human sex hormone binding globulin gene contains exons for androgen binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Molec Endocr.* 1989, 3 : 1869-1876.
11. BORDIN S, PETRA PH. Immunochemical localization of sex steroid-binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1980 ; 77 : 5678-5682.
12. MERCIER-RODARD C, BAULIEU EE. Hormonal control of SBP in human hepatoma cells *J Steroid Biochem.* 1986 ; 24 : 443-448.
13. MERCIER-BODARD C, RADANYI C, ROUX C, GROYER MT, ROBEL P, DADOUNE JP, PETRA PH, JOLY DJ, BAULIEU EE. Cellular distribution and hormonal regulation of h-SBP in human hepatoma cells. *J Steroid Biochem.* 1987 ; 27 : 297-308.
14. MERCIER-BODARD C, NIVET V, BAULIEU EE. Effects of hormones on SBP mRNA levels in human cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1991 ; 40 : 777-785.
15. MOORE JW, BULBROOK RD. The epidemiology and function of sex hormone-binding globulin. In *Oxford Reviews of Reproductive Biology.* 1988 ; 10 : 180-236.
16. LEE IR, DAWSON SA, WETERHALL JD, HAHNEL R. Sex hormone-binding globulin secretion by human hepatocarcinoma cells is increased by both estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 ; 64 : 825-831.
17. Nestler JE. Editorial : Sex hormone-binding globulin: a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance ? *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 ; 76 : 273-274.
18. JOSEPH DR, SULLIVAN PM, WANG YM, MILLHORN DE, BAYLISS DM. Complex structure and regulation of the ABP/SHBG gene. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 1991 ; 40 : 771-775.
19. LEE JJ, COSTLOW NA. A molecular titration assay to measure transcript prevalence levels. In *Meth in Enzymol.* 1987 ; 152 : 633-648.
20. ROSNER W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin : recent advances. *Endocrine Rev.* 1990 ; 11 : 80-91.
21. GÉRARD A, EGLOFF M, GÉRARD H, EL HARATE A, DOMINGUO M, GUÉANT JL, DANG CD, DEGRELLE H. Internalization of human sex-steroid binding protein in the monkey epididymis. *J Molec Endocr.* 1990; 5. 239- 251.