

TRAITEMENT HORMONAL DU CANCER DE LA PROSTATE, MÉCANISMES D'ÉCHAPPEMENT ET ALTERNATIVES THÉRAPEUTIQUES

par Jean-Pierre BERGERAT^{1,2}, Philippe BARTHÉLÉMY^{1,2}, Irène ASMANE^{1,2},
Jean-Emmanuel KURTZ^{1,2} et Jocelyn CÉRALINE^{1,2} (Strasbourg)

■ La castration médicale reste le traitement de référence des cancers de prostate évolués. Elle enrayer dans un premier temps la croissance tumorale mais elle favorise le développement de mécanismes d'échappement. Ces mécanismes d'échappement sont nombreux et incluent l'augmentation de la production intra-tumorale d'androgènes, la surexpression du récepteur des androgènes (RA), la sensibilisation du RA à de faibles concentrations d'androgènes, l'émergence de divers types de mutations activatrices du RA, l'activation du RA par des voies indépendantes des androgènes. Une meilleure connaissance de ces mécanismes, et la notion que le RA reste un intermédiaire obligatoire de la transmission des signaux de survie et de prolifération des cellules cancéreuses après l'échappement à la castration ont encouragé le développement de nouvelles hormonothérapies telles que l'abiratérone, un inhibiteur puissant de la synthèse des androgènes et l'enzalutamide, un anti-androgène puissant, qui sont plus efficaces que les anciens agents utilisés en deuxième ligne. Les patients qui répondent à ces traitements de deuxième ligne échappent malheureusement après des durées médianes de 6 à 12 mois. L'échappement à l'hormonothérapie met en jeu une activation du RA et/ou de ses coactivateurs indépendante des androgènes et induite par l'action dérégulée de voies de signalisation de facteurs de croissance et de cytokines telles que IGF-R1, EGFR1-4, PI3K/Akt, Wnt, c-Met, l'IL-4 et l'IL-6. L'identification des voies impliquées dans chaque tumeur et le développement de thérapeutiques ciblées capables de les contrer sont un défi majeur de la recherche translationnelle actuelle.

Mots-clé : Cancer de la prostate, récepteur des androgènes, hormonothérapie, échappement hormonal.

I. INTRODUCTION

Le cancer de la prostate (CaP) est le cancer le plus fréquent chez l'homme dans les pays occidentaux, où il représente la seconde cause de mortalité par cancer après les cancers bronchiques (1, 2). Les androgènes jouent un rôle primordial dans le développement et la différenciation de la glande prostatique au cours de la vie embryonnaire, à la puberté, et à l'âge adulte. Ils exercent leur activité sur les cellules de la glande prostatique par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire, le récepteur des androgènes (RA). La presque totalité des cancers de la prostate expriment le RA. Les androgènes sont impliqués dans la génération et la croissance des CaP ; les eunuques ne font pas de CaP (3).

Paris, 29-30 novembre 2013

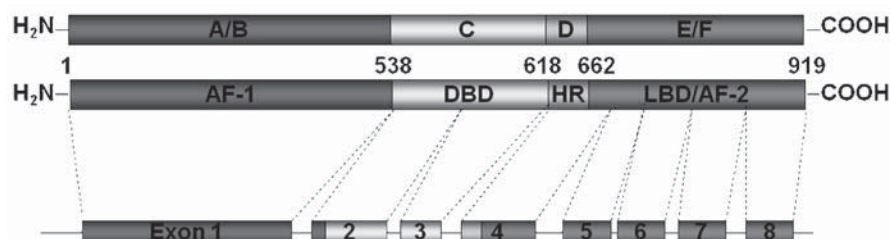
Les CaP localisés sont traités par chirurgie et/ou radiothérapie. Le traitement des formes avancées repose sur l'hormonothérapie. Avant toute hormonothérapie, la croissance des CaP est dépendante des androgènes, et il est bien connu que la castration permet une rémission de la maladie chez plus de 90 % des patients. La durée médiane de la réponse à la castration physique, ou actuellement chimique par agonistes LH-RH, ou antagonistes vrais, est environ de 18 mois avec des extrêmes allant de quelques semaines pour les formes les plus indifférenciées, à plus de dix ans (4). Tous les cancers métastatiques de la prostate échappent un jour à la privation androgénique. Les hormonothérapies de rechange étaient rarement efficaces, et on a longtemps pensé que le RA n'était plus fonctionnel dans des cellules que l'on considérait comme devenues « hormono-indépendantes » ou « androgéno-indépendantes ». Ces termes sont mal choisis et il convient de leur préférer ceux d'échappement à la castration, ou d'échappement à la privation androgénique. En effet plusieurs études ont montré que, même en situation d'échappement à la privation androgénique, le récepteur des androgènes restait dans la plupart des cas un intermédiaire obligatoire de la transmission des signaux de survie et de croissance des cellules cancéreuses (5-8). Il est donc pertinent de continuer à cibler le RA même dans les CaP qui ont échappé à la castration (9, 10). Ces observations sont corroborées par l'efficacité en clinique d'un nouvel inhibiteur surrénalien, l'abiratéron, et d'un nouvel anti-androgène, l'enzalutamide, après échappement à la castration.

II. LE RÉCEPTEUR DES ANDROGÈNES

Le récepteur des androgènes (RA) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Le gène du RA est localisé sur le chromosome X en position q11-q12 et s'étend sur environ 90 kb. Son expression est donc mono-allélique chez les sujets de sexe masculin, expliquant l'expression dominante des mutations qui l'affectent. Le cadre ouvert de lecture comprend 8 exons et s'étend sur 2,7 kb. Plusieurs isoformes d'ARNm ont été décrits chez l'homme.

Figure 1 : **Structure du récepteur des androgènes**

AF-1 : fonction d'activation de la transcription 1 ; DBD : domaine de liaison à l'ADN, HR : région charnière ; LBD : domaine de liaison au ligand ; AF-2 : fonction d'activation de la transcription 2.



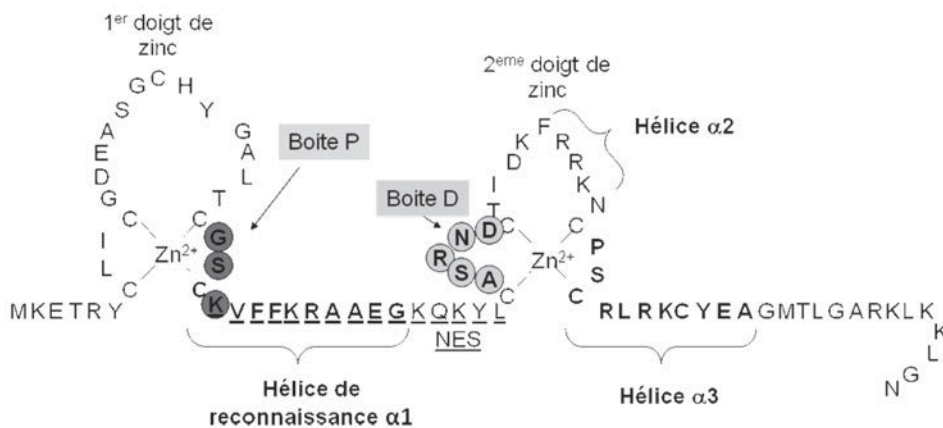
1) Structure du RA.

Comme les autres récepteurs nucléaires pour les hormones stéroïdes, le RA est un facteur transcriptionnel constitué de quatre régions nommées A/B, C, D et E/F qui soutiennent des domaines fonctionnels (11) (voir Figure 1). Le domaine N-terminal contient une fonction d'activation de la transcription (AF-1), plusieurs sites de phosphorylations et de sumoy-

lation, et contribue par le recrutement de cofacteurs transcriptionnels à la régulation de la transcription de gènes cibles des androgènes. La région centrale contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Le DBD contient deux doigts de zinc constitués de séquences spécifiques dont une boîte « P » ou P-box qui contient une séquence de reconnaissance de l'ADN, et une boîte « D » impliquée dans la dimérisation du récepteur (voir Figure 2). La région charnière abrite un signal de localisation nucléaire (NL-1). L'extrémité C-terminale contient la poche de liaison au ligand, une surface d'interaction avec les protéines chaperonnes HSP, une fonction de transactivation dépendant de la liaison au ligand (AF-2), une surface impliquée dans le processus de dimérisation et un signal de localisation nucléaire hormono-dépendant (NL-2).

Figure 2 : **Structure du domaine de liaison à l'ADN**

La boîte P, ou P-Box, est impliquée dans la fixation à l'ADN grâce à son interaction directe avec les éléments de réponse aux androgènes de l'ADN. La boîte D, ou D-Box, est impliquée dans la dimérisation du récepteur.



Dans sa forme inactive, le RA est localisé dans le cytoplasme, associé à des protéines de choc thermique (*Heat-Shock Proteins*) telles que HSP90, HSP70 et FKDP52. La liaison du ligand naturel, la dihydrotestostérone (DHT) au récepteur (RA) entraîne une modification conformationnelle qui permet la libération des protéines chaperonnes démasquant les sites de dimérisation et le signal de localisation nucléaire, une phosphorylation qui stabilise le complexe récepteur-ligand, puis l'homo-dimérisation du récepteur et sa translocation dans le noyau et enfin sa fixation à l'ADN au niveau de séquences consensus ARE (pour *Androgen Responsive Elements*) dans la région promotrice des gènes androgéno-dépendants. Plusieurs cofacteurs se lient alors au RA pour former un complexe de pré-initiation stable engageant la transcription.

Le domaine de liaison au ligand (LBD) de tous les récepteurs stéroïdiens présente une architecture comparable et forme une poche de liaison à l'hormone constituée de 11 hélices α numérotées de H1 à H12 et d'un feuillet β. La poche du ligand est tapissée de résidus hydrophobes complémentaires du caractère apolaire des ligands stéroïdes, quelques rares résidus polaires assurant l'ancrage du ligand et de ce fait la spécificité du récepteur. La liaison

du ligand entraîne des modifications conformationnelles qui permettent l'activation du site de transactivation AF2. Une modification conformationnelle particulièrement importante est le repositionnement de l'hélice H12 qui vient se rabattre sur la poche de fixation du ligand. Ce repli de l'hélice H12 forme avec une partie de l'hélice H3 et l'hélice H4 une surface d'interaction que permet le recrutement des coactivateurs assurant la transduction du signal hormonal (12). Très schématiquement un stéroïde agoniste est une molécule capable d'accéder à la poche de liaison du récepteur, de s'y fixer avec une affinité suffisante à des concentrations physiologiques ou thérapeutiques, et d'induire des modifications conformationnelles et en particulier un positionnement de l'hélice H12 de nature à permettre le recrutement des coactivateurs.

Un antagoniste compétitif fera preuve d'une affinité suffisante pour se loger dans la poche de liaison mais n'induera pas les modifications conformationnelles adéquates nécessaires au recrutement des coactivateurs qui laisseront la place à un corépresseur. Le RA, comme les autres récepteurs des hormones stéroïdiennes a une spécificité relativement étroite mais suffisamment large pour être activé par différents agonistes physiologiques de structure proche, à des concentrations variables en fonction de leur affinité. Ainsi l'activation du RA peut être observée pour des concentrations minimales de l'ordre de 1nM pour la DHT, de 10nM pour la testostérone, et de 100nM pour le 17 β -œstradiol, et la progestérone.

Ces données permettent de comprendre que certaines mutations dans le LBD, et en particulier au niveau des acides aminés qui interagissent fortement avec le ligand, puissent entraîner des modifications considérables de la spécificité du récepteur envers différentes hormones stéroïdes.

2) Interactions protéiques du récepteur des androgènes et activation transcriptionnelle.

Le RA interagit avec de nombreuses autres protéines qui peuvent classées en trois grandes catégories : a) des corégulateurs, b) des composants de la machinerie transcriptionnelle basale et c) des facteurs transcriptionnels spécifiques.

a) Corégulateurs.

L'activation de la transcription par le RA est régulée par le jeu de coactivateurs et de corépresseurs. Ces protéines corégulatrices ont plusieurs fonctions incluant le remodelage de la chromatine, la facilitation de l'assemblage et la stabilisation des complexes de pré-initiation, des interactions avec d'autres facteurs transcriptionnels et avec la machinerie transcriptionnelle basale.

Coactivateurs : plus de 170 protéines coactivatrices du RA ont été décrites à ce jour, elles peuvent être classées en deux grandes classes : les corégulateurs de type I interagissent avec le RA pour ordonner le remodelage et les modifications de la chromatine qui favorisent son accès à l'ADN ou encore pour recruter les facteurs de transcription généraux qui participent à la formation du complexe de préinitiation. Ils induisent les modifications covalentes des histones telles que phosphorylation, acétylation, méthylation soit directement, soit par recrutement d'enzymes. Les corégulateurs de type II interagissent avec le RA pour lui assurer une conformation tridimensionnelle adéquate, favoriser la fixation du ligand, stabiliser le récepteur et favoriser sa translocation nucléaire (13-15).

Les coactivateurs de type I de la famille SRC p160 tels que SRC-1, SRC-2 et SRC-3 ont plusieurs domaines d'interaction avec d'autres protéines et possèdent une activité histone-acétylase intrinsèque. Ils interagissent à la fois avec le domaine AF-2 activés par le ligand et avec AF-1, et semblent stabiliser l'interaction entre la partie N-terminale et C-terminale du récepteur activé. Ils permettent l'interaction du RA avec d'autres protéines régulatrices et avec le complexe de pré-initialisation de la transcription. Une fois recrutés au niveau du RA, ces coactivateurs SRC se lient à des co-intégrateurs tels que CBP et p300 ; ces co-intégrateurs sont capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires mais aussi avec de nombreux autres facteurs transcriptionnels tels que CREB, AP-1 et STAT, et donc d'intégrer les signaux de diverses voies de signalisation. Ces co-intégrateurs ont également une activité histone-acétyl transférase (HAT). Le RA lui-même peut être acétylé au niveau d'un résidu lysine de la région charnière par P/CAF (facteur associé à p300/CBP), et cette modification augmente son activité et le recrutement de coactivateurs.

Les corépresseurs au contraire entravent l'activation transcriptionnelle soit en favorisant la condensation de la chromatine, soit en interagissant avec le RA de façon à empêcher sa translocation nucléaire, à inhiber le recrutement de coactivateurs ou à altérer ses capacités de liaison à l'ADN. Les corépresseurs qui favorisent la condensation de la chromatine, tels que NCoR et SMRT, recrutent typiquement des histones déacétylases (16).

Ces corégulateurs sont eux-mêmes la cible de modifications post-transcriptionnelles susceptibles de moduler leur activité. A titre d'exemple, l'acétylation de la β -caténine par p300 augmente son affinité pour Tcf4, et réduit son affinité pour le RA.

b) Facteurs de transcriptions généraux.

Outre ces interactions indirectes par le biais de corégulateurs, le RA exerce des interactions directes avec des composants du complexe de préinitiation pour favoriser la transcription. Son interaction avec TFIIF induit une conformation α -hélicoïdale stable au niveau de AF-1 et facilite la liaison à SRC1 (17). Le RA interagit aussi avec TFIIF et avec P-TEFb et soutient ainsi également la phase l'élongation de la transcription (18). De surcroît, le RA interagit directement avec la sous-unité RPB2 de l'ARN polymérase II (19).

c) Autres facteurs transcriptionnels.

Le RA interagit physiquement et fonctionnellement avec plus de trente facteurs transcriptionnels, au nombre desquels AP-1, c-Jun, EGR1, ER α et Sp1 (13, 15) :

- à titre d'exemple, c-jun et le RA peuvent entrer en compétition pour leur liaison à l'ADN au niveau de promoteurs de certains gènes androgéno-dépendants, et également pour le recrutement de CBP (*cAMP response element binding protein*) (20).

- de même le facteur transcriptionnel NF κ B exerce une puissante inhibition de la fonction transactivatrice du RA, et vice versa, par le biais d'une compétition pour leurs corégulateurs mutuels et en particulier pour CBP.

- le RA se lie à la β -caténine qui augmente son activité transcriptionnelle ; ce faisant, il entre en compétition avec les facteurs Tcf pour la liaison à la β -caténine.

3) Modifications post-transcriptionnelles du récepteur des androgènes

Le RA subit de multiples modifications post-transcriptionnelles incluant phosphorylations, acétylations, méthylations, sumoylations, et ubiquitinations (21). Quatorze sites de phosphorylation au niveau de résidus sérine ont été identifiés, dont une phosphorylation constitutive au niveau de la sérine 94. Cette dernière semble activer la transcription médiée par p300. Les sérines 81 et 308 sont phosphorylées en réponse aux androgènes. La phosphorylation du résidu Ser81, opérée par des kinases telles que CDK1, CDK5, CDK9 et PKC semble jouer un rôle important dans la stabilisation de l'AR et son activation transcriptionnelle, alors que la phosphorylation en Ser308 inhibe l'activité du RA et pourrait jouer un rôle de rétrocontrôle.

GSK-3 β phosphoryle le RA en un site non encore identifié mais situé au niveau d'AF-1 qui inhibe l'activité transcriptionnelle du récepteur de même que la croissance cellulaire induite par les androgènes. L'activité de GSK-3 β est inhibée par Akt, PKA et MAPK, ce qui peut expliquer une partie des effets positifs indirects de ces kinases sur l'activité transcriptionnelle du RA (22).

Enfin il a été montré que le RA pouvait également être phosphorylé au niveau de résidus tyrosine, et ces phosphorylations de tyrosines jouent un rôle physiologique important (23). L'EGF, la bombésine et l'IL-6 induisent la phosphorylation du RA par SRC au niveau de la Tyr534. Cette phosphorylation de la Tyr534 par SRC permet l'activation transcriptionnelle du RA, de même que sa translocation nucléaire et son recrutement au niveau de la chromatine en présence de faibles doses de DHT, ou en réponse à la stimulation par les facteurs de croissance en l'absence d'androgènes. Deux autres sites de phosphorylation au niveau des tyrosines Tyr267 et Tyr363 ont été décrits, ces phosphorylations sont médiées par Ack1 (voir plus loin).

Le RA possède également des sites d'acétylation, notamment au niveau des résidus lysine du motif KLKK de la région charnière. Les acétylations du RA entraînent pour la plupart une augmentation de l'activité transcriptionnelle du récepteur, elle-même abolie par les histone-déacétylases tels que Sin3/HDAC1. Ces acétylations semblent être le fait des activités HAT de coactivateurs tels que SRC1, p300, PCAF et Tip60 sous l'effet d'inducteurs tels que les androgènes, la bombésine, ou l'IL-4. Dans sa forme déacétylée, le RA recrute des corépresseurs tels que NCoR et a une activité répressive.

III. LES MÉCANISMES D'ÉCHAPPEMENT

Le CaP peut mettre en jeu de nombreux mécanismes d'échappement à la castration, qui ne sont pas mutuellement exclusifs, et qui peuvent toucher différentes étapes de la voie de signalisation des androgènes (24-26).

1) Augmentation de la production intra-tumorale d'androgènes.

La principale source d'androgènes chez l'homme est le testicule. Le métabolite principal, la testostérone, est converti dans les tissus cibles et la prostate en dihydrotestostérone (DHT), par les isoenzymes de la 5 α -réductase. L'un des mécanismes d'adaptation à la chute

du taux sérique de testostérone due à la castration est l'augmentation de la production intra-tumorale d'androgènes. Les cellules tumorales prostatiques et les cellules stromales sont capables de synthétiser, de façon synergique, de la testostérone et de la DHT à partir de précurseurs surrénaliens tels que la DHEA et l'androstènedione (27). Montgomery *et al* ont montré que les taux de testostérone présents dans les métastases de CaP échappant à la castration chez des patients castrés étaient même significativement supérieurs à ceux trouvés dans les tumeurs de prostate de patients non traités (28). Cette augmentation de la capacité de synthèse d'androgènes résulte de la surexpression de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes telles que le CYP17A1, la 3 β -HSD, la 17 β -HSD, la 5 α -réductase de type 1 et l'aromatase (29). De cette façon, les métastases de CaP peuvent produire des taux d'androgènes intra-tumoraux suffisants pour assurer la survie et la prolifération des cellules tumorales (30).

2) Surexpression du récepteur des androgènes

Contrairement au récepteur des estrogènes dans les cancers du sein, l'expression du RA est souvent augmentée dans les CaP qui échappent à la castration. Cette surexpression peut résulter d'une amplification du gène (31, 32), ou d'une augmentation du taux d'expression du RA, et/ou de sa stabilité (33, 34).

3) Modulation de l'activité des corégulateurs.

De même, la signalisation devenue trop faible en raison de la castration peut être compensée par la surexpression de coactivateurs nucléaires du RA tels que TIF2, SRC1, p300, CBP, FHL2, ARA70 et ARA55, ou la diminution de l'expression de corépresseurs tels que NCoR ou SMRT. Quelques mutations activatrices de coactivateurs ont été décrites. Enfin, les nombreux corégulateurs du RA peuvent être l'objet de modifications post-transcriptionnelles induites par l'activation dérégulée de diverses voies de signalisation et qui modulent leur activité. Ainsi, l'activation de la voie de Wnt, observée dans 20 à 30% des CaP évolués entraîne une stabilisation de la β -caténine, une augmentation de sa concentration cytoplasmique et nucléaire, et une augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA.

4) Hypersensibilisation du récepteur des androgènes à de faibles doses d'androgènes.

L'activation de certaines voies de signalisation cellulaire telles que Ras-Raf-MAPK et PI3K/Akt et de certaines kinases telles que PKA, Cdk1, Ack1 et Src peut augmenter de 2 à 3 logs la sensibilité du RA à de faibles doses d'androgènes *in vitro*. Des activations de la voie de la MAP kinase et de PI3K/Akt, de même que des surexpressions de HER2 ont été décrites dans les CaP en échappement à la castration, et il est possible qu'elles contribuent à rendre le RA hypersensible aux faibles doses d'androgènes. L'activation du RA par des kinases semble surtout mettre en jeu la phosphorylation de coactivateurs, mais aussi sa phosphorylation directe par des protéines kinases telles qu'Akt, Src et Ack1. La phosphorylation de la Ser292 par l'Aurora kinase A augmente l'activité transcriptionnelle du RA, et soutient la survie cellulaire en présence et en l'absence d'androgènes.

5) Mutations du récepteur des androgènes.

Plus de 1000 mutations du RA ont été décrites à ce jour, dont plus de 150 ont été isolées à partir de CaP (35). Certaines mutations germinales inactivatrices du RA entraînent un syndrome d'insensibilité aux androgènes (SIA) dont l'expression clinique est très variable selon le type de mutation et peut aller d'un phénotype masculin avec ambiguïté sexuelle à un phénotype féminin complet. Les mutations somatiques acquises du RA au cours des CaP entraînent au contraire généralement un gain de fonction, souvent en sensibilisant le RA à de petites doses de RA, ou en élargissant son spectre de sensibilité à d'autres stéroïdes.

L'occurrence de mutations du RA au cours des CaP est connue depuis une vingtaine d'années. Les mutations du RA semblent nettement plus fréquentes dans les métastases que dans les CaP localisés, et plus fréquentes après échappement à la castration qu'en phase de réponse à la privation androgénique (36). De nombreuses mutations ont été décrites, toutes n'ont pas été caractérisées sur le plan fonctionnel. La découverte de mutations du domaine de liaison au ligand modifiant l'affinité et la spécificité du récepteur et le rendant inducible par d'autres stéroïdes endogènes, par exemple par les glucocorticoïdes (mutation L701H), voire par les anti-androgènes utilisés en thérapeutique tels que le flutamide (mutation T877A) ont suggéré le rôle potentiel de ces mutations dans l'échappement à l'hormonothérapie, et ont suscité un regain d'intérêt considérable dans l'étude de ces mutations (37).

Nous avons mis au point un test fonctionnel permettant de détecter facilement les mutations dans les échantillons de cancers prostatiques (38), et qui nous a permis de décrire et de caractériser plusieurs nouvelles classes de mutations présentant des propriétés fonctionnelles différentes, dont l'une, la classe des récepteurs tronqués (39), semble particulièrement impliquée dans l'échappement à l'hormonothérapie, la progression tumorale et l'évolution métastatique. Ces différentes classes de mutation peuvent toucher la partie N-terminale du récepteur support de l'activité AF-1, la région charnière, ou le DBD [pour revue, voir (40)].

a) Mutations du domaine N-terminal.

Les mutations du domaine N-terminal modifient l'activité transcriptionnelle du RA en altérant ses interactions avec ses corégulateurs et les facteurs généraux de la transcription. A titre d'exemple, il a été montré que la mutation K179R, décrite initialement en 1996, augmente l'activité du récepteur en présence de DHT. La lysine 179 fait partie d'un motif LKDH qui joue un rôle important dans l'hydrophobicité et la structure hélicoïdale d'une unité transactivatrice de AF-1. La mutation affecte l'interaction entre extrémités N-terminale et C-terminale, et l'interaction avec le coactivateur SRC1.

b) Mutations du domaine de liaison à l'ADN (DBD).

Des mutations du DBD qui affectent la nucléarisation ou la reconnaissance de l'ADN et diminuent de ce fait l'activité du récepteur sont en cause dans certains SIA. De rares mutations du DBD ont été décrites au cours des CaP. Nous avons étudié les propriétés fonctionnelles de la mutation T575A rencontrée dans des CaP en échappement hormonal. Nous avons montré que cette mutation, localisée au niveau du premier doigt de zinc, augmentait de façon très prononcée son affinité pour des séquences ARE palindromiques non canoniques au niveau desquelles le mutant est beaucoup plus actif que le récepteur sauvage (41). Nous avons décrit un autre mutant résultant d'un épissage aberrant entre l'exon 2 et l'exon 3, conduisant à l'insertion de 69 nucléotides de l'intron 2 dans le transcrit mature.

Ce mutant, nommé AR23 contient 23 acides aminés supplémentaires à partir de la position 588. Incapable de nucléariser, il est doué de propriétés d'activités cytoplasmiques non génomiques et stimule fortement l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (42).

c) Mutations du domaine de liaison au ligand (LBD).

Les mutations du LBD observées au cours des CaP élargissent habituellement la spécificité du RA à d'autres hormones stéroïdes et/ou à des ligands exogènes, et affectent l'affinité du récepteur pour ses ligands naturels ainsi que le recrutement des corégulateurs. Ces récepteurs de spécificité élargie ont été baptisés récepteurs « volages » (« *promiscuous receptors* ») par Feldman (24). La plus connue est la mutation T877A qui a été retrouvée chez 30% environ des patients traités par le flutamide (Eulexine®), et a été incriminée dans le syndrome du sevrage du flutamide c'est-à-dire la diminution du PSA et la régression tumorale observée après arrêt du traitement chez des patients en échappement à cet anti-androgène. La mutation T877S retrouvée chez un patient métastatique traité par leuprolide et flutamide est stimulée par l'hydroxy-flutamide, la progestérone, l'estradiol et le nilutamide. Il existe plusieurs autres mutants activables par les anti-androgènes. Le mutant L701H également isolé chez un patient métastatique en échappement, est activable par des concentrations physiologiques de cortisol, de cortisone et de progestérone. Le double mutant L701H et T877A, isolé à partir d'une métastase osseuse reconnaît un spectre très large d'agonistes, notamment stéroïdes C17, C19 et C22 circulants, incluant le cortisol et la cortisone (41). On conçoit aisément que l'émergence de tels clones puisse favoriser l'échappement à la castration.

d) Mutants tronqués dépourvus de LBD : un paradigme d'échappement hormonal.

Nous avons vu que les ligands de haute affinité du RA tels que la testostérone et la DHT induisent des modifications conformationnelles du LBD qui aboutissent à la formation d'une surface hydrophobe qui sert de surface d'ancrage aux coactivateurs et constitue le support de l'activité AF-2. Les coactivateurs contiennent un motif LxxLL hautement conservé qui reconnaît cette plateforme dédiée au niveau du domaine AF-2 des récepteurs activés par leur ligand (43). Le domaine AF-2 du récepteur des androgènes peut également recruter des corégulateurs contenant ces motifs LxxLL dans sa forme non-activée, mais il se lie préférentiellement au motif 23FQNL27 de l'extrémité N-terminale en l'absence de ligand, et inhibe l'activité transcriptionnelle de AF-1. Ainsi, en contraste avec les autres récepteurs stéroïdiens, l'activité transcriptionnelle ligand dépendante médiée par AF-1 est réprimée par AF-2 en l'absence de ligand agoniste. Des études expérimentales qui ont recours à des délétions dirigées de différents domaines de l'AR montrent que les constructions ne contenant que les quatre premiers exons ont une capacité de nucléarisation indépendante et une activité transcriptionnelle constitutive en l'absence de tout ligand (44).

Nous avons identifié et caractérisé pour la première fois dans des CaP chez l'homme des mutations non-sens dans la région charnière conduisant à des récepteurs tronqués, dépourvus de LBD (45). Nous avons retrouvé ce type de mutants dans 15% des échantillons tumoraux et dans 83% des échantillons métastatiques analysés. D'autres types de mutants tronqués, résultant d'épissages alternatifs avec rétention d'une séquence intronique contenant un codon stop dans la phase ouverte de lecture ont également été décrits par la suite (46-50). Une équipe a également décrit la possibilité de voir apparaître, in vitro dans les cellules LNCaP cultivées en l'absence d'androgènes, un récepteur tronqué, appelé AR-NH1, par protéolyse enzymatique du récepteur entier, apparemment sous l'effet d'une serine protéase. Le site de clivage semble situé entre les acides aminés 650 et 685 (51).

Nous avons montré que ces récepteurs tronqués dépourvus de LBD avaient des propriétés étonnantes qui permettent de penser qu'ils jouent un rôle important dans l'échappement hormonal. Ces mutants tronqués font preuve de translocation nucléaire spontanée et d'activation transcriptionnelle puissante et constitutive. Ils forment dans le noyau des complexes transcriptionnels avec CBP, GRIP-1 et c-jun, différents de ceux du RA sauvage (39). Nous avons mené des études extensives sur l'activité transcriptionnelle de ces mutants, et plus particulièrement du mutant Q640stop, et sur le phénotype des cellules qui les expriment. Le mutant Q640stop induit l'activité transcriptionnelle d'AP-1, de NFAT et NFκB. Une analyse comparative du profil d'expression génique montrent que 1191 gènes sont sous- ou sur-exprimés en présence du variant tronqué du RA par rapport au profil d'expression obtenu en présence du récepteur sauvage ($P < 0.001$). De façon intrigante, les cellules cancéreuses prostatiques transfectées exprimant ce récepteur tronqué exercent en co-culture des effets paracrines sur les cellules cancéreuses voisines non transfectées (52). Elles induisent une augmentation de l'expression, une nucléarisation et une activation du RA des cellules non voisines non transfectées. Nous avons également montré que ces récepteurs tronqués pouvaient jouer un rôle important dans la progression tumorale et la métastase. Le mutant tronqué Q640stop induit l'activité de facteurs transcriptionnels impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse tels que SNAIL et ZEB-1 et l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la vimentine et S100A4, une petite protéine à calcium également impliquée dans la progression tumorale (53). L'expression de la N-cadhérine augmente dans les tumeurs échappant à la castration, et son expression a été corrélée au potentiel métastatique des CaP. De plus, le mutant tronqué induit la sécrétion de VEGF-A par les cellules prostatiques cancéreuses. Nous avons enfin montré que l'activité transcriptionnelle de ces RA tronqués est elle-même régulée par le biais de phosphorylations activatrices du RA impliquant les voies de récepteurs membranaires à tyrosine kinase. Ces phosphorylations activatrices mettent en jeu les voies de signalisation de l'EGFR, de HER2, de la MAPK et de PI3K/Akt. L'activité transcriptionnelle du RA tronqué est diminuée de 30% en présence de trastuzumab, un anticorps monoclonal anti-HER2, de 60% par le Gefinitib, un anti-EGFR1, et d'environ 80% en présence d'inhibiteurs des voies de PI3K/Akt et de MAPK.

Au total, ces récepteurs tronqués représentent donc une voie potentiellement redoutable non seulement d'échappement hormonal mais également de progression tumorale puisqu'ils sont constitutivement actifs, qu'ils activent le RA des cellules voisines en l'absence de tout ligand, et qu'ils induisent l'expression de marqueurs mésenchymateux et de VEGF par les cellules tumorales. Dépourvus de LBD, ils ne sont pas susceptibles de répondre à une quelconque manipulation hormonale, mais leur activité peut être entravée par des inhibiteurs de voies de signalisation des récepteurs membranaires à tyrosine kinase (RTK), en particulier de EGFR1 et EGFR2.

6) Activation du RA indépendante du ligand par la dérégulation des voies de signalisation des facteurs de croissance et des cytokines.

Plus de 200 protéines corégulatrices sont capables d'activer, ou de réprimer, l'activité transcriptionnelle du RA. L'activité de ces protéines, et du RA lui-même, peut être modulée par des modifications de leur expression, des mutations, ou des modifications post-transcriptionnelles induites par l'activation dérégulée de diverses voies de signalisation de facteurs de croissance et de cytokines incluant IGF-R1, les récepteurs de la famille de l'EGF, et les voies de PI3K/Akt, de Wnt, de c-Met, de l'IL-4 et de l'IL-6 (33, 54-56).

Ces modifications post-transcriptionnelles peuvent sensibiliser le RA à ses ligands, ainsi qu'on l'a vu plus haut, mais également entraîner une activation du RA indépendante de tout ligand. A un degré de plus, le maintien de la survie et de la prolifération peut devenir indépendant de l'expression même du RA, et deux lignées de CaP humains issues de métastases de cancers hormono-résistants, la lignée DU145 et la lignée PC3 n'expriment plus le RA (57). Cette situation est toutefois rare in vivo, et la grande majorité des CaP en échappement hormonal continuent à exprimer le RA.

a) Voie de PI3K/Akt.

L'activation de la voie de PI3K/Akt a été décrite dans une proportion élevée de cancers de prostate en échappement hormonal, et semble jouer un rôle très important dans les mécanismes d'échappement. Cette activation peut résulter de l'inactivation du gène PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) (par délétion, mutation ou hyperméthylation du gène, observée dans 20% des tumeurs primitives, et 60-80% des tumeurs résistantes à la castration), de mutations activatrices de la sous-unité p110 α de PI3K, de l'expression de l'isoforme p110 β , de la présence d'un réarrangement TMPRSS2-ERG/ETV4/ETV5, de l'activation en amont de récepteurs pour des chémokines ou des facteurs de croissance et en particulier de l'IGF-R1. En situation de privation androgénique, Akt se lie au RA et le phosphoryle au niveau des résidus Ser213 et Ser791. La phosphorylation de Ser213 en présence d'IGF1 est médiée par Akt, et favorise la translocation nucléaire du RA.

L'activation de la voie d'Akt peut entraîner une sensibilisation du RA à de faibles doses d'androgènes, une activation du RA indépendante de ligand, et dans certaines circonstances une croissance indépendante du RA lui-même : une étude portant sur les cellules LNCaP in vitro montre que l'extinction de l'expression du RA par un siARN entraîne un arrêt de leur prolifération ; cependant, après 72 heures d'extinction du RA, les auteurs observent une restauration de la prolifération et de la migration des cellules parallèlement à l'apparition de taux élevés de p-Akt, et à l'expression de β -caténine nucléaire, de c-Myc, et de la cycline D1 ; l'extinction d'Akt, ou de la β -caténine inhibe cette récupération. Les auteurs suggèrent que dans les CaP hormono-indépendants, Akt prend le relais du RA pour assurer la progression tumorale avec le même intermédiaire, la β -caténine.

b) Voie d'Ack-1

Ack1 est une tyrosine kinase intracellulaire non-récepteur, ubiquitaire, dont l'activation est induite d'une part par des facteurs de croissance tels que l'EGF, l'héréguline, le PDGF et l'IGF1 via les récepteurs membranaires à tyrosine kinase, et d'autre part par l'adhésion cellulaire via les intégrines. Une amplification d'Ack1 a été observée dans plusieurs types de cancers humains, en particulier dans des cancers ovariens, bronchiques, pancréatiques et œsophagiens. Ack1 est impliquée dans la progression tumorale et le potentiel métastatique. Elle est très souvent surexprimée dans les CaP métastatiques humains en échappement hormonal, mais rarement dans les stades précoces. L'expression forcée d'Ack1 augmente très fortement la croissance androgéno-indépendante des xénogreffes de cellules LNCaP. Il a été montré que Ack1 est capable de phosphoryler le RA au niveau des résidus tyrosine Tyr267 et Tyr363 du domaine de transactivation AF-1 en présence ou non d'héréguline. Cette phosphorylation des tyrosines entraîne le recrutement du RA au niveau des éléments de réponse aux androgènes, et induit une activation transcriptionnelle du récepteur indépendante du ligand (58). Il a également été montré qu'Ack1 promeut la cancérogénèse prostatique via la phosphorylation et l'induction de la dégradation protéasomale de WWOX, un

gène suppresseur de tumeur qui réprime les fonctions transactivatrices de nombreux facteurs transcriptionnels en les séquestrant dans le cytoplasme (59, 60).

Enfin, Ack1 est capable d'activer directement Akt par phosphorylation, de façon indépendante de PI3K (61). Cette deuxième voie d'activation d'Akt pourrait expliquer le peu d'efficacité des inhibiteurs de PI3K dans les essais de traitement des CaP chez l'homme jusqu'à ce jour. Des mutations activatrices acquises d'Ack1 ont été décrites dans divers types de carcinomes humains.

c) La β -caténine

La β -caténine est un corégulateur du RA ; elle interagit avec le RA en présence de ligand pour augmenter son activité transcriptionnelle. La β -caténine a une double fonction ; c'est à la fois une protéine structurale membranaire qui interagit avec la cadhérine-E au niveau des jonctions d'adhérence intercellulaire, et à la fois un facteur transcriptionnel retrouvé dans le cytoplasme et le noyau où elle se couple avec des facteurs de la famille Tcf/Lef pour stimuler la transcription de gènes tels que c-Myc et la cycline D1. La dégradation de la β -caténine est activée par le complexe GSK3 β -axine-APC, et inhibée par la voie de Wnt qui augmente le taux de β -caténine dans le cytoplasme et le noyau. Il existe plusieurs niveaux d'interaction entre les voies de la β -caténine et du RA : les ligands Wnt peuvent transactiver le RA, la β -caténine est capable de se lier au RA et agirait comme un coactivateur amplifiant son activité transcriptionnelle, la GSK3 au contraire inhibe l'activité du RA, il y a compétition entre RA et Tcf/Lef pour la liaison avec la β -caténine, et enfin la cycline D1, gène cible de Tcf/Lef, interagit avec le RA pour limiter son activité.

Des taux élevés de β -caténine et des formes mutées stabilisant la protéine ont été décrits au cours des CaP. Dans un modèle de xénotransgreffe de cellules LNCaP chez des souris SCID, Wang *et al* ont observé *in vivo* une co-localisation nucléaire du RA et de la β -caténine dans les tumeurs résistantes à la castration, mais pas dans les tumeurs poussant chez les animaux non castrés (22).

d) Voie de l'EGFR

De nombreuses dérégulations des voies des EGFR et de l'IGF-R1 sont décrites dans les CaP. La voie de l'IGF-R1 engage les voies des MAPK et de PI3K/Akt, et interagit avec les voies des EGFR. Le récepteur HER2 a été impliqué dans la progression des CaP échappant à la castration. L'activation de HER2 peut conduire à une sensibilisation ou à une activation ligand-indépendante du RA, qui semble impliquer le dimère HER2-HER3 et la voie d'Akt. La résistance aux inhibiteurs d'EGFR1 est associée à la surexpression d'EGFR2, 3 et 4, et de leurs ligands.

e) c-Met

L'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) est sécrété par les cellules stromales de la prostate alors que le récepteur, c-Met, est exprimé par les cellules épithéliales. Le RA réprime l'expression de c-Met dans les cellules androgéno-sensibles en interférant avec le facteur transcriptionnel Sp1. L'expression de c-Met est en revanche augmentée dans les métastases des CaP après échappement à la castration (62, 63).

f) L'interleukine-6

L'interleukine-6 enfin est un stimulateur de croissance autocrine et paracrine des cellules cancéreuses prostatiques. L'expression de l'IL-6 est particulièrement élevée dans les CaP échappant à la castration, et l'activation du RA par l'IL-6 est sans doute l'un des facteurs qui contribue à la progression tumorale (64, 65).

IV. IMPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES

La multiplicité des voies d'échappement à la castration et l'activation du RA par des voies de signalisation androgéno-indépendantes expliquent que les réponses aux manipulations hormonales de deuxième ligne ont longtemps été peu efficaces (66, 4). La démonstration que le RA restait fonctionnel dans ces situations a stimulé la recherche dans ce domaine et a abouti à la conception de nouvelles molécules plus efficaces. Nous nous limiterons dans la suite du texte aux avancées thérapeutiques concernant l'hormonothérapie et les thérapeutiques ciblées, et n'aborderons pas la chimiothérapie ni l'immunothérapie des CaP qui sortent du cadre de cet exposé.

1) Des molécules plus efficaces pour inhiber la synthèse d'androgènes.

Nous avons vu que l'un des modes d'échappement à la castration était la synthèse intratumorale de DHT à partir de la DHEA et de l'androstènedione d'origine surrénalienne. La surrénalectomie chirurgicale préconisée dès 1945 par Huggins et Scott a été abandonnée en raison de son importante morbidité et remplacée par la « surrénalectomie » médicale qui fait appel à l'utilisation d'inhibiteurs de la biosynthèse de stéroïdes surrénaliens. Les plus utilisés ont été le kétoconazole et l'aminogluthétimide, ou encore les corticostéroïdes seuls. Le kétoconazole et l'aminogluthétimide inhibent plusieurs enzymes dépendant du cytochrome P₄₅₀ impliquées dans la stéroïdogénèse testiculaire et surrénalienne. Un traitement substitutif par glucocorticoïde γ est habituellement associé pour compenser la diminution de la synthèse du cortisol et l'augmentation compensatrice de la sécrétion hypophysaire d'ACTH. Les taux de réponse (diminution du taux de PSA \geq 50%) rapportés sont très variables, ils sont de l'ordre de 20 à 40 % et les durées de réponse sont courtes, de 2 à 6 mois. Les efforts de recherches déployés pour concevoir des inhibiteurs de la synthèse des androgènes plus puissants et plus ciblés ont abouti au développement d'agents plus efficaces et mieux tolérés (67).

L'abiratérone est un nouvel inhibiteur spécifique et irréversible du cytochrome CYP17A1. Inhibant les activités de 17 α -hydroxylase et de 17,20 lyase du CYP17A1, elle réprime la conversion de la prégnénolone et de la progestérone en DHEA et en androstènedione (68). Il semble qu'elle inhibe également la 3 β -hydroxystéroïde- déhydrogénase, et de ce fait la conversion de la DHEA en l'androstènedione (69). L'abiratérone est plus spécifique, plus efficace et moins toxique que le kétoconazole. Son efficacité en association avec la prednisone a été démontrée par des essais de phase III (versus placebo et prednisone) qui ont objectivé un bénéfice significatif de survie et de qualité de vie aussi bien chez les patients préalablement traités par docétaxel (70) que chez les patients naïfs de chimiothérapie (71). Le taux de réponse (diminution du PSA \geq 50%) est de 30% environ après docétaxel, et de 35% chez les patients naïfs de chimiothérapie. L'abiratérone a obtenu l'agrément de l'EMA en 2011 pour les patients préalablement traités par docétaxel, et en 2013 en première ligne

chez les patients échappant à la castration. D'autres inhibiteurs du CYP17A1 sont en cours de développement, en particulier l'orteronel (TAK-700), très puissant inhibiteur de l'activité C17-20-lyase du CYP17A1, et la galétérone (TOK-001) qui est à la fois un inhibiteur du CYP17A1, mais également un antagoniste pur du RA (9, 10, 72).

2) Des anti-androgènes plus puissants.

L'enzalutamide (MDV3100, Xtandi®) est un anti-androgène de deuxième génération. C'est un inhibiteur compétitif de la liaison des androgènes au RA qui a une meilleure affinité et une plus grande puissance que les inhibiteurs de première génération tels que le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide. De surcroît, sa liaison au RA induit des modifications conformationnelles qui inhibent la translocation nucléaire du complexe de même que sa liaison aux éléments de réponse aux androgènes de l'ADN. Il inhibe l'activité de mutants stimulés par les autres anti-androgènes, et en particulier du mutant T877A activé par le flutamide (73).

Dans un essai de phase III versus placebo (étude AFFIRM) après docetaxel chez des patients ayant échappé à la castration, l'enzalutamide a fait preuve d'un bénéfice significatif en termes de survie sans progression, de survie globale (allongement de 5 mois), et de contrôle de la douleur, et une réduction du taux de PSA ≥ 50 % a été observée chez 54 % des patients. L'enzalutamide a obtenu l'agrément de la FDA en août 2012, et l'agrément de l'EMA en avril 2013 chez les patients préalablement traités par docetaxel (74). Un essai de phase III est en cours (étude PREVAIL) chez les patients naïfs de chimiothérapie. Pour le moment, aucune mutation du RA conférant une résistance à l'enzalutamide n'a été isolée chez l'homme. D'autres anti-androgènes de deuxième génération, qui bloquent la translocation nucléaire du RA, tels que l'ARN-509 et l'ODM-201 sont en cours d'études cliniques (10, 75).

Balbas *et al* ont construit sur la base de modèles structuraux informatiques une mutation du LBD, la mutation F876L, qui convertit l'enzalutamide en un agoniste du RA (76). Cette mutation qui confère une résistance à l'enzalutamide et à l'ARN-509 a été récemment isolée dans le plasma de patients traités ARN-509 (77).

3) Comment déjouer les récepteurs tronqués ?

De plus en plus d'arguments permettent de penser que les récepteurs tronqués jouent un rôle dans l'échappement hormonal, la progression tumorale et la métastase. Dépourvus de LBD et constitutivement actifs, ils sont donc insensibles à la privation androgénique et aux anti-androgènes et défient les modalités d'hormonothérapie disponibles. Il convient toutefois de noter que certains variants d'épissage tronqués ne sont actifs qu'en la présence concomitante d'un RA complet, et que dans ce cas les anti-androgènes et le MDV3100 peuvent contrer l'avantage de croissance conféré par la présence du mutant (78).

Différentes approches sont envisageables pour contrer les récepteurs tronqués constitutivement actifs :

- le recours à un antagoniste de la région N-terminale du RA : Sadar et ses collaborateurs ont

montré que l'EPI-001 qui se lie de façon covalente au NTD, inhibe fortement l'activité transcriptionnelle du RA. De façon remarquable, l'EPI-001 inhibe l'activité transcriptionnelle des mutants tronqués du RA, inhibe la croissance de xénogreffes de la lignée LNCaP chez la souris SCID, et également la croissance de xénogreffes de la lignée VCaP qui exprime un mutant tronqué (79). Cette approche, encore expérimentale, peut être une façon d'entraver l'activité du RA sauvage et des mutants du LBD, et également des mutants tronqués.

- la façon sans doute la plus efficace d'inhiber les fonctions du RA serait d'inhiber son expression dans les cellules tumorales. L'extinction de l'expression du RA par un oligonucléotide anti-sens (shARN ou siRNA) est efficace in vitro. In vivo, elle permet d'entraver la croissance de xénogreffes de lignées de CaP androgéno-sensibles, de tumeurs résistantes à la castration et également de lignées exprimant un mutant tronqué. Cette approche se heurte toutefois aux difficultés techniques inhérentes à la faible pénétration de ces oligonucléotides dans les cellules et à la nécessité de les administrer par voie intraveineuse continue (80-82).

- enfin, nous avons montré que l'activité des mutants tronqués est elle-même régulée par les voies de signalisation de l'EGFR, de HER2, de la MAPK et de PI3K/Akt. L'impact de l'inhibition de ces voies dans le traitement des CaP en échappement hormonal chez l'homme est en cours d'évaluation (voir plus loin).

4) Inhibiteurs des HSP.

Une autre approche pour interférer avec l'activité du RA est d'inhiber les fonctions des protéines chaperonnes de la famille des HSP qui jouent un rôle important dans le maintien de son intégrité et la régulation de ses fonctions (9, 10). HSP90, HSP70 et des co-chaperonnes stabilisent le RA dans le cytoplasme et le maintiennent dans une configuration de haute affinité pour le ligand. Malgré des résultats encourageants à l'échelon expérimental, les inhibiteurs de HSP90 de première génération n'ont pas fait preuve d'une efficacité anti-tumorale intéressante dans les essais cliniques ; des inhibiteurs de deuxième génération, tels que le ganetespib sont en cours d'évaluation. La protéine chaperonne HSP27 augmente la stabilité et l'activité transcriptionnelle du RA complexé à son ligand dans le noyau. Son expression augmente après castration et protège les cellules tumorales de l'apoptose par plusieurs mécanismes. Un oligonucléotide anti-sens inhibant l'expression d'HSP27, OGX-427, associé à la prednisone a permis une diminution du PSA \geq 50% chez 11 sur 22 patients dans un essai de phase II.

5) Molécules ciblées dirigées contre voies de signalisation des facteurs de croissance et des cytokines.

Nous avons vu que, lors de l'échappement à la privation androgénique, l'activation du RA pouvait mettre en jeu diverses voies de signalisation de facteurs de croissance et de cytokines. De nombreuses études sont donc consacrées à l'étude chez l'homme de thérapies ciblées permettant l'inhibition de ces voies.

a) Inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/m-TOR.

Près de 100% des CaP métastatiques présentent des altérations de la voie de PI3K/Akt/mTOR, il semble donc particulièrement pertinent de tester l'efficacité de l'inhibition de cette voie d'échappement à la castration (83, 84).

Les essais portant sur les inhibiteurs de mTOR tels que l'everolimus et le temsirolimus ont donné des résultats décevants. L'inefficacité de ces inhibiteurs de mTOR semble pouvoir s'expliquer par deux mécanismes :

- la perte d'un rétrocontrôle négatif exercé par pS6K sur TORC2 : l'everolimus et le temsirolimus sont des inhibiteurs de TORC1, ils n'inhibent pas TORC2 (PDK2) qui est lui-même un activateur d'Akt. La kinase S6K, activée par TORC1, régule négativement la voie PI3K/Akt/mTOR en phosphorylant TORC2. En présence d'everolimus ou de temsirolimus, S6K n'est plus activée, et cette régulation négative est levée. Des inhibiteurs bivalents réprimant à la fois TORC1 et TORC2 sont en cours de développement ;

- les signaux des récepteurs à tyrosine kinase (RTK), qui activent les voies de PI3K/Akt/mTOR et de RAS/RAF/MAPK sont régulés négativement par TORC1. L'inhibition de TORC1 lève la régulation négative exercée par S6K sur IRS-1 (la phosphorylation de IRS-1 par S6K entraîne sa dégradation) qui est le substrat potentiel de plusieurs RTK, et en particulier d'IGFR-1, d'EGFR et de HER2/HER3.

Des inhibiteurs ciblant toutes les isoformes de PI3K, ou spécifiques d'isoformes, qui sont efficaces dans des modèles expérimentaux, sont en cours de développement clinique. On a vu toutefois que la voie d'Akt1 peut activer Akt de façon indépendante de PI3K, et ceci peut éventuellement compromettre l'efficacité des inhibiteurs de PI3K utilisés en monothérapie.

Des inhibiteurs d'Akt sont également à l'étude, ils semblent pour le moment moins efficaces que les inhibiteurs de PI3K; la raison est peut-être que PI3K est susceptible d'activer d'autres voies oncogéniques que Akt, en particulier SGK3.

b) Inhibiteurs de récepteurs à TK.

Le dasatinib, inhibiteur de c-kit et des tyrosines kinases cytoplasmiques de la famille de Abl et SRC, est également un puissant inhibiteur d'Akt1 (85). Le dasatinib inhibe la phosphorylation par SRC de la Tyr534 du RA induite par l'EGF de même que la phosphorylation par Akt1 de la Tyr267 induite par l'héréguline, et inhibe la croissance des xénogreffes de LNCaP chez les souris castrées. Les essais récents de traitement des CaP évolués par le Dasatinib en monothérapie ont donné des résultats décevants (86). D'autres inhibiteurs d'Akt1 sont à l'étude.

Les multiples interconnexions entre les différentes voies oncogéniques et l'inhibition de rétrocontrôles négatifs expliquent probablement également les résultats décevants des inhibiteurs des récepteurs de la famille HER, incluant gefitinib, erlotinib, trastuzumab et pertuzumab malgré le rôle connu de ces récepteurs, et en particulier de HER2/HER3 dans l'échappement à la castration. Aucun de ces agents n'a fait preuve d'une efficacité significative en monothérapie (87, 26, 88). Il a été montré, dans la lignée de CaP humain DU145, que l'inhibition d'EGFR1 par le cetuximab, le gefitinib ou l'erlotinib induisait la surexpression de ligands tels que l'EGF, la bétacelluline et l'héréguline et des récepteurs HER2, HER3 et HER4. L'inactivation de HER3 par un anticorps monoclonal restaurait la sensibilité à l'erlotinib (89).

Le cabozantinib est un inhibiteur de c-Met. Dans un essai de phase II comparatif chez des patients échappant à la castration et ayant reçu au plus une ligne de chimiothérapie, le cabozantinib a donné des résultats prometteurs (90). Bien que le taux de réponses objectives selon les critères RECIST ne fût que de 5%, une diminution objective des mensura-

tions tumorales a été observée chez 72% des patients, une diminution de $\geq 50\%$ du taux de phosphatase alcaline chez 57%, et une diminution des télépeptides C-terminaux (Ctx) chez 57%. Le PSA n'était pas corrélé à la réponse au cabozantinib. Le temps de progression médian était significativement plus élevé (24 semaines) dans le bras traité que dans le bras placebo (6 semaines). Les douleurs ont été améliorées chez 67% des patients. Les scintigraphies osseuses ont été améliorées chez 68% des patients, et normalisées chez 12%. Le cabozantinib fait donc preuve d'une efficacité remarquable sur les métastases osseuses.

c) Inhibition de la voie de l'interleukine-6.

Le siltuximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre l'IL-6, inhibe fortement la croissance de xénogreffes de la lignée PC-3. Cet anticorps a été testé en phase II chez des patients progressant après castration et une ligne de chimiothérapie. Les résultats ont été décevants, aucune réponse clinique n'a été observée, 23% des patients ont été stabilisés et seuls 3,8% des patients ont eu une diminution de leur taux de PSA $\geq 50\%$. Dans une étude de phase II comparative, les patients traités par l'association de siltuximab, mitoxantrone et prednisone ont eu une survie sans progression plus courte (97 jours) que ceux du bras contrôle traités par mitoxantrone et prednisone seules (228 jours), mais cette étude a pu être biaisée par des erreurs méthodologiques.

VI. CONCLUSION

Les patients traités par abiratérone ou par enzalutamide lorsqu'ils répondent, échappent malheureusement à ces thérapeutiques de deuxième ligne après des durées médianes de 6 à 12 mois. L'abiratérone n'a qu'une efficacité très modeste chez les patients qui ont échappé à l'enzalutamide (70, 91).

Après échappement à l'hormonothérapie, le traitement ne peut que reposer, comme pour les autres cancers que sur l'identification des voies de signalisation en cause et les tentatives de les inhiber de façon ciblée. Toutefois, le passage obligatoire par le RA reste un atout, et la combinaison d'approches visant d'une part à empêcher l'activation du RA, et d'autre part à inhiber les fonctions du RA activé devrait permettre une inhibition synergique de la croissance tumorale. Une telle approche a fait preuve de son efficacité dans le traitement des cancers du sein pour lesquels il été démontré qu'un inhibiteur de mTOR, l'everolimus pouvait restaurer la sensibilité à un inhibiteur d'aromatase, l'exemestane. Les résultats des essais d'association de l'everolimus et de bicalutamide chez l'homme ont été décevants.

L'inhibition de l'activation du RA par les voies de signalisation cellulaire non androgéno-dépendantes pose un problème complexe en raison de la multiplicité des voies potentiellement impliquées, des multiples interconnexions existant entre ces voies, et de la fréquence des mécanismes de rétrocontrôle qui activent une voie quand on inhibe l'autre. De plus, les voies oncogéniques mises en jeu dans les CaP semblent très hétérogènes d'un patient à l'autre. Il n'est dès lors pas étonnant qu'une thérapeutique ciblée utilisée en monothérapie ne soit efficace que chez une petite proportion de patients. Les recours possibles sont les thérapeutiques combinées basées sur l'analyse individuelle des voies oncogéniques activées dans chaque tumeur.

Plusieurs approches combinant inhibiteurs de la voie de mTOR et inhibiteurs de TK, anticorps monoclonaux dirigés contre des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, ou encore des inhibiteurs de MEK sont en cours d'essais cliniques.

Idéalement, chaque nouveau traitement chez un patient ayant échappé à la castration devrait s'appuyer sur l'analyse de marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse obtenue à partir d'échantillonnages tumoraux. Ce type d'examen permettrait d'évaluer le degré d'activation des principales voies oncogéniques et de rechercher la présence d'éventuels mutants du RA, permettant d'en déduire la stratégie thérapeutique la plus appropriée. Il devrait également être assorti d'une analyse pharmacodynamique permettant d'évaluer les effets métaboliques observés et le cas échéant d'adapter les posologies. La difficulté des échantillonnages tumoraux dans ce type de pathologie peut être contournée, en partie au moins, par des analyses effectuées sur les cellules tumorales circulantes, ou sur les ADN tumoraux circulants.

**1 INSERM U1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, France.
2 Service d'Oncologie et d'Hématologie, CHRU de Strasbourg, France.**

Adresse pour la correspondance : Professeur Jean-Pierre BERGERAT, Service d'Oncologie et d'Hématologie, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, BP 49, 67098 Strasbourg cedex
Tél : 03 88 12 76 82 – Fax : 03 88 12 76 69 – E-mail : Jean-Pierre.Bergerat@chru-strasbourg.fr

HORMONE THERAPY OF PROSTATE CANCER, MECHANISMS OF CASTRATION RESISTANCE AND NOVEL APPROACHES

by **Jean-Pierre BERGERAT^{1,2}, Philippe BARTHÉLÉMY^{1,2}, Irène ASMANE^{1,2}, Jean-Emmanuel KURTZ^{1,2} and Jocelyn CÉRALINE^{1,2}** (Strasbourg, France)

1) INSERM U1113, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, France.

2) Service d'Oncologie et d'Hématologie, CHRU de Strasbourg, France.

ABSTRACT

Medical castration is still the reference treatment of advanced prostate cancer. Castration is efficacious in most patients, but induces the development of resistance mechanisms, leading to treatment escape after an average of 18 months. Numerous mechanisms are involved in the escape of prostate cancer to castration, including enhanced androgen synthesis in the tumor cells, androgen receptor (AR) and/or coactivators overexpression, sensitization of AR to low androgen concentrations, emergence of AR activating mutations, and AR activation by growth factors and cytokines signalization pathways. Improving knowledge in this field as well as the concept that androgen receptor remains a key element for the transmission of tumor cells survival and growth signals even after the escape to castration have encouraged the development of new hormone therapy agents. Abiraterone, a potent inhibitor of androgen synthesis and enzalutamide, a potent anti-androgen, are more efficacious than the previously available second line treatments. However, patients who respond to these agents escape to their treatment after a mean duration of 6 to 12 months.

The escape to hormone therapy involves an androgen-independent activation of the AR by a complex interplay of growth factors and cytokine pathways including IGF1, EGFR1-4, PI3K/Akt, Wnt, c-Met, Il-4 and IL-6. The design of targeted therapies able to control these pathways, and the development of techniques to determine their implication in each tumor is a major challenge the ongoing translational research.

Key-words : Prostate cancer, androgen receptor, hormone therapy, castration resistance.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Bray, F., J. Lortet-Tieulent, J. Ferlay, et al** : Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: an overview. *Eur J Cancer* 2010, **46**: 3040-3052.
2. **Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, et al** : Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, **61**: 69-90.
3. **Yadav, N., H. V. Heemers** Androgen action in the prostate gland. *Minerva Urol Nefrol* 2012, **64**: 35-49.
4. **Damber, J. E.** Endocrine therapy for prostate cancer. *Acta Oncol* 2005, **44**: 605-609.
5. **Brooke, G. N., C. L. Bevan** The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Curr Genomics* 2009, **10**: 18-25.
6. **Koochekpour, S.** Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. *Asian J Androl* 2010, **12**: 639-657.
7. **Nadiminty, N., A. C. Gao** Mechanisms of persistent activation of the androgen receptor in CRPC: recent advances and future perspectives. *World J Urol* 2012, **30**: 287-295.
8. **Nyquist, M. D., S. M. Dehm** Interplay between genomic alterations and androgen receptor signaling during prostate cancer development and progression. *Horm Cancer* 2013, **4**: 61-69.
9. **Eichholz, A., R. Ferraldeschi, G. Attard, et al** : Putting the brakes on continued androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012, **360**: 68-75.
10. **Leibowitz-Amit, R., A. M. Joshua** Targeting the androgen receptor in the management of castration-resistant prostate cancer: rationale, progress, and future directions. *Curr Oncol* 2012, **19**: S22-31.
11. **Claessens, F., S. Denayer, N. Van Tilborgh, et al** : Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nucl Recept Signal* 2008, **6**: e008.
12. **Feng, W., R. C. Ribeiro, R. L. Wagner, et al** : Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 1998, **280**: 1747-1749.
13. **Heinlein, C. A., C. Chang** Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 2002, **23**: 175-200.
14. **Chmelar, R., G. Buchanan, E. F. Need, et al** : Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer* 2007, **120**: 719-733.
15. **Heemers, H. V., D. J. Tindall** Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007, **28**: 778-808.
16. **Burd, C. J., L. M. Morey, K. E. Knudsen** Androgen receptor corepressors and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006, **13**: 979-994.
17. **McEwan, I. J., J. Gustafsson** Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**: 8485-8490.
18. **Lee, D. K., H. O. Duan, C. Chang** Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation. *J Biol Chem* 2001, **276**: 9978-9984.
19. **Lee, D. K., M. Li, C. Chang** The second largest subunit of RNA polymerase II interacts with and enhances transactivation of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **302**: 162-169.
20. **Sato, N., M. D. Sadar, N. Bruchovsky, et al** : Androgenic induction of prostate-specific antigen gene is repressed by protein-protein interaction between the androgen receptor and AP-1/c-Jun in the human prostate cancer cell line LNCaP. *J Biol Chem* 1997, **272**: 17485-17494.
21. **Coffey, K., C. N. Robson** Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. *J Endocrinol* 2012, **215**: 221-237.
22. **Wang, L., H. K. Lin, Y. C. Hu, et al** : Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells. *J Biol Chem* 2004, **279**: 32444-32452.
23. **Guo, Z., B. Dai, T. Jiang, et al** : Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer Cell* 2006, **10**: 309-319.
24. **Feldman, B. J., D. Feldman** The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001, **1**: 34-45.
25. **Aschelter, A. M., S. Giacinti, P. Caporello, et al** : Genomic and epigenomic alterations in prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012, **3**: 128.
26. **Karantanos, T., P. G. Corn, T. C. Thompson** Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene* 2013, doi: 10.1038/onc.2013.206.
27. **Cai, C., S. P. Balk** Intratumoral androgen biosynthesis in prostate cancer pathogenesis and response to therapy. *Endocr Relat Cancer* 2011, **18**: R175-182.
28. **Montgomery, R. B., E. A. Mostaghel, R. Vessella, et al** : Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res* 2008, **68**: 4447-4454.
29. **Ishizaki, F., T. Nishiyama, T. Kawasaki, et al** : Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer. *Sci Rep* 2013, **3**: 1528, doi: 10.1038/srep01528.
30. **Sharifi, N.** Minireview: Androgen metabolism in castration-resistant prostate cancer. *Mol Endocrinol* 2013, **27**: 708-714.
31. **Visakorpi, T., E. Hyytinen, P. Koivisto, et al** : In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995, **9**: 401-406.
32. **Linja, M. J., K. J. Savinainen, O. R. Saramaki, et al** : Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2001, **61**: 3550-3555.
33. **Jenster, G.** Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines. *J Pathol* 2000, **191**: 227-228.
34. **Gregory, C. W., R. T. Johnson, Jr., J. L. Mohler, et al** : Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 2001, **61**: 2892-2898.
35. **Gottlieb, B., L. K. Beitel, A. Nadarajah, et al** : The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 2012, **33**: 887-894.
36. **Zhang, X., C. Morrissey, S. Sun, et al** : Androgen receptor variants occur frequently in castration resistant prostate cancer metastases. *PLoS One* 2011, **6**: e27970.
37. **Hay, C. W., I. J. McEwan** The impact of point mutations in the human androgen receptor: classification of mutations on the basis of transcriptional activity. *PLoS One*

2012, **7**: e32514. **38. Ceraline, J., E. Erdmann, P. Erbs, et al** : A yeast-based functional assay for the detection of the mutant androgen receptor in prostate cancer. *Eur J Endocrinol* 2003, **148**: 99-110. **39. Lapouge, G., G. Marcias, E. Erdmann, et al** : Specific properties of a C-terminal truncated androgen receptor detected in hormone refractory prostate cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008, **617**: 529-534. **40. Bergerat, J. P., J. Ceraline** Pleiotropic functional properties of androgen receptor mutants in prostate cancer. *Hum Mutat* 2009, **30**: 145-157. **41. Monge, A., M. Jagla, G. Lapouge, et al** : Unfaithfulness and promiscuity of a mutant androgen receptor in a hormone-refractory prostate cancer. *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**: 487-497. **42. Jagla, M., M. Feve, P. Kessler, et al** : A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology* 2007, **148**: 4334-4343. **43. Van de Wijngaert, D. J., H. J. Dubbink, M. E. van Royen, et al** : Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol* 2012, **352**: 57-69. **44. Askew, E. B., J. T. Minges, A. T. Hnat, et al** : Structural features discriminate androgen receptor N/C terminal and coactivator interactions. *Mol Cell Endocrinol* 2012, **348**: 403-410. **45. Ceraline, J., M. D. Cruchant, E. Erdmann, et al** : Constitutive activation of the androgen receptor by a point mutation in the hinge region: a new mechanism for androgen-independent growth in prostate cancer. *Int J Cancer* 2004, **108**: 152-157. **46. Dehm, S. M., L. J. Schmidt, H. V. Heemers, et al** : Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 2008, **68**: 5469-5477. **47. Guo, Z., X. Yang, F. Sun, et al** : A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. *Cancer Res* 2009, **69**: 2305-2313. **48. Hu, R., T. A. Dunn, S. Wei, et al** : Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2009, **69**: 16-22. **49. Marcias, G., E. Erdmann, G. Lapouge, et al** : Identification of novel truncated androgen receptor (AR) mutants including unreported pre-mRNA splicing variants in the 22Rv1 hormone-refractory prostate cancer (PCa) cell line. *Hum Mutat* 2010, **31**: 74-80. **50. Li, Y., S. C. Chan, L. J. Brand, et al** : Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2013, **73**: 483-489. **51. Harada, N., K. Inoue, R. Yamaji, et al** : Androgen deprivation causes truncation of the C-terminal region of androgen receptor in human prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Sci* 2012, **103**: 1022-1027. **52. Lapouge, G., E. Erdmann, G. Marcias, et al** : Unexpected paracrine action of prostate cancer cells harboring a new class of androgen receptor mutation--a new paradigm for cooperation among prostate tumor cells. *Int J Cancer* 2007, **121**: 1238-1244. **53. Cottard, F., I. Asmane, E. Erdmann, et al** : Constitutively active androgen receptor variants upregulate expression of mesenchymal markers in prostate cancer cells. *PLoS One* 2013, **8**: e63466. **54. Yuan, X., S. P. Balk** Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration. *Urol Oncol* 2009, **27**: 36-41. **55. Dasgupta, S., S. Srinidhi, J. K. Vishwanatha** Oncogenic activation in prostate cancer progression and metastasis: Molecular insights and future challenges. *J Carcinog* 2012, **11**: 4. **56. Dulinska-Litewka, J., J. A. McCubrey, P. Laidler** Increased Akt signaling resulting from the loss of androgen responsiveness in prostate cancer. *Curr Med Chem* 2013, **20**: 144-157. **57. Yu, S. Q., K. P. Lai, S. J. Xia, et al** : The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. *Asian J Androl* 2009, **11**: 39-48. **58. Mahajan, N. P., Y. Liu, S. Majumder, et al** : Activated Cdc42-associated kinase Ack1 promotes prostate cancer progression via androgen receptor tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**: 8438-8443. **59. Mahajan, N. P., Y. E. Whang, J. L. Mohler, et al** : Activated tyrosine kinase Ack1 promotes prostate tumorigenesis: role of Ack1 in polyubiquitination of tumor suppressor Wwox. *Cancer Res* 2005, **65**: 10514-10523. **60. Mahajan, K., N. P. Mahajan** Shepherding AKT and androgen receptor by Ack1 tyrosine kinase. *J Cell Physiol* 2010, **224**: 327-333. **61. Mahajan, K., D. Coppola, S. Challa, et al** : Ack1 mediated AKT/PKB tyrosine 176 phosphorylation regulates its activation. *PLoS One* 2010, **5**: e9646. **62. Knudsen, B. S., M. Edlund** Prostate cancer and the met hepatocyte growth factor receptor. *Adv Cancer Res* 2004, **91**: 31-67. **63. Hurle, R. A., G. Davies, C. Parr, et al** : Hepatocyte growth factor/scatter factor and prostate cancer: a review. *Histol Histopathol* 2005, **20**: 1339-1349. **64. Culig, Z.** New insights into the role of interleukin-6 in human prostate cancer. *J Urol* 2009, **182**: 1255-1256. **65. Culig, Z., M. Pühr** Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012, **360**: 52-58. **66. Oh, W. K.** Secondary hormonal therapies in the treatment of prostate cancer. *Urology* 2002, **60**: 87-92; discussion 93. **67. Rove, K. O., E. D. Crawford** Androgen annihilation as a new therapeutic paradigm in advanced prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2013, **23**: 208-213. **68. Ferraldeschi, R., N. Sharifi, R. J. Auchus, et al** : Molecular Pathways: Inhibiting Steroid Biosynthesis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2013, **19**: 3353-3359. **69. Li, R., K. Evaul, K. K. Sharma, et al** : Abiraterone inhibits 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a rationale for increasing drug exposure in castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2012, **18**: 3571-3579. **70. Loriot, Y., D. Bianchini, E. Ileana, et al** : Antitumour activity of abiraterone acetate against metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel and enzalutamide (MDV3100). *Ann Oncol* 2013, **24**: 1807-1812. **71. Ryan, C. J., M. R. Smith, J. S. de Bono, et al** : Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med* 2013, **368**: 138-148. **72. Ferraldeschi, R., J. de Bono** Agents that target androgen synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cancer J* 2013, **19**: 34-42. **73. Golshayan, A. R., E. S. Antonarakis** Enzalutamide: an evidence-based review

of its use in the treatment of prostate cancer. *Core Evid* 2013, **8**: 27-35. **74. Scher, H. I., K. Fizazi, F. Saad, et al** : Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med* 2012, **367**: 1187-1197. **75. Rathkopf, D., H. I. Scher** Androgen receptor antagonists in castration-resistant prostate cancer. *Cancer J* 2013, **19**: 43-49. **76. Balbas, M. D., M. J. Evans, D. J. Hosfield, et al** : Overcoming mutation-based resistance to antiandrogens with rational drug design. *Elife* 2013, **2**: e00499. **77. Joseph, J. D., N. Lu, J. Qian, et al** : A clinically relevant androgen receptor mutation confers resistance to 2nd generation anti-androgens enzalutamide and ARN-509. *Cancer Discov* 2013. **78. Watson, P. A., Y. F. Chen, M. D. Balbas, et al** : Constitutively active androgen receptor splice variants expressed in castration-resistant prostate cancer require full-length androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**: 16759-16765. **79. Myung, J. K., C. A. Banuelos, J. G. Fernandez, et al** : An androgen receptor N-terminal domain antagonist for treating prostate cancer. *J Clin Invest* 2013, **123**: 2948-2960. **80. Haag, P., J. Bektic, G. Bartsch, et al** : Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005, **96**: 251-258. **81. Lee, J. B., K. Zhang, Y. Y. Tam, et al** : Lipid nanoparticle siRNA systems for silencing the androgen receptor in human prostate cancer in vivo. *Int J Cancer* 2012, **131**: E781-790. **82. Eder, I. E., M. Egger, H. Neuwirt, et al** : Enhanced inhibition of prostate tumor growth by dual targeting the androgen receptor and the regulatory subunit type α of protein kinase A in vivo. *Int J Mol Sci* 2013, **14**: 11942-11962. **83. Sarker, D., A. H. Reid, T. A. Yap, et al** : Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009, **15**: 4799-4805. **84. Bitting, R. L., A. J. Armstrong** Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013, **20**: R83-99. **85. Liu, Y., M. Karaca, Z. Zhang, et al** : Dasatinib inhibits site-specific tyrosine phosphorylation of androgen receptor by Ack1 and Src kinases. *Oncogene* 2010, **29**: 3208-3216. **86. Twardowski, P. W., J. H. Beumer, C. S. Chen, et al** : A phase II trial of dasatinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer treated previously with chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2013, **24**: 743-753. **87. Semenas, J., C. Allegrucci, S. A. Boorjian, et al** : Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer. *Curr Drug Targets* 2012, **13**: 1308-1323. **88. Liu, G., Y. H. Chen, J. Kolesar, et al** : Eastern Cooperative Oncology Group Phase II Trial of lapatinib in men with biochemically relapsed, androgen dependent prostate cancer. *Urol Oncol* 2013, **31**: 211-218. **89. Carrion-Salip, D., C. Panosa, J. A. Menendez, et al** : Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands. *Int J Oncol* 2012, **41**: 1128-1138. **90. Smith, D. C., M. R. Smith, C. Sweeney, et al** : Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. *J Clin Oncol* 2013, **31**: 412-419. **91. Noonan, K. L., S. North, R. L. Bitting, et al** : Clinical activity of abiraterone acetate in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after enzalutamide. *Ann Oncol* 2013, **24**: 1802-1807.

NOTES