

Ciblage thérapeutique de l'autophagie dans les hémopathies malignes

Therapeutic targeting of autophagy in malignant haemopathies

Arnaud Jacquel
Frédéric Luciano
Guillaume Robert
Patrick Auberger

Université Côte d'Azur
Centre méditerranéen de médecine moléculaire
Bâtiment ARCHIMED
151, route de Saint-Antoine
de Ginestière
BP 23194, 06204 Nice Cedex 2
France
<arnaud.jacquel@unice.fr>
<frederic.luciano@unice.fr>
<guillaume.robert@unice.fr>
<patrick.auberger@unice.fr>

Remerciements et autres mentions :

Financement : Inserm ; Fondation ARC contre le cancer, équipe labellisée ; Ligue nationale contre le cancer LNCC, équipe labellisée ; Association Laurette Fugain ; INCa.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Tirés à part : P. Auberger

*Cet article, réactualisé en 2018, est déjà paru en 2016 dans l'ouvrage *Les nouvelles cibles épigénétiques*.

RÉSUMÉ

Le terme autophagie désigne un ensemble de processus cataboliques, dont le point commun est la dégradation finale de macromolécules et d'organelles par le lysosome. La macro-autophagie (autophagie) débute par la nucléation d'un phagophore provenant de membranes intracellulaires. Après expansion, les extrémités du phagophore fusionnent pour former un autophagosome au sein duquel le matériel à dégrader est séquestré. La dégradation s'opère après fusion avec le lysosome qui délivre les enzymes nécessaires à ce processus. Le matériel ainsi dégradé est éliminé ou génère des molécules simples qui peuvent être réutilisées par la cellule dans des conditions adverses. L'autophagie médiée par les chaperonnes est une forme très sélective d'autophagie qui permet la dégradation des protéines cytosoliques portant une séquence peptidique de type KFERQ. La protéine substrat est d'abord reconnue par un chaperon moléculaire HSC70 et présentée au récepteur LAMP2A (*lysosomal-associated membrane protein 2A*), qui sert de transporteur pour le complexe protéine substrat/HSC70. Une fois transloquée au sein du lysosome, la protéine substrat est dégradée. Ces deux formes d'autophagie jouent un rôle important au cours de la différenciation physiologique des cellules hématopoïétiques, mais également lors de la leucémogénèse. L'autophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes peuvent avoir un effet suppresseur ou promoteur de tumeur en fonction du contexte. Les thérapies actuellement utilisées pour traiter les hémopathies malignes peuvent induire ou au contraire inhiber ces deux types d'autophagie. Dans ce contexte, la modulation des processus d'autophagie s'est imposée comme une stratégie thérapeutique pertinente, notamment dans les hémopathies malignes. Cependant, compte tenu de la complexité de la régulation des processus d'autophagie, il est particulièrement important de définir dans chaque type d'hémopathies malignes ou, quand et comment le ciblage de l'autophagie sera le plus efficace. Dans cet article, nous faisons le point sur le rôle de l'autophagie dans les hémopathies malignes et décrivons les essais cliniques en cours utilisant des modulateurs de l'autophagie pour améliorer l'arsenal thérapeutique disponible.

● **Mots clés :** autophagie ; autophagie médiée par les chaperonnes ; hémopathies malignes ; résistance aux thérapies.

ABSTRACT

The term 'autophagy' refers to a set of catabolic processes which have the common characteristic of leading to degradation of macromolecules and organelles by the lysosome. Macroautophagy (or autophagy) is initiated by nucleation of a phagophore, derived from intracellular membranes. Following expansion, the ends of the phagophore join to form an autophagosome, in which the material to be degraded is sequestered. Material degradation takes place following fusion with the lysosome, which delivers the enzymatic activities necessary for this catabolic process. The degraded material is eliminated or generates simple molecules that can be

Pour citer cet article : Jacquel A, Luciano F, Robert G, Auberger P. Ciblage thérapeutique de l'autophagie dans les hémopathies malignes. *Innov Ther Oncol* 2018 ; 4 : 241-253. doi : 10.1684/ito.2018.0141

reused by the cell in adverse conditions. Chaperone-mediated autophagy (CMA) is a highly selective form of autophagy that allows the degradation of cytosolic proteins endowed with a KFERQ-like peptide sequence. The protein substrate is first recognised by a molecular chaperone, HSC70, and delivered to the lysosomal associated membrane receptor (LAMP2A), which serves as a transporter for the linearised protein substrate. Once translocated inside the lumen of the lysosome, the protein substrate is degraded. These two forms of autophagy play a key role in the physiological differentiation of haematopoietic cells, as well as during leukemogenesis. Autophagy and CMA may also exert tumour promoter or suppressive functions depending on the cellular context. Most cancer treatments currently used are thought to affect both processes. In this context, modulation of autophagy has become a pertinent therapeutic option, notably for haematopoietic malignancies. However, given the complexity of autophagy regulation, it is crucial to define, for each subset of haematopoietic malignancy, where, when and how targeting autophagy will be the most efficient. In this article, we address the role of autophagy in haematopoietic malignancies and describe ongoing clinical trials in which modulators of autophagy are used to improve the available therapeutic armamentarium.

● **Key words:** autophagy; chaperone-mediated autophagy; malignant haemopathies; resistance to therapies.

Le maintien de l'homéostasie cellulaire dépend d'une balance finement régulée entre la néosynthèse et la dégradation de macromolécules et d'organelles. La macro-autophagie (autophagie) joue un rôle essentiel dans le catabolisme cellulaire en acheminant les macromolécules mal repliées, agrégées ou surnuméraires, ainsi que les organelles obsolètes ou dangereuses vers les lysosomes afin d'en assurer la dégradation et le recyclage [1]. Cette voie majeure de dégradation cellulaire permet ainsi de générer des molécules simples, qui peuvent éventuellement être réutilisées afin de promouvoir la survie cellulaire dans différentes conditions de stress, nutritionnels ou environnementaux. L'autophagie joue donc avant tout un rôle dans le maintien de la survie et de l'homéostasie cellulaire. Cependant dans certaines circonstances, qui commencent à être mieux élucidées, elle peut également favoriser la mort cellulaire [2]. Des altérations de ce processus vital sont impliquées dans de nombreuses pathologies humaines et notamment dans l'oncogenèse [3].

La fonction suppressive de tumeur de l'autophagie est notamment associée à sa capacité de piéger les organelles endommagées, empêchant ainsi l'accumulation de radicaux libres oxygénés toxiques, limitant de ce fait l'instabilité génomique. De manière paradoxale, dans les tumeurs établies, l'autophagie peut promouvoir la survie des cellules cancéreuses, opérant de ce fait comme un mécanisme pro-tumoral. Cette dualité d'action de l'autophagie peut représenter une opportunité pour son ciblage thérapeutique dans les cellules cancéreuses [4]. Certains traitements chimiothérapeutiques peuvent en effet induire une autophagie protectrice et, dans ce

contexte, l'inhibition de l'autophagie sera avantageuse pour une meilleure prise en charge thérapeutique de certains cancers. Alternativement, l'induction d'une mort autophagique pourra se révéler judicieuse dans des cellules cancéreuses qui sont souvent résistantes à d'autres types de mort cellulaire, telle que l'apoptose [5].

La mécanistique de l'autophagie

À la suite d'une carence énergétique ou nutritionnelle ou d'un stress, l'induction de l'autophagie par différentes voies de signalisation intracellulaires conduit à la nucléation *de novo* d'une vésicule appelée phagophore provenant le plus souvent du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie. Après une étape d'expansion, les extrémités du phagophore fusionnent pour former un autophagosome, organelle qui assure la séquestration des constituants cytoplasmiques à dégrader [6]. L'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome qui délivre les hydrolases nécessaires à la digestion complète du contenu de l'autolysosome ainsi généré. L'ensemble de ces étapes est présenté *figure 1*.

La biogenèse de l'autophagosome dépend de la mise en place successive de différents complexes multimoléculaires constitués de protéines connues pour la plupart d'entre elles sous l'acronyme ATG (*autophagy-related genes*) [7]. Le complexe protéique impliqué dans la genèse du phagophore comprend notamment la sérine/thréonine kinase ULK1 (*unc-51-like autophagy-activating kinase*) ainsi que les protéines ATG13, FIP200 et ATG101. La nucléation du phagophore dépend pour sa part du

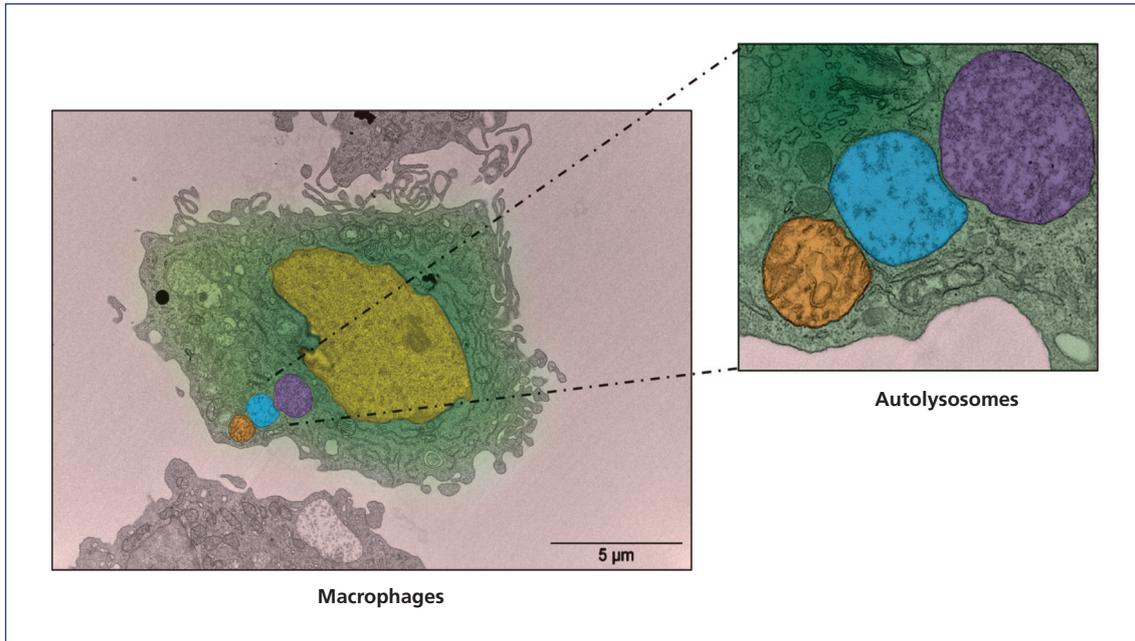


Figure 1. Analyse par microscopie électronique de l'autophagie lors de la différenciation physiologique du monocyte en macrophage. Mise en évidence de trois vésicules autophagiques au cours de la différenciation physiologique de monocytes humains en macrophages induite par stimulation avec du CSF-1 (*colony stimulating factor*). Les pointillés montrent l'agrandissement d'une structure à double membrane caractéristique d'un autolysosome issu de la fusion d'un autophagosome et d'un lysosome. Ces autolysosomes contiennent des organelles et du matériel cytoplasmique à dégrader.

Figure 1. Use of electronic microscopy to reveal autophagy during the physiological differentiation of monocytes into macrophages. The diagram shows three autophagic vesicles during physiological differentiation of human monocytes into macrophages induced by stimulation with CSF-1 (*colony stimulating factor*). The dotted lines show the enlargement of a double membrane structure, characteristic of an autolysosome resulting from the fusion of an autophagosome and lysosome. These autolysosomes contain organelles and cytoplasmic material to be degraded.

complexe ATG6 ou BECLIN-1 associé à la PI3 kinase (PI3K) de classe III ou VPS34. La régulation de ce complexe fait appel à de nombreuses autres protéines (ATG14, Ambra, VPS24, UVRAG, etc.). Les deux systèmes de conjugaison ATG5-ATG12 et ATG8 (LC3-I)-phosphatidyl-éthanolamine (LC3-PE) sont, pour leur part, essentiels à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome. La conjugaison de la protéine ATG8 (LC3-I) avec le lipide membranaire (PE) nécessite un clivage préalable par une protéase ATG4, mais également un système enzymatique composé des protéines ATG3 et ATG7 (*figure 2*).

Schématiquement, deux voies principales de signalisation interviennent dans la modulation de l'autophagie : la sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une voie majeure de survie cellulaire qui agit comme un régulateur négatif de ce processus [8, 9] et l'AMPK (*adenosine monophosphate-dependent protein kinase*) qui stimule l'autophagie par un mécanisme encore incomplètement identifié [10]. En fonction des besoins énergétiques de la cellule, le complexe mTOR contrôle l'induction de l'autophagie en réprimant par phosphorylation l'activité de la kinase ULK1, ce qui contribue à bloquer l'étape initiale de formation du phagophore. L'AMPK phosphoryle directement ULK1 sur la sérine 555, ce qui conduit à son activation et à l'induction de l'autophagie [7].

L'autophagie médiée par les chaperonnes

L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) est avec le système ubiquitine/protéasome (UPS) la voie principale de dégradation sélective des protéines au sein de la cellule [11]. Au cours de la CMA, et contrairement aux autres modes de dégradation dépendant du lysosome, la protéine substrat est directement transportée à travers la membrane afin d'être dégradée par les protéases résidant dans cette organelle (*figure 3*). La CMA est une forme très sélective d'autophagie qui permet la prise en charge et la dégradation de substrats protéiques portant une séquence peptidique de type KFERQ, présente dans environ 30 % des protéines cellulaires [12]. Le processus de dégradation par CMA se fait en quatre étapes distinctes [13] :

- la reconnaissance du substrat présentant un motif KFERQ par la chaperonne cytosolique HSC70 ;
- la reconnaissance du substrat et sa linéarisation qui sont indispensables à la liaison au récepteur LAMP2A ;
- la translocation du substrat au sein du lysosome ;
- et la dégradation de la protéine substrat dans le compartiment lysosomal à la suite de sa dissociation du complexe LAMP2A.

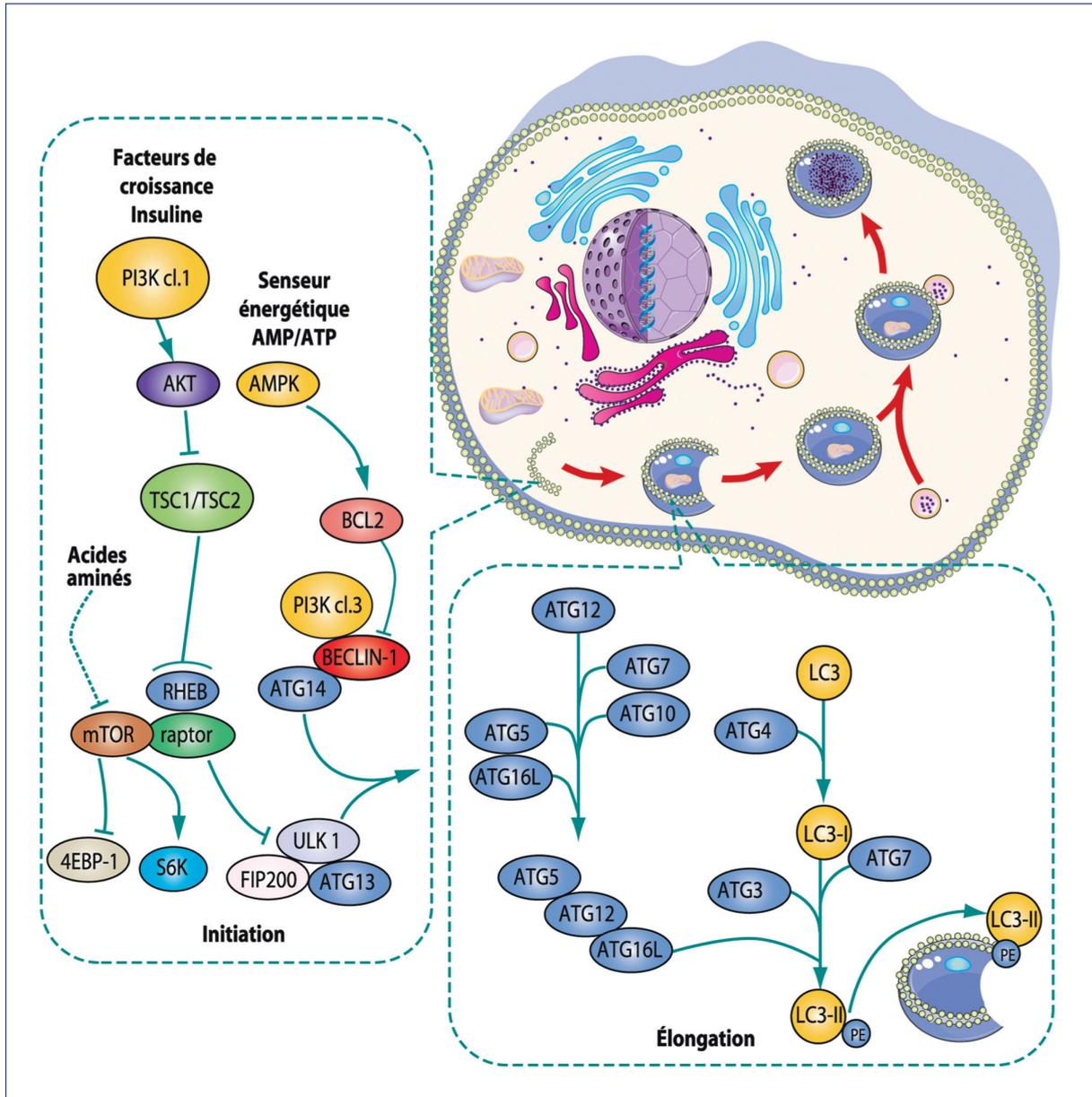


Figure 2. Les voies de signalisation de l'autophagie. La biogenèse de l'autophagosome dépend de la mise en place successive de différents complexes multimoléculaires constitués de protéines ATG. Plusieurs dizaines de protéines ATG contrôlent les différentes étapes de l'autophagie : de l'initiation du processus à la dégradation finale du contenu de l'autolysosome.

La genèse du phagophore est contrôlée par la sérine/thréonine kinase ULK1 et les protéines ATG13, FIP200 et ATG101.

La nucléation du phagophore dépend du complexe BECLIN1-Pi3Kinase de classe III ou Vps34. La régulation de ce complexe fait appel à de nombreuses autres protéines (ATG14, Ambra, Vps24, UVRAG par exemple).

Les deux systèmes de conjugaison ATG5-ATG12 et ATG8 (LC3-I)-phosphatidyl-éthanolamine (LC3-PE) sont, pour leur part, essentiels à l'élongation et à la fermeture de l'autophagosome. Il convient de noter que la conjugaison de la protéine ATG8 (LC3-I) avec le lipide membranaire (PE) nécessite un clivage préalable par une protéase ATG4, mais également un système enzymatique composé des protéines ATG3 et ATG7.

Figure 2. Autophagy signalling pathways. Biogenesis of the autophagosome depends on the successive establishment of different multimolecular complexes made up of ATG proteins. Several dozens of ATG proteins control different stages of autophagy: from initiation of the process through to ultimate degradation of the autolysosome content. Genesis of the phagophore is controlled by serine/threonine kinase ULK1 as well as ATG13, FIP200 and ATG101 proteins. Nucleation of the phagophore depends on the BECLIN1-Pi3Kinase Class III complex or Vps34. Regulation of this complex requires several other proteins (ATG14, Ambra, Vps24, and UVRAG, for example). The two conjugation systems, ATG5-ATG12 and ATG8 (LC3-I)-phosphatidylethanolamine (LC3-PE), are essential to the elongation and closing of the autophagosome. It should be noted that conjugation of the ATG8 (LC3-I) protein with the membrane lipid (PE) requires prior division by ATG4 protease, but also an enzymatic system consisting of ATG3 and ATG7 proteins.

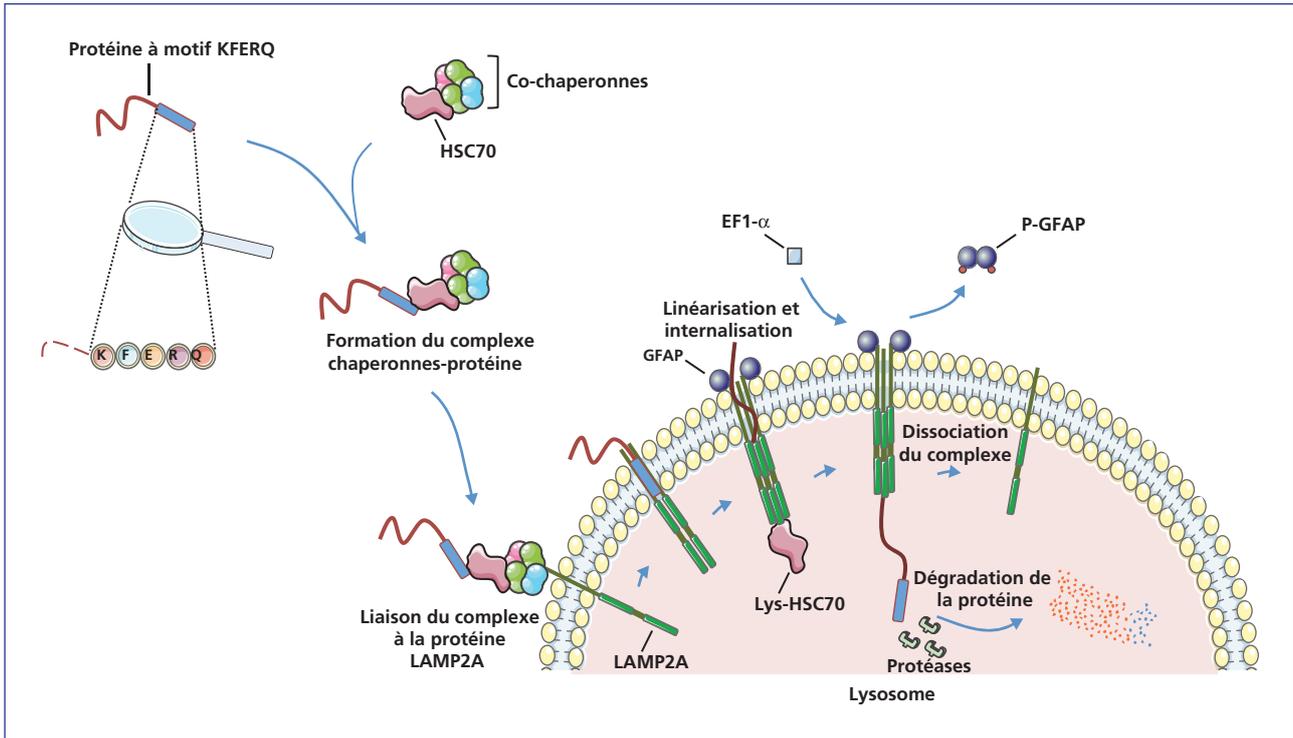


Figure 3. L'autophagie médiée par les chaperonnes ou CMA. La CMA prend en charge des substrats protéiques portant une séquence peptidique de type KFERQ. Ce processus catabolique est réalisé en quatre étapes distinctes : (1) la reconnaissance du substrat par un complexe de chaperonnes comprenant HSC70 ; (2) la liaison du complexe au récepteur LAMP2A, suivie de la linéarisation de la protéine ; (3) la translocation du substrat au sein du lysosome ; et (4) la dégradation de la protéine substrat par les protéases lysosomales à la suite de sa dissociation du complexe composé d'un hétérotrimère de LAMP2A.

Figure 3. Autophagy mediated by chaperones or CMA. CMA processes protein substrates which carry a KFERQ-like peptide sequence. This catabolic process takes place in four distinct stages: (1) recognition of the substrate by a chaperone complex including HSC70; (2) binding of the complex to the LAMP2A receptor, followed by linearisation of the protein; (3) translocation of the substrate to the lysosome; and (4) degradation of the protein substrate by lysosomal proteases following its dissociation from a LAMP2A heterotrimer complex.

Une vingtaine de substrats de la CMA ont été caractérisés et des résultats récents de la littérature proposent un rôle important de la CMA dans la tumorigénèse en général et la leucémogénèse en particulier [14].

L'autophagie en tant que cible thérapeutique potentielle en onco-hématologie

Les kinases mTOR et AMPK peuvent ainsi être ciblées pour réprimer ou bien au contraire induire l'autophagie. Ainsi, les inhibiteurs de mTOR (dont la rapamycine [sirolimus] est le chef de file) et les activateurs de l'AMPK, tels que la metformine ou l'acadésine (AICAR [5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-ribofuranoside]), sont des modulateurs de l'autophagie [15, 16] (figure 4A). Par ailleurs, des inhibiteurs de l'autophagie, tels que l'hydroxychloroquine (HCQ, Plaquenil®), sont récemment entrés dans plusieurs essais cliniques de phase III dans des tumeurs solides ou des hémopathies malignes, soulignant l'intérêt

de la modulation de ce processus en cancérologie (figure 4B).

Ciblage de l'autophagie dans les syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ont en commun une hyperproduction par la moelle osseuse des cellules d'une ou plusieurs lignées myéloïdes, une maturation normale ou quasi normale des cellules sanguines et, enfin, leur chronicité. La pathologie pour laquelle l'intérêt du ciblage thérapeutique de l'autophagie apparaît clairement est la leucémie myéloïde chronique (LMC). Cette hémopathie résulte d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (chromosome Philadelphie) [17]. La conséquence de ce réarrangement est la synthèse d'une protéine chimérique BCR-ABL porteuse d'une activité tyrosine kinase (TK) constitutive expliquant l'insensibilité des cellules souches à une apoptose spontanée ou chimio-induite. La dérégulation de BCR-ABL induit plusieurs voies de

signalisation qui confèrent aux cellules de LMC un avantage prolifératif et une résistance à l'apoptose [18] (figure 5). L'impact de BCR-ABL sur l'autophagie reste à ce jour sujet à controverse. Ainsi, une publication récente montre que l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR par BCR-ABL conduit à une inhibition de l'autophagie [19]. À l'inverse, d'autres études démontrent que l'activation de l'autophagie par BCR-ABL participerait à la leucémogénèse des cellules de LMC

[20, 21]. En accord avec cette notion, certaines lignées cellulaires de LMC (K562, KCL22) présentent un flux autophagique très important, suggérant l'existence de mécanismes moléculaires capables de contourner les effets de la suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR par BCR-ABL. Une des hypothèses émises serait la présence dans ces lignées de niveaux très élevés d'espèces réactives de l'oxygène capables d'induire l'autophagie par l'intermédiaire de l'AMPK.

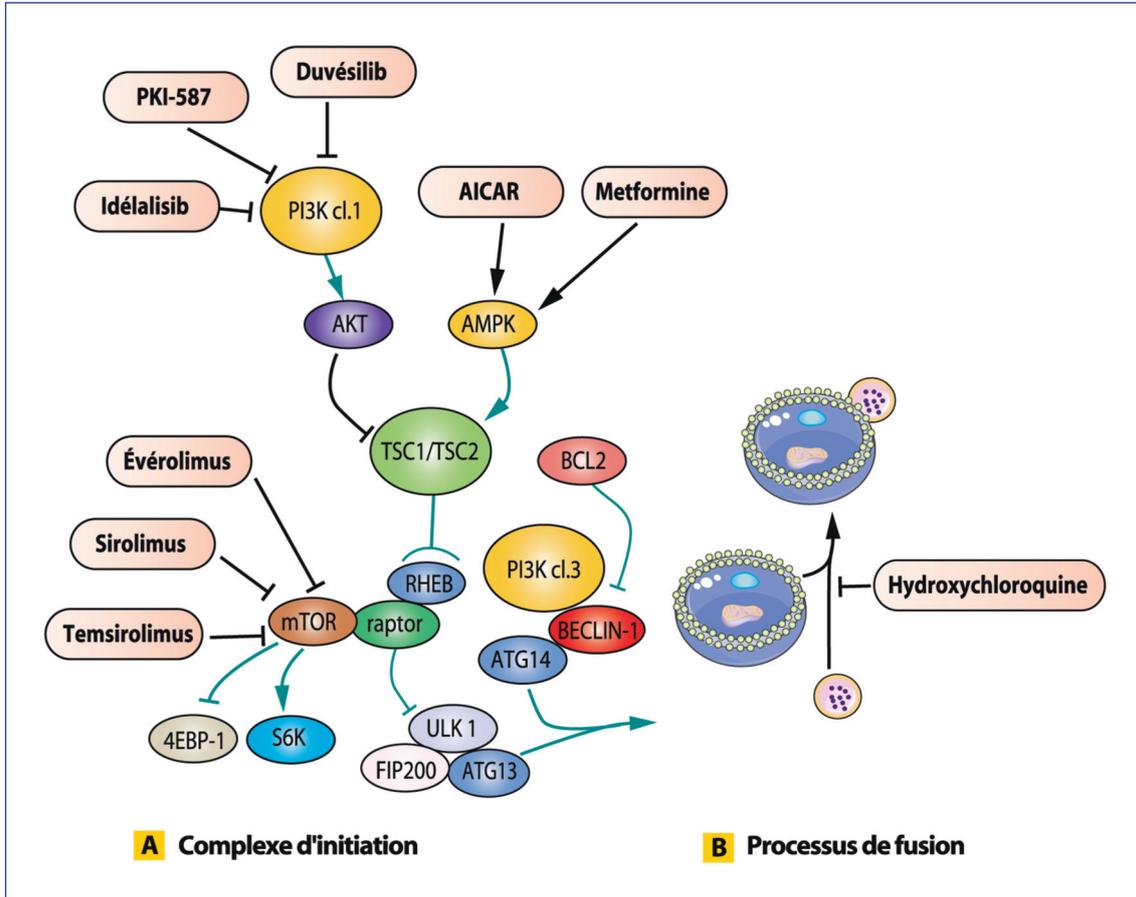


Figure 4. Régulation de l'autophagie par la voie mTOR/AMPK. Deux voies principales de signalisation interviennent dans la modulation de l'autophagie : la sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), une voie majeure de survie cellulaire qui agit comme un régulateur négatif de ce processus, et l'AMPK (*adenosine monophosphate protein kinase*) qui stimule l'autophagie. En fonction des besoins énergétiques de la cellule, le complexe mTOR contrôle l'induction de l'autophagie en réprimant par phosphorylation l'activité de la kinase ULK1, ce qui contribue à bloquer l'étape initiale de formation du phagosome. L'AMPK pour sa part phosphoryle directement ULK1 sur la sérine 555, ce qui conduit à son activation et à l'induction de l'autophagie. Plusieurs composés actifs sur le processus d'autophagie sont en phase d'essai clinique pour le traitement de certaines tumeurs solides ou hématopoïétiques comme le sirolimus et l'évérolimus, deux rapalogues inhibiteurs de mTOR, l'AICAR et la metformine (deux activateurs de l'AMPK) et le PKI-587 (un inhibiteur des PI3K de classe 1).

Figure 4. Regulation of autophagy by the mTOR/AMPK pathway. Two main signalling pathways are involved in modulating autophagy: the serine/threonine kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) pathway, a major cell survival pathway which acts as a negative regulator, and the AMPK (*adenosine monophosphate protein kinase*) pathway which stimulates autophagy. Depending on the energy requirements of the cell, the mTOR complex controls autophagy by suppressing the activity of ULK1 kinase by phosphorylation, which contributes towards blocking the initial stage of the formation of the phagosome. AMPK directly phosphorylates ULK1 on serine 555 which leads to its activation and causes autophagy. Several active components in the autophagy process are currently being used in clinical trials to treat certain solid or haematopoietic tumours such as sirolimus and everolimus (two rapalogues which inhibit mTOR), AICAR and metformin (two AMPK activators), and PKI-587 (a Class 1 PI3K inhibitor).

Le traitement de référence de la LMC est l'imatinib (Glivec®), un inhibiteur de la kinase BCR-ABL (ITK) [22]. La réactivation de l'autophagie représente une stratégie prometteuse chez les patients présentant des résistances à cet ITK. Plusieurs molécules activant l'autophagie peuvent induire une mort autophagique des cellules de LMC sensibles ou résistantes aux ITK [23] (tableau 1). Cette observation a été à la base de la mise en place d'un essai clinique de phase II randomisé (CHOICES, NCT01227135) dans lequel l'efficacité de l'imatinib a été comparée à celle

de l'imatinib associé à l'HCQ. Les résultats de cet essai, et d'autres récemment menés dans d'autres types de cancers, suggèrent que l'HCQ, même aux doses maximales tolérées par les patients, ne potentialise que très légèrement les effets cytotoxiques des traitements de référence [24-26]. Ces études ont mis en évidence la nécessité de développer de nouveaux inhibiteurs de l'autophagie plus efficaces et/ou plus sélectifs à l'aide de modèles précliniques plus robustes. Ainsi, des inhibiteurs de l'autophagie de deuxième génération, tels que le

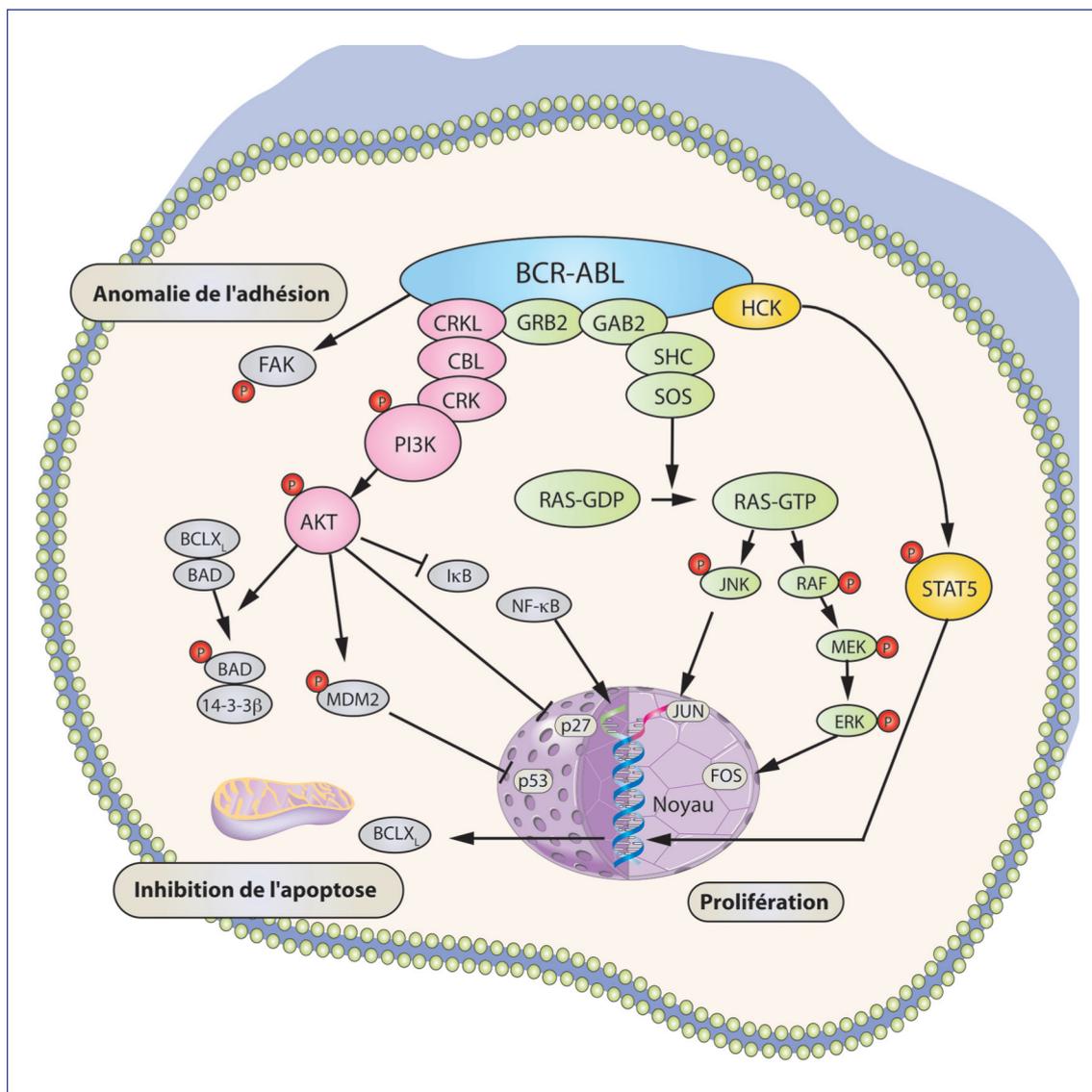


Figure 5. Présentation schématique des voies de signalisation associées à l'activation constitutive de BCR-ABL dans les cellules de la leucémie myéloïde chronique (LMC). L'activation constitutive de BCR-ABL consécutive à la translocation (t9;22) (q34;q11) dans les cellules de LMC stimule de nombreuses voies de survie cellulaire : PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK/MEK et STAT5, qui favorisent la prolifération cellulaire et inhibent l'apoptose, contribuant ainsi à l'expansion du clone leucémique.

Figure 5. Schematic presentation of signalling pathways associated with the constitutive activation of BCR-ABL in LMC cells. The constitutive activation of BCR-ABL following translocation (t9;22) (q34;q11) in LMC cells stimulates numerous cell survival pathways, PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK/MEK and STAT5, which support cell proliferation and inhibit apoptosis, thus contributing to expansion of the leukaemic clone.

Tableau 1. Molécules ou combinaison de molécules en cours d'essais cliniques dans les hémopathies malignes ayant un impact sur l'autophagie.

Table 1. Molecules or combinations of molecules currently being clinically trialled for malignant haemopathies with an impact on autophagy.

Composés	Pathologie	Cibles dans l'autophagie	Autre cibles	Référence
Imatinib + Hydroxycloroquine	LMC	Fusion Lysosome-autophagosome	BCR-ABL	NCT01227135
Imatinib + Évérolimus	LMC	mTOR	BCR-ABL	NCT00093639
Dasatinib + Vorinostat	LMC	HDAC	BCR-ABL	NCT00816283
Trans-retinoïc acid	LAP		PML-RAR α	
Sirolimus + Vidaza	SMD	mTOR		NCT00819546
Sirolimus + Mitoxantrone, Étoposide, Cytarabine	LAM	mTOR		NCT00780104
Sirolimus + Idarubicine + Cytarabine	LAM	mTOR		NCT01822015
Évérolimus + PKI-587	LAM	mTOR	PI3K cl. I	
Évérolimus + PKC412	LAM	mTOR	FLT3	NCT00819546
Évérolimus + Nilotinib	LAM	mTOR	C-Kit	NCT00762632
AICAR/Acadésine	LLC	AMPK		NCT00559624
Metformine	LLC	AMPK		NCT01750567
Metformine + Rituximab	LBDGC	AMPK	Anti-CD20	NCT02531308
Temsirolimus	MM réfractaires et (ou) rechute	mTOR		NCT00079456
Temsirolimus	LBDGC et LLC	mTOR		NCT00290472
Évérolimus	MM réfractaires et (ou) rechute	mTOR		NCT00618345
Évérolimus	Lymphomes réfractaires	mTOR		NCT00436618
Temsirolimus + Bortézomib	MM réfractaires et (ou) rechute	mTOR	Protéasome	NCT00483262
Temsirolimus + Lénalidomide	MM réfractaires et (ou) rechute	mTOR	Immunomodulation	NCT00729638
Temsirolimus + Rituximab	LNH réfractaire	mTOR	Anti-CD20	NCT00109967
Évérolimus + Rituximab	LBDGC au diagnostic	mTOR	Anti-CD20	NCT01334502
Duvélisib	LLC et Lymphome B	PI3K cl. I		NCT02004522
Idéalisisib + Rituximab	LNH et LLC	PI3K cl. I	Anti-CD20	NCT01088048
Hydroxychloroquine + Bortézomib	MM réfractaires et (ou) rechute	Fusion Lysosome-autophagosome	Protéasome	NCT00568880
Hydroxychloroquine + Sirolimus / Cyclophosphamide	MM réfractaires et (ou) rechute	Fusion Lysosome-autophagosome, mTOR	ADN	NCT01689987

AMPK : adenosine monophosphate protein kinase ; LBDGC : lymphome B diffus à grandes cellules ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LAP : leucémies aiguës promyélocyaires ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LMC : leucémie myéloïde chronique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; MM : myélome multiple ; mTor : mammalian target of rapamycin ; SMD : syndromes myélodysplasiques.

Lys05, sont en cours d'évaluation et semblent être une alternative clinique prometteuse à l'HCQ [27]. Le Lys05 est un analogue dimérique de l'HCQ, mais présentant une efficacité supérieure. Il a pour particularité de s'accumuler dans les lysosomes et d'en augmenter le pH, bloquant ainsi le flux autophagique. Des données récentes de la littérature montrent que cet inhibiteur réduit fortement l'autophagie dans les cellules souches leucémiques et potentialise les effets des inhibiteurs de BCR-ABL *in vitro* mais également *in vivo* [28]. De manière très intéressante, l'association nilotinib + Lys05 a montré une sélectivité plus élevée pour les cellules BCR-ABL positives que pour les cellules non cancéreuses, suggérant l'existence d'une fenêtre thérapeutique potentielle. L'un des principaux problèmes liés à l'utilisation clinique de l'HCQ et de ses dérivés est un risque significatif de rétinopathie due à une exposition prolongée au médicament. Cet effet indésirable étant directement associé à des doses élevées et à une longue durée du traitement, l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie plus efficaces, tels que le Lys05, pourrait permettre d'atteindre les effets souhaités avec des doses plus faibles et dans un délai plus court, ce qui permettrait d'atténuer ces effets indésirables. Le resvératrol, une phytoalexine naturelle retrouvée notamment dans le raisin, agit *via* un mécanisme dépendant de l'activation de la voie AMPK et de la protéine BECLIN-1 [29]. D'autres activateurs de l'AMPK, tels que l'AICAR ou la metformine, se sont montrés efficaces pour éliminer *in vitro* et *in vivo* les cellules de LMC par induction de l'autophagie [15, 30]. Le trioxyde d'arsenic (Trisenox[®]) peut cibler directement BCR-ABL *via* un mécanisme dépendant de p62/SQSTM1 et ainsi engendrer sa dégradation par autophagie [31]. L'induction d'une mort autophagique pourrait être par conséquent une stratégie très prometteuse pour contourner la résistance aux ITK. Plusieurs essais cliniques en cours visent à valider l'intérêt de combiner l'imatinib avec des inhibiteurs de mTOR tels que le RAD001 (évérolimus) (*tableau 1*). Dans certains cas, il est opportun au contraire d'inhiber l'autophagie afin d'augmenter les effets anti-leucémiques de certaines molécules telles que les inhibiteurs de BCR-ABL (imatinib), les inhibiteurs de HDAC (vorinostat [acide valproïque]) ou encore de l'interféron alpha [32, 33]. En effet, ces composés, qui éliminent efficacement les cellules de LMC, induisent également une autophagie pro-survie. Dans ces situations, afin d'augmenter le potentiel cytotoxique de ces molécules, il a été proposé d'inhiber cette autophagie pro-tumorale *via* l'utilisation de molécules déjà utilisées en clinique telles que la chloroquine ou l'HCQ [34] (*tableau 1*). Dans la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), une réactivation de l'autophagie pourrait être également une stratégie thérapeutique prometteuse. En effet, l'accumulation des monocytes qui caractérise cette pathologie semble être due à un défaut de différenciation des monocytes en macrophages par blocage de l'autophagie, indispensable à l'obtention de macrophages fonctionnels (*figure 6*). Des agonistes du récepteur purinergique tels que l'UDP ou le MRS2693 ont été

proposés pour réactiver l'autophagie et restaurer ainsi une différenciation normale des monocytes [35].

Le ciblage de l'autophagie dans les syndromes myéloprolifératifs semble donc être une alternative thérapeutique pertinente même s'il ne concerne actuellement que la LMC et la LMMC. Connaissant l'importance du processus autophagique au cours de la différenciation mégacaryocytaire et érythrocytaire [36, 37], il est permis d'envisager son ciblage dans le contexte de la thrombocytopénie essentielle ou de la polyglobulie de Vaquez, qui restent à ce jour des pathologies incurables.

Ciblage de l'autophagie dans les syndromes myélodysplasiques et les leucémies aiguës myéloïdes

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont caractérisés par une atteinte et une accumulation de précurseurs myéloïdes au niveau de la moelle osseuse. Cette accumulation conduit à une insuffisance médullaire ayant comme conséquence des pancytopénies périphériques. Le traitement de référence des patients à haut risque est un agent déméthylant, l'azacytidine (Vidaza[®]), rapidement inopérant de sorte que l'espérance de vie des patients résistants ne dépasse pas six mois. Chez ces patients, la maladie peut évoluer en leucémie aiguë myéloïde (LAM).

Les cellules provenant de moelle osseuse de patients atteints de SMD et de LAM présentent des altérations au niveau des mitochondries, une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), mais également une augmentation de la mort par apoptose. L'importance du processus autophagique dans ces cellules a récemment été mise en évidence dans différents modèles murins invalidés pour des protéines nécessaires à l'autophagie [36, 38]. Des arguments cliniques permettent également d'impliquer l'autophagie dans l'émergence et l'acutisation des SMD et des LAM. En effet, la voie PI3K/AKT/mTOR est constitutivement activée dans les LAM et son ciblage pharmacologique permet l'élimination des cellules leucémiques chez le patient [39]. L'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, a confirmé cette hypothèse [40]. Il a également été montré que le traitement par l'ATRA (*all trans-retinoic acid*) dans les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) conduit à la dégradation par autophagie du produit de l'oncogène PML-RAR α (*promyelocytic-leukemia/retinoic acid receptor*) qui est à l'origine de cette pathologie et du blocage de la différenciation à un stade précoce [41].

Ces observations sont à la base de plusieurs essais cliniques qui associent le sirolimus (rapamycine) et Vidaza[®] dans les SMD ou le sirolimus et une chimiothérapie cytotoxique dans les LAM. Dans plusieurs essais cliniques, les inhibiteurs de mTOR ont été également associés à des ITK ou à des inhibiteurs de la PI3K (*tableau 1*). Enfin, certaines molécules peuvent être utilisées comme des inducteurs puissants de l'autophagie et ainsi induire la mort des cellules leucémiques. Notre équipe a montré que l'acadosine, un analogue de l'AMP, était capable d'induire

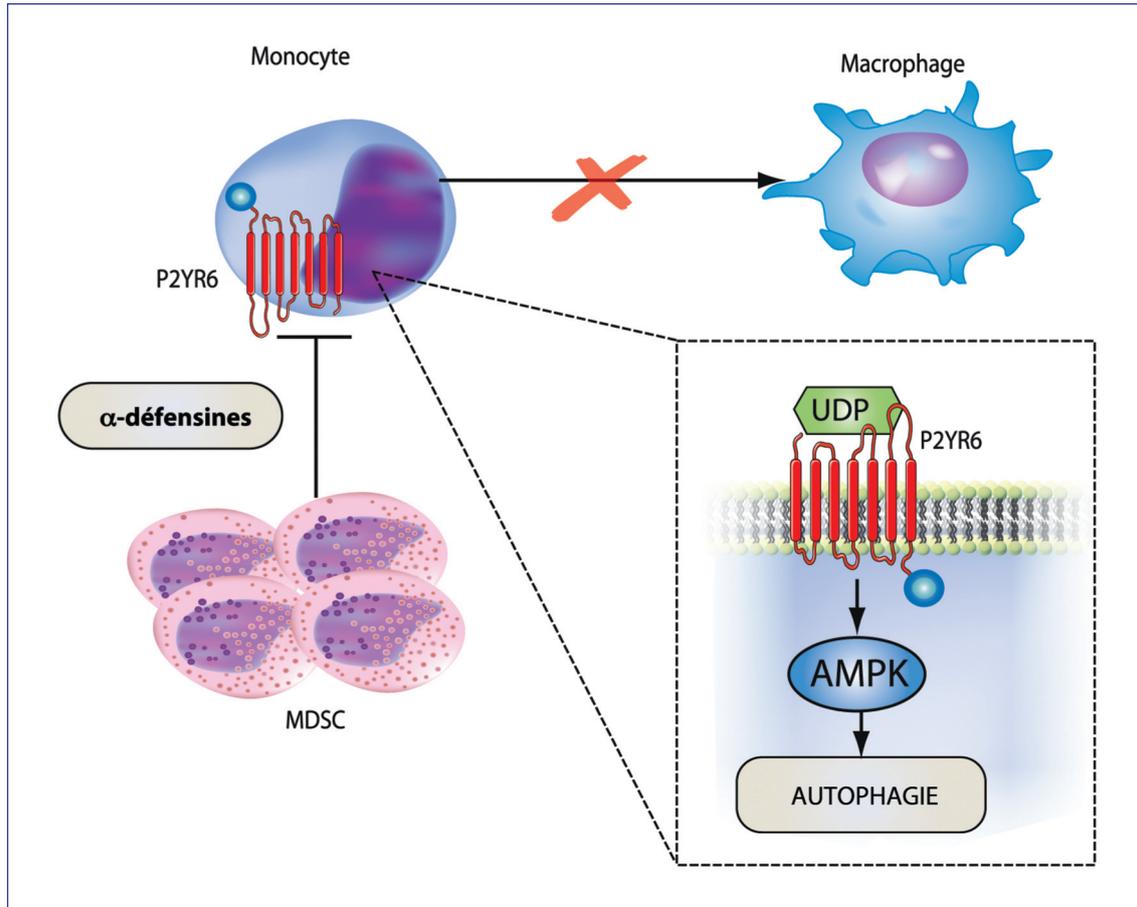


Figure 6. Altération de la différenciation macrophagique des monocytes chez les patients atteints de la leucémie myélomonocitaire chronique (LMMC). L'accumulation des monocytes qui caractérise la LMMC est due en partie à un défaut de différenciation macrophagique lié à la présence anormale dans le sang de ces patients de cellules immunosuppressives d'origine myéloïde (MDSC). Ces cellules immatures sécrètent de fortes quantités d'alpha-défensines qui vont ainsi entrer en compétition avec l'UDP, le ligand naturel du récepteur P2RY6. Cette inactivation du récepteur P2RY6 par les alpha-défensines conduit à une inhibition de l'autophagie nécessaire à l'obtention d'une différenciation macrophagique complète des monocytes.

Figure 6. Alteration of monocyte-to-macrophage differentiation in patients with LMMC. The accumulation of monocytes which characterises LMMC is due, in part, to a defect in macrophage differentiation linked to the abnormal presence of immunosuppressive cells of myeloid origin (MDSC) in the blood of patients with LMMC. These immature cells secrete high quantities of alpha defensins which then compete with UDP, the natural ligand of the P2RY6 receptor. This inactivation of the P2RY6 receptor by alpha defensins leads to an inhibition of autophagy which is necessary for complete monocyte differentiation into macrophages.

une mort par autophagie des lignées cellulaires de SMD sensibles ou résistantes au Vidaza[®]. Ces résultats ont ensuite été confirmés sur des prélèvements médullaires de patients atteints de SMD et de LAM ne répondant plus au Vidaza[®]. Sur la base de la structure de l'acadosine, nous développons actuellement de nouveaux analogues nucléosidiques capables d'induire une mort cellulaire autophagique dans les cellules de SMD et de LAM.

Nos travaux récents ont mis en évidence que le Vidaza[®], qui constitue actuellement le traitement de référence des patients souffrant de SMD, provoquait une baisse d'expression de la protéine lysosomale LAMP2 dont la conséquence est une inhibition de la CMA. Pour survivre, les cellules mettent en place des processus compensa-

toires en activant l'autophagie et la voie UPS. De façon intéressante, nous avons établi que l'augmentation de ces deux processus de compensation représentait un talon d'Achille pour les cellules résistantes, qui pouvait être exploité en thérapie anticancéreuse grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie tel que l'HCQ (Plaquenil[®]) et du protéasome tel que le bortézomib (Velcade[®]). Par ailleurs, les patients réfractaires au Vidaza[®] présentent une expression faible de LAMP2 corrélée avec une survie globale très faible.

Des études récentes visant à caractériser les mutations génétiques conduisant à la genèse des SMD ont permis de montrer que les facteurs d'épissages de l'ARN représentent plus de 50 % des protéines mutées [42]. Le facteur

d'épissage U2 appelé U2AF1 (*small nuclear RNA auxiliary factor 1*), impliqué dans la reconnaissance du site d'épissage 3' et le recrutement du complexe U2snRNP, est muté chez 12 % des patients atteints de SMD [43]. Les mutations d'U2AF1 sont corrélées à un pronostic défavorable et affectent deux sites particuliers S34 et Q157 situés respectivement dans le premier et le second motif à doigt de zinc CCCH de la protéine [44]. L'étude des conséquences fonctionnelles de la mutation U2AF1S34F montre que les cellules présentent des altérations d'épissage de nombreux ARN pré-messagers. De plus, des modifications ont également été observées dans la sélection des sites de clivage et de polyadénylation (CP) conduisant à la production d'ARNm présentant plusieurs extrémités 3' de nature différente [45]. La sélection CP des ARNm fait principalement intervenir le complexe protéique des facteurs de clivage Im (CFIm), composé de deux sous-unités CFIm59 et CFIm68 qui répriment ou activent respectivement l'utilisation des sites CP proximaux. La présence de la mutation S34F d'U2AF1 conduit à une diminution de la liaison de la sous-unité CFIm59, sans impact sur la liaison du facteur CFIm68. Cela a comme conséquence la production d'ARNm avec une extrémité 3' allongée dont la traduction est très fortement réprimée. L'expression de l'ARNm codant la protéine ATG7, essentielle à la mise en place de l'autophagie, est fortement diminuée par la mutation U2AF1 S34F, entraînant une diminution de son expression protéique et une inhibition du processus autophagique [45]. Dans ce cas précis, la mutation d'U2AF1 qui conduit à l'inhibition de l'autophagie *via* la diminution de la protéine ATG7 est pro-tumorale. Il a également été montré que l'inactivation de gènes *Atg* chez la souris, ou l'inhibition de la traduction de la protéine ATG7 dans des cellules de patients mutées pour U2AF1, est responsable de l'apparition d'un SMD pouvant évoluer en LAM. De ce fait, il apparaît que les molécules susceptibles d'induire, ou au contraire d'inhiber, l'autophagie ont pleinement leur place dans l'arsenal thérapeutique visant à éradiquer les SMD et LAM. Finalement, il a été rapporté que le ciblage direct de l'AMPK par un activateur sélectif, le GSK621, induit l'apoptose et l'élimination des cellules de LAM possédant une activation constitutive de la voie mTORC1 *in vitro* et *in vivo* [46].

Ciblage de l'autophagie dans les hémopathies lymphoïdes B

Les néoplasies lymphoïdes se développent à partir d'éléments cellulaires constituant le tissu lymphoïde normal. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une prolifération lymphoïde monoclonale, responsable de l'infiltration médullaire, sanguine et parfois ganglionnaire par des lymphocytes matures de morphologie normale et de phénotype B. Le myélome multiple (MM) est caractérisé par la prolifération et l'accumulation de cellules plasmocytaires malignes dans la moelle osseuse. Quant aux lymphomes, ils constituent un groupe de pathologies hétérogènes de pronostic variable.

Récemment, l'autophagie a été décrite comme impliquée dans de nombreux processus physiologiques caractéristiques du lymphocyte B : l'acquisition de l'immunité innée et acquise qui inclut l'élimination des pathogènes intracellulaires, la régulation de l'inflammation et la présentation antigénique. De plus, l'autophagie contrôle l'homéostasie des cellules B en promouvant la survie des progéniteurs précoces B et des plasmocytes mémoires, ainsi que la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. De ce fait, l'inactivation des gènes pro-autophagiques *Atg5* et *Beclin-1* chez la souris induit un défaut de maturation du lignage B [47].

Dans les hémopathies malignes B, ces processus physiologiques contrôlés par l'autophagie sont fortement dérégulés. Ces anomalies entraînent des perturbations de l'homéostasie et des fonctions du lignage B aux différents stades de maturation qui diffèrent selon l'hémopathie B. Par exemple, les souris *Beclin-1^{+/-}* ont un risque accru de développer un lymphome [48]. À l'inverse, une suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR est observée dans plusieurs hémopathies B incluant la LLC, les lymphomes B et le MM, suggérant que le blocage de cette voie de signalisation pourrait présenter un avantage thérapeutique dans ces pathologies [49].

Depuis quelques années, des efforts considérables ont été déployés afin de cibler les processus autophagiques mis en jeu dans les hémopathies malignes B. Une des stratégies utilisées pour réactiver une autophagie anti-tumorale dans les hémopathies B consiste à cibler la voie LKB1/AMPK. Bien que cette stratégie soit moins développée dans les hémopathies malignes que dans les tumeurs solides, des essais cliniques ont été clôturés ou sont actuellement en cours. L'acadésine n'a pas montré de réelle efficacité dans la LLC. La metformine est actuellement en essai clinique dans la LLC et dans les lymphomes en combinaison avec les différents traitements de référence (*tableau 1*). La deuxième stratégie, beaucoup plus utilisée dans les leucémies B afin de réactiver l'autophagie, est l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR. Un nombre croissant d'inhibiteurs pharmacologiques de mTOR comme le temsirolimus et l'évérolimus sont actuellement en essai clinique dans le MM et les lymphomes B (*tableau 1*). À titre d'exemple, le duvélisib (IPI-145) est testé dans la LLC et le lymphome dans des essais cliniques de phase III. Dans les lymphomes non hodgkiniens réfractaires et la LLC, l'idélalisib (CAL-101) est actuellement testé en combinaison avec les traitements de référence (*tableau 1*). Une autre stratégie consiste à inhiber le versant pro-tumoral de l'autophagie retrouvé dans certaines hémopathies malignes B. Le seul essai clinique probant actuellement en phase I/II combine un inhibiteur de l'autophagie, l'HCQ avec le bortézomib dans les MM réfractaires et/ou en rechute (*tableau 1*). Plus récemment, un essai clinique dans le myélome réfractaire a combiné de manière séquentielle un inhibiteur de l'autophagie (HCQ) avec deux activateurs de l'autophagie (le sirolimus et l'agent alkylant

cyclophosphamide) [50]. Cette combinaison est justifiée par le fait que :

- l'HCQ a été décrite pour potentialiser l'effet cytotoxique du cyclophosphamide ;
- le cyclophosphamide est capable de potentialiser la réactivation de l'autophagie induite par le sirolimus.

Les résultats modestes de cette étude ont été attribués à l'utilisation d'une dose trop faible d'HCQ ainsi qu'à l'utilisation du sirolimus, qui fait déjà partie de l'ancienne génération des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR (tableau 1).

Conclusion

Il est maintenant bien établi que l'autophagie joue un rôle important lors de la différenciation normale et pathologique des cellules souches hématopoïétiques. Dans certaines circonstances, l'autophagie peut également favoriser la mort cellulaire. Cette dualité de fonction de l'autophagie représente une opportunité pour son ciblage thérapeutique dans les hémopathies malignes, à condition que l'on soit capable de déterminer de manière spatio-temporelle son implication au cours de la leucémogénèse : il est difficile de prédire quand et comment l'autophagie devra être stimulée ou réprimée.

Des traitements visant à induire plutôt qu'à réprimer l'autophagie pourraient se révéler intéressants, notamment dans les cellules résistantes aux thérapies conventionnelles. Certains traitements cytotoxiques peuvent en effet provoquer une autophagie protectrice et, dans ce contexte, l'inhibition de l'autophagie pourrait être avantageuse. Par ailleurs, l'induction d'une mort autophagique pourrait se révéler judicieuse dans des cellules cancéreuses qui sont souvent résistantes à d'autres types de mort cellulaire telle que l'apoptose. Nous ne sommes qu'aux prémices du ciblage de l'autophagie en thérapie anticancéreuse, et de nombreuses études *in vitro* et chez le patient seront nécessaires avant de caractériser où, quand et comment le ciblage de l'autophagie sera réellement efficace. Il est également probable que les traitements basés sur la modulation de l'autophagie devront utiliser des molécules plus spécifiques et être personnalisés.

RÉFÉRENCES

1. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 ; 16 (8) : 461-72.
2. Zhang H, Baehrecke EH. Eaten alive: novel insights into autophagy from multicellular model systems. *Trends Cell Biol* 2015 ; 25 (7) : 376-87.
3. Schneider JL, Cuervo AM. Autophagy and human disease: emerging themes. *Curr Opin Genet Dev* 2014 ; 26 : 16-23.
4. Torgersen ML, Simonsen A. Autophagy: friend or foe in the treatment of fusion protein-associated leukemias? *Autophagy* 2013 ; 9 (12) : 2175-7.
5. Rebecca VW, Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* 2015 ; 35 (1) : 1-11.
6. Sica V, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Izzo V, Maiuri MC, Kroemer G. Organelle-specific initiation of autophagy. *Mol Cell* 2015 ; 59 (4) : 522-39.

7. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014 ; 24 (1) : 24-41.
8. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 2012 ; 32 (1) : 2-11.
9. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 2015 ; 125 (1) : 25-32.
10. Zhao M, Klionsky DJ. AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy. *Cell Metab* 2011 ; 13 (2) : 119-20.
11. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 1996 ; 273 (5274) : 501-3.
12. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2007 ; 3 (4) : 295-9.
13. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011 ; 12 (8) : 535-41.
14. Wang DW, Peng ZJ, Ren GF, Wang GX. The different roles of selective autophagic protein degradation in mammalian cells. *Oncotarget* 2015 ; 6 (35) : 37098-116.
15. Robert G, Ben Sahra I, Puissant A, et al. Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS One* 2009 ; 4 (11) : e7889.
16. Tomic T, Botton T, Cerezo M, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis* 2011 ; 2 : e199.
17. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol* 2015 ; 94 (Suppl 2) : S107-121.
18. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 2004 ; 18 (2) : 189-218.
19. Sheng Z, Ma L, Sun JE, Zhu LJ, Green MR. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood* 2011 ; 118 (10) : 2840-8.
20. Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, Sanzone S, Strambi A, Chiariello M. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy* 2015 ; 11 (10) : 1790-802.
21. Altman BJ, Jacobs SR, Mason EF, et al. Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis. *Oncogene* 2011 ; 30 (16) : 1855-67.
22. Mahon FX, Etienne G. Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin Cancer Res* 2014 ; 20 (2) : 310-22.
23. Puissant A, Robert G, Auberger P. Targeting autophagy to fight hematopoietic malignancies. *Cell Cycle* 2010 ; 9 (17) : 3470-8.
24. Rangwala R, Chang YC, Hu J, et al. Combined MTOR and autophagy inhibition: phase I trial of hydroxychloroquine and temsirolimus in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014 ; 10 (8) : 1391-402.
25. Rosenfeld MR, Ye X, Supko JG, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* 2014 ; 10 (8) : 1359-68.
26. Mahalingam D, Mita M, Sarantopoulos J, et al. Combined autophagy and HDAC inhibition: a phase I safety, tolerability, pharmacokinetic, and pharmacodynamic analysis of hydroxychloroquine in combination with the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced solid tumors. *Autophagy* 2014 ; 10 (8) : 1403-14.
27. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; 109 (21) : 8253-8.
28. Baquero P, Dawson A, Mukhopadhyay A, et al. Targeting quiescent leukemic stem cells using second generation autophagy inhibitors. *Leukemia* 2018. doi: 10.1038/s41375-018-0252-4. [Epub ahead of print].
29. Puissant A, Robert G, Fenouille N, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res* 2010 ; 70 (3) : 1042-52.
30. Vakana E, Altman JK, Glaser H, Donato NJ, Platanias LC. Antileukemic effects of AMPK activators on BCR-ABL-expressing cells. *Blood* 2011 ; 118 (24) : 6399-402.
31. Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* 2012 ; 120 (17) : 3555-62.

32. Carew JS, Nawrocki ST, Kahue CN, *et al.* Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 2007 ; 110 (1) : 313-22.
33. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, *et al.* Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 2009 ; 119 (5) : 1109-23.
34. Calabretta B, Salomoni P. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* 2011 ; 52 (Suppl 1) : 54-9.
35. Obba S, Hizir Z, Boyer L, *et al.* The PRKAA1/AMPKalpha1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. *Autophagy* 2015 ; 11 (7) : 1114-29.
36. Mortensen M, Ferguson DJ, Edelmann M, *et al.* Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 (2) : 832-7.
37. Colosetti P, Puissant A, Robert G, *et al.* Autophagy is an important event for megakaryocytic differentiation of the chronic myelogenous leukemia K562 cell line. *Autophagy* 2009 ; 5 (8) : 1092-8.
38. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, *et al.* The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med* 2011 ; 208 (3) : 455-67.
39. Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, Grimaldi C, Manzoli L, McCubrey JA. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 2009 ; 18 (9) : 1333-49.
40. Recher C, Beyne-Rauzy O, Demur C, *et al.* Antileukemic activity of rapamycin in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005 ; 105 (6) : 2527-34.
41. Isakson P, Bjoras M, Boe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* 2010 ; 116 (13) : 2324-31.
42. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2014 ; 28 (2) : 241-7.
43. Cluzeau T, Robert G, Jacquel A, Auberger P. How recent advances in high-risk myelodysplastic syndrome pathophysiology may impact future treatments. *Curr Pharm Des* 2013 ; 19 (30) : 5362-73.
44. Makishima H, Visconte V, Sakaguchi H, *et al.* Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* 2012 ; 119 (14) : 3203-10.
45. Park SM, Ou J, Chamberlain L, *et al.* U2AF35(S34F) Promotes Transformation by Directing Aberrant ATG7 Pre-mRNA 3' End Formation. *Mol Cell* 2016 ; 62 (4) : 479-90.
46. Sujobert P, Poulain L, Paubelle E, *et al.* Co-activation of AMPK and mTORC1 induces cytotoxicity in acute myeloid leukemia. *Cell Rep* 2015 ; 11 (9) : 1446-57.
47. Arsov I, Adebayo A, Kucerova-Levisohn M, *et al.* A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development. *J Immunol* 2011 ; 186 (4) : 2201-9.
48. Qu X, Yu J, Bhagat G, *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003 ; 112 (12) : 1809-20.
49. Younes A, Samad N. Utility of mTOR inhibition in hematologic malignancies. *Oncologist* 2011 ; 16 (6) : 730-41.
50. Scott EC, Maziarz RT, Spurgeon SE, *et al.* Double autophagy stimulation using chemotherapy and mTOR inhibition combined with hydroxychloroquine for autophagy modulation in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2017 ; 102 (7) : e261-5.