



HAL
open science

Identification de voies de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique par criblage CRISPR-Cas9.

Matthieu Lewis

► To cite this version:

Matthieu Lewis. Identification de voies de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique par criblage CRISPR-Cas9.. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0054 . tel-02426223

HAL Id: tel-02426223

<https://theses.hal.science/tel-02426223>

Submitted on 2 Jan 2020

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

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

THÈSE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Génétique

Présentée et soutenue publiquement le :

12 Avril 2019

Par

Matthieu LEWIS

Né le 7 Avril 1990 à Kingston Upon Thames (GBR)

Identification de voies de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique par criblage CRISPR-Cas9

Travail réalisé au sein du laboratoire :

« *Diversité génétique et réponse au traitement, oncogénèse mammaire et leucémique* »

INSERM U 1218 ACTION

Membres du jury :

Pr Martin TEICHMANN – Université de Bordeaux	Président
Dr Dominique HELMLINGER – Université de Montpellier	Rapporteur
Dr Franck-Emmanuel NICOLINI – Université de Lyon	Rapporteur
Pr Anne-Marie MARTINEZ – Université de Montpellier	Examineur
Dr Béatrice TURCQ – Université de Bordeaux	Invitée
Pr François-Xavier MAHON – Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Identification de voies de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique par criblage CRISPR-Cas9.

La caractérisation des tumeurs malignes et la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux sont essentielles pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Les criblages génétiques, devenus encore plus puissants avec la technologie d'édition du génome CRISPR-Cas9, le séquençage nouvelle génération et la bioinformatique, sont des outils formidables pour décrypter de nouveaux mécanismes cellulaires, dont la résistance au traitement. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif qui est caractérisé par l'anomalie génétique t(9;22). Cette aberration chromosomique est à l'origine du gène de fusion *BCR-ABL1* qui code l'oncogène du même nom responsable de la prolifération anarchique des cellules. L'imatinib mesylate, un inhibiteur de tyrosine kinase, élimine de manière spécifique les cellules leucémiques en ciblant et en bloquant l'activité kinase de cette protéine. Malheureusement, comme pour tout type de thérapie ciblée, une résistance au traitement survient chez certains patients. Afin de repérer des nouvelles voies de résistance à cet inhibiteur de tyrosine kinase, nous avons effectué un criblage génétique avec la librairie « genome-scale CRISPR knock-out » (GeCKO v2) *in vitro* dans la lignée cellulaire K562. Nous avons découvert plusieurs gènes qui semblent être essentiels pour la réponse au traitement par imatinib, tels que les facteurs pro-apoptotiques *BIM* et *BAX*, ou le répresseur de la voie des MAPK, *SPRED2*. Le rétablissement spécifique de l'apoptose dans les cellules *BIM* knock-out (KO) par des BH3-mimétiques, ou l'inhibition ciblée de la voie MAPK dans la lignée *SPRED2* KO sensibilise de nouveau les lignées résistantes. Dans ce travail, nous avons découvert des mécanismes de résistance déjà connus (l'apoptose, la voie MAPK...) mais nous avons également démontré l'implication de voies peu connues telles que le complexe Mediator, la maturation de ARNm et l'ubiquitylation de protéines. Spécifiquement cibler ces lésions génétiques avec des thérapies ciblées combinées peut permettre de surmonter les phénotypes de résistance et ouvre la porte à l'utilisation de l'oncologie de précision.

Mots clés : inhibiteurs de tyrosine kinase, leucémie myéloïde chronique, criblage CRISPR-Cas9

Genome-wide CRISPR-Cas9 Screening to Identify Pathways Involved in Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chronic Myeloid Leukemia.

The characterisation of malignant tumour growth and the understanding of resistance mechanisms to treatment in cancer is of utmost importance for the discovery of novel "druggable" targets. Efficient genetic screening, now even more possible with the convergence of CRISPR-Cas9 gene editing technology, next-generation sequencing and bioinformatics, is an important tool for deciphering novel cellular processes, such as resistance to treatment in cancer. Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterised by the t(9;22) genetic abnormality, which encodes the driver of CML, the *BCR-ABL1* fusion protein. Imatinib mesylate, a tyrosine kinase inhibitor, specifically eliminates CML cells by targeting and blocking the kinase activity of this protein, yet, as for all targeted therapies in cancer, resistance to treatment exists. In order to discover alternative *BCR-ABL1* independent mechanisms of imatinib resistance, we utilized the genome-scale CRISPR knock-out library GeCKO v2 to screen for imatinib sensitising genes *in vitro* on K562 cells. We revealed genes that seem essential for imatinib induced cell death, such as pro-apoptotic genes (*BIM*, *BAX*) or MAPK inhibitor *SPRED2*. Specifically re-establishing apoptotic capabilities in *BIM* knock-out (KO) cells with BH3-mimetics, or inhibiting MAP-kinase signalling in *SPRED2* KO cells with MEK inhibitors restores sensitivity to imatinib, overcoming resistance phenotypes. In this work, we discovered previously identified pathways (apoptosis, MAP-kinase signalling) and novel pathways that modulate response to imatinib in CML cell lines, such as the implication of the Mediator complex, mRNA processing and protein ubiquitylation. Targeting these specific genetic lesions with combinational therapy can overcome resistance phenotypes and paves the road for the use of precision oncology.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, chronic myeloid leukemia, CRISPR-Cas9 screen

Le laboratoire « Diversité génétique et réponse au traitement, oncogénèse mammaire et leucémique », de l'unité INSERM U1218, dans lequel j'ai effectué ce travail, est depuis plus de 20 ans spécialisé dans la recherche sur une maladie modèle : la leucémie myéloïde chronique (LMC). De nos jours, la LMC est probablement le type de cancer le plus étudié dans le monde pour diverses raisons. Premièrement, elle est un modèle d'étude pour le développement de cancer à plusieurs étapes, la LMC débute classiquement dans une phase chronique puis évolue vers deux phases supplémentaires à mauvais pronostic. L'étude de la progression pathologique dans la LMC pourrait aider à mieux comprendre comment d'autres types de cancer évoluent. Deuxièmement, c'est la première pathologie cancéreuse pour laquelle une caractérisation moléculaire de ses lésions génétiques a eu pour résultat la découverte d'une thérapie anti-cancéreuse ciblée. La démonstration de l'efficacité de la thérapie ciblée contre le cancer dans la LMC a débuté une révolution dans la découverte d'agents anti-cancéreux « intelligents ». Finalement, l'étude du développement de cette pathologie permettrait d'identifier des facteurs génétiques cruciaux à la progression tumorale ou à la résistance au traitement, qui pourraient un jour être de nouvelles cibles thérapeutiques pour la LMC mais aussi pour d'autres types de cancer.

Depuis des années, notre équipe cherche à mieux comprendre la résistance au traitement dans la LMC en créant et étudiant des lignées cellulaires résistantes, en analysant des polymorphismes génétiques de patients résistants par séquençage nouvelle génération, en caractérisant l'implication de nouveaux gènes dans la réponse aux thérapies et en élaborant des essais cliniques d'arrêt de traitement pour des patients répondeurs à la thérapie. Depuis 2014, le laboratoire s'est également fortement intéressé à la technologie d'édition du génome Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9. En 2019, une plateforme universitaire autour de cette technique, CRISP'edit, a été créée dans le but d'aider d'autres équipes académiques lors de leurs expériences de manipulations génétiques.

Tout premièrement, je remercie le Pr Martin Teichmann pour avoir accepté de présider le jury. J'ai commencé ma carrière scientifique en stage de Master 1 avec toi, et maintenant je vais terminer mes études à tes côtés. Je remercie également le Dr Dominique Helmlinger et le Dr Franck-Emmanuel Nicolini d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie aussi le Pr Marie-Anne Martinez d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateur.

Je souhaite sincèrement remercier François-Xavier Mahon, directeur de thèse et tuteur formidable au cours de ces dernières années. Si, dans ce laboratoire, nous étudions la LMC avec une telle expertise, c'est grâce à toi et aux travaux que t'as effectué pendant ta carrière (y compris tous les Western Blot de ta thèse de science) ! Dès les premiers mois de ma thèse, tu as été nommé directeur de l'institut Bergonié. Ton bureau a changé de localisation et ton emploi du temps s'est intensifié, mais t'étais toujours disponible aux moments critiques de ma thèse pour discuter des résultats scientifiques, pour me pousser à postuler pour participer à des congrès internationaux, et pour m'encourager dans mon travail et dans mes activités de communication et de vulgarisation scientifique. Même si des fois, tu fais des références curieuses à Star Wars, aux Peaky Blinders ou à des vieux acteurs Français que je ne connais pas, je suis très heureux et fier d'avoir partagé cette expérience avec toi.

J'ai eu la chance d'avoir, de manière non-officielle, deux chefs dans deux établissements différents : FX à Bergonié et Béatrice Turcq à Carreire. Béa, au début de ma thèse, tu étais mon supérieur hiérarchique qui m'apprenait à extraire des ARN du trizol, et vers la fin de ma thèse, tu es devenue plus qu'une collègue, mais une amie, qui, par contre, m'apprend toujours qu'il faut purifier les amplicons avant le séquençage GATC (oups...). Entre les montagnes de travail (sur ton bureau, littéralement), l'encadrement de la thèse de Florence et l'implication que tu as dans tous les travaux de l'équipe, tu as quand même réussi à co-encadrer ma thèse et être là, comme FX, lors des moments cruciaux. Parmi les souvenirs que je vais garder de cette thèse, je n'oublierai pas les bières à Montpellier, le chocolat à Oloron Sainte-Marie et les plateaux de charcuterie à Bordeaux pour Pint of Science. Tu as su nous guider scientifiquement, professionnellement, mais aussi personnellement, et je te remercie.

Si FX nous a apporté de l'expertise en termes de LMC, c'est Valérie Prouzet-Mauléon qui a véritablement amené la technologie CRISPR-Cas9 au laboratoire. Tu es notre Jennifer Doudna et tu m'as pris sous ton aile dès le premier jour de ma thèse avec nos 40 flask de culture. Depuis ce jour, tu m'as appris tellement de techniques différentes au laboratoire. Dès que j'ai un problème, premier réflexe, chercher VPM ! C'était aussi un plaisir d'animer une partie de l'atelier INSERM avec toi deux

années de suite, j'apprécie la confiance que t'avais en moi pour parler des libraires et des criblages CRISPR. Merci pour le soutien que tu m'as donné tout au long de ces années et de l'intérêt constant que tu as envers mon futur professionnel.

Je souhaite aussi remercier tous les autres membres du laboratoire qui ont rendu mes journées très agréables, merci à Bruno Cardinaud pour toutes les conversations scientifiques ou personnelles. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de donner deux cours à tes élèves en école d'ingénieur. Merci à Valérie Lagarde, la reine du western blot et du 4-4-2 ! Merci à Elodie Richard, Katie Sawai, Amal Nazaraliyev, Achille Ruer, Richard Iggo, Vanessa Desplat, Amine Ali Chaouche, Ana Real Caldéron et tous les autres membres du laboratoire et stagiaires qui ont embelli mes journées. Merci aussi à Christophe Hubert, pour tout ton aide concernant le NGS et pour tous les excellents moments partagés en début de thèse... Et merci à Florence Lichou, co-doctorante et « Partner in Crime ». On s'est bien amusés quand même ces dernières années, au laboratoire (jusqu'à ce que tu changes de bureau...), en congrès (notamment aux USA), ou au pub ! C'était un plaisir de partager cette expérience de thèse avec toi ! De nos conversations scientifiques, aux tableurs Excel, en passant par tes conseils de muscu' ou ton mercato MPG absurdement mauvais mais « performant », je peux dire que ma thèse était un véritable bonheur grâce, en parti, de manière quasi-significative ($p = 0,051$), à toi.

Je souhaite également remercier mes amis qui m'accompagnent depuis des années dans ma vie et qui supportent mes fautes de français et mes blagues anglaises de mauvais gout. Merci à Gawen et Julie, ainsi que Pierre et Sarah, merveilleux couples heureux que je connais depuis très longtemps, je vous félicite pour tous et je suis tellement heureux de vous connaître et de partager des formidables moments avec vous. Merci aux amis OIB, des vrais amis que j'espère garder toute ma vie. Les moments partagés avec vous sont si précieux et inoubliables. À bientôt pour le weekend OIB +10 ans : « bottoms up » Gautier, Lucas, Géraldine, Mathilde, Xavier, Clément, Matthieu et Lily !!! Et merci aux amis de la fac, aux copines du master à caryotype dominant 46XX et aux amis rencontré le long du chemin. Merci à Émilie, pour tous les bons moments que nous avons partagés depuis notre stage de M1 jusqu'à ton départ en Amérique Latine. Tu vas quand même revenir, non ? Laure, félicitations pour ton parcours mais surtout pour avoir choisi l'Angleterre comme patrie. Tu vas maintenant comprendre que les anglais sont meilleurs que les bretons (« Grande » Bretagne > juste *Bretagne*) ☺. Pauline, deuxième bretonne plus bordelaise, merci également pour tous ces moments partagés et ces burgers au petit Québec. Merci aux sportifs, notamment Nestorinho et

Joselinho pour ces journées de foot, gym et bière et à Greg, très bon ami de première année de fac, que j'arrive à voir de temps en temps.

Je veux aussi remercier Delphine Charles et Renaud Borderie de m'avoir coaché, encouragé et suivi tout au long de l'aventure de ma thèse en 180 secondes. Si je suis arrivé jusque là, c'était grâce à vous. J'ai énormément appris dans le domaine de la communication scientifique et dans l'expression théâtrale ! Une excellente aventure partagée avec Antoine aussi ! Mais c'est géniaaaaal.

À ma famille, ma mère, Éric, mon père, Dominique, Emilie, Romain, Marie-Hélène, Alice, Nico, Camille, Bruno, mes grand-mères (Douglas et René, j'espère que vous êtes fiers là où vous êtes) et ma famille Californienne, Philippe, Michelle, Isabelle, Thomas, Paul et Benjamin, ce travail est également pour vous. Nos discussions de CRISPR et de génétique en repas de famille se concrétisent finalement dans l'écriture et la soutenance de cette thèse.

Le bien-être provient d'un équilibre de multiples facteurs divers et variés. Sache que sans toi, Coralie, mon bien-être n'aurait jamais pu atteindre de tels niveaux.

Table des matières

Abréviations	13
Liste des figures	15
Introduction	18
A) Les tumeurs malignes	21
1) Les caractéristiques de la cellule cancéreuse	22
a) Une maladie résultant d'un dérèglement génétique	22
b) Une prolifération non-contrôlée	24
c) Une évasion de la mort cellulaire programmée	26
d) Une croissance illimitée	28
e) Une induction de l'angiogenèse	28
f) Un potentiel d'envahissement et de métastases	29
g) De nouvelles capacités supplémentaires	29
2) Comment traiter le cancer ?	33
a) L'origine des traitements anticancéreux	33
b) La révolution de la thérapie ciblée	34
c) La thérapie ciblée contre la prolifération non-contrôlée	35
d) Induire l'apoptose grâce aux BH3-mimétiques	37
e) La thérapie combinée contre le cancer	39
f) Cibler l'environnement du cancer avec l'immunothérapie	41
3) La résistance aux traitements anticancéreux	42
a) Les formes de résistance	42
b) Les mécanismes de résistance	42
i) L'accumulation de mutations génétiques	42
ii) La surexpression de transporteurs	44
iii) La réparation de l'ADN	44
iv) Le microenvironnement tumoral	45
c) Comment remédier à la résistance aux traitements ?	45
B) La leucémie myéloïde chronique (LMC) : une maladie modèle	47
1) La biologie moléculaire de la LMC	49
a) La translocation <i>BCR-ABL1</i>	49
i) La fonction physiologique des partenaires de la translocation	49

ii)	L'anatomie moléculaire de la fusion BCR-ABL1	51
b)	Les mécanismes de transformation maligne	54
i)	Activation de la voie Ras/MAPK	54
ii)	Activation de la voie PI3K.....	54
iii)	Activation de la voie JAK/STAT.....	55
iv)	Inhibition de l'apoptose	55
2)	Le traitement de la LMC.....	57
a)	L'ère pré-imatinib.....	57
b)	La découverte de l'imatinib.....	58
c)	Le mécanisme d'action de l'imatinib.....	59
d)	La période post-imatinib et la génération de nouveaux agents thérapeutiques	61
3)	La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase	63
a)	La résistance dépendante de BCR-ABL1.....	63
b)	La résistance indépendante de BCR-ABL1.....	66
c)	La résistance des cellules souches leucémiques	68
C)	La technologie CRISPR-Cas9, du simple knock-out au criblage génome entier	70
1)	La découverte de la technologie CRISPR-Cas.....	70
a)	D'une séquence particulière dans l'ADN bactérien... ..	70
b)	...à une endonucléase d'ADN guidée par ARN	72
c)	La fonction physiologique du système CRISPR-Cas chez les bactéries	73
i)	Le module d'adaptation.....	73
ii)	Le module effecteur	74
iii)	L'assemblage du complexe CRISPR-Cas pour une activité endonucléase	75
2)	Le mécanisme d'action du système CRISPR-Cas9.....	77
a)	La molécule d'ARN guide.....	78
b)	L'endonucléase Cas9	79
c)	L'activation du complexe sgRNA-Cas9	79
d)	Le clivage non spécifique de CRISPR-Cas9	81
3)	L'édition du génome par CRISPR-Cas9.....	82
a)	La création de mutations ponctuelles par recombinaison homologue	82
b)	La création de knock-out génétique par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)	83
4)	Le criblage génome entier par CRISPR-Cas9.....	85

a) Les caractéristiques de la librairie GeCKO.....	85
b) Transduction de cellules par la banque CRISPR	86
c) Le choix de la librairie CRISPR à utiliser	87
d) Comparaison avec d'autres technologies de criblage.....	87
e) Criblage GeCKO pour découvrir des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib dans la LMC87	
f) L'utilisation de criblages CRISPR-Cas9 dans la littérature.....	88
Objectif	89
Matériel et Méthodes	91
Réactifs	92
Culture Cellulaire	92
La génération d'une lignée cellulaire doxycycline inducible SpCas9	92
La transduction et le criblage de la librairie GeCKO	93
Extraction d'ADN, amplification des sgRNA et séquençage NGS	93
Utilisation d'outils bio-informatiques pour générer un classement des gRNA :.....	98
Le clonage individuel de sgRNA	99
La validation de la coupure du complexe CRISPR-Cas9 dans le génome	99
Analyses fonctionnelles de réseaux protéiques	100
L'analyse de la prolifération cellulaire.....	100
La caractérisation de l'apoptose.....	100
Western blot	100
Analyses de transcrits d'ARNm.....	101
Analyses statistiques.....	101
Résultats	102
A) Article de type « perspective » publié dans Hematological Oncology, 2016.....	103
B) Article scientifique envoyé pour publication dans Leukemia, 2019	108
C) Les travaux non-publiés sur <i>SPRED2</i>	140
Discussion	146
A) Le rôle potentiel des gènes en haut du classement (FDR < 0,01) dans la résistance au traitement contre la LMC	145
1) KLF1 (Krüppel-like Factor 1).....	145
2) BAX (BCL-2-associated X protein)	146
3) BAP1 (BRCA1 associated protein 1)	146

4)	EIF2AK1 (Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1)	147
5)	MED24 (Mediator of RNA Polymerase II transcription subunit 24)	148
6)	BCL2L11 (BCL-2-like protein 11 ou BIM)	149
7)	SPRED2 (Sprouty Related EVH1 Domain Containing 2)	149
8)	UBE2M (NEDD8-conjugating enzyme Ubc12).....	150
B)	Rôle potentiel de différents mécanismes dans la résistance au traitement dans la LMC	151
1)	Le rôle essentiel de l'apoptose intrinsèque	151
2)	L'inhibition des voies de prolifération RAS/MAPK et PI3K/mTOR.....	152
3)	La régulation de la transcription de gènes	153
4)	La réparation des dommages à l'ADN.....	154
5)	L'ubiquitinylation de protéines.....	155
6)	La maturation et le clivage 3' des ARNm	156
C)	Les stratégies thérapeutiques potentielles pour traiter les cellules résistantes	157
1)	Cibler les voies de prolifération cellulaire	157
2)	Augmenter l'activation de l'apoptose	158
3)	Cibler la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle.....	159
D)	Remarques finales et perspectives	162
E)	Conclusion.....	164
Annexes	172
Annexe 1 :	Le séquençage Sanger pré-NGS	167
Annexe 2 :	Analyses bio-informatiques permettant la classification des gènes	168
Annexe 3 :	La détection d'indels par analyse TIDE	173
Références	180

Abréviations

ABL	Ableson
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BAP1	BRCA1 Associated Protein 1
BAX	BCL-2-associated x protein
BCL-2	B Cell Lymphoma-2
BCL-xL	Bcl-2-like protein 1
BCR	Breakpoint Cluster Region
BIM	BCL2-2-interacting mediator of cell death
Cas	CRISPR associated
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
DMSO	Diméthylsulfoxyde
eIF2AK1	elongation Initiation Factor 2 α kinase 1
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinase
GeCKO	Genome-scale CRISPR Knock-Out
GIST	Gastro-Intestinal Stromal tumor
gRNA	RNA guide
KLF1	Krüppel-Like Factor 1
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
MAGeCK	Model-based Analysis of Genome-scale CRISPR Knock-out
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR1	Multi Drug Resistance 1
MED24	Mediator complex subunit 24
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NGS	Next Generation Sequencing
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinases
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
sgRNA	Single guide RNA = gRNA
SH	Src Homology
SPRED2	Sprouty-related, EVH1 domain containing 2
STAT	Signal Transducer and Activator Transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TracrRNA	Trans-activating CRISPR RNA
UBE2M	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses	21
Figure 2 : Acquisition de mutations génétiques d'une cellule embryonnaire vers un clone cancéreux	23
Figure 3 : Réseau intracellulaire des voies de signalisation dans la cellule cancéreuse	24
Figure 4 : Le déséquilibre oncogènes/suppresseurs de tumeurs dans le cancer	26
Figure 5 : Vue d'ensemble des protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans l'apoptose intrinsèque	27
Figure 6 : Le ciblage thérapeutique des caractéristiques du cancer	32
Figure 7 : Liste de dates d'autorisation de mise sur le marché des inhibiteurs de kinases	35
Figure 8 : Exemple de voies de signalisation suractivées dans des cancers avec des exemples de thérapies ciblées	36
Figure 9 : L'amorçage de l'apoptose et le mécanisme d'action des BH3-mimétiques	38
Figure 10 : Différentes stratégies de thérapies combinées utilisées dans le traitement de cancer	40
Figure 11 : Exemples de types de résistances génétiques aux thérapies ciblées	43
Figure 12 : Les cellules de la lignée myéloïde qui sont atteintes de la LMC	47
Figure 13 : La protéine BCR	49
Figure 14 : La protéine ABL1	50
Figure 15 : Localisation de points de cassures dans les gènes <i>BCR</i> et <i>ABL1</i> et structure des gènes de fusions résultants	52
Figure 16 : La protéine de fusion P210 BCR-ABL1	53
Figure 17 : Un modèle de la régulation de l'activité de BCR-ABL1	53
Figure 18 : Les mécanismes moléculaires responsables de la transformation maligne par BCR-ABL1	56
Figure 19 : Survie des patients LMC nouvellement diagnostiqués	59
Figure 20 : Le Glivec ou Gleevec en anglais (imatinib) est un inhibiteur compétitif de l'ATP	60
Figure 21 : Représentation des mutations dans le domaine kinase de BCR-ABL1	65
Figure 22 : Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase	69
Figure 23 : Le locus CRISPR-Cas	71
Figure 24 : Le système CRISPR-Cas9 est programmable	72
Figure 25 : Le module d'adaptation et l'intégration de protospacer dans le locus CRISPR	73
Figure 26 : Les locus Cas des deux classes de système CRISPR	75
Figure 27 : La maturation des crRNA et la reconnaissance et dégradation de nucléotides viraux	76
Figure 28 : La fusion des ARN CRISPR (crRNA) et trans-activating CRISPR (tracr) permet de maintenir l'activité endonucléase de la Cas9	77
Figure 29 : Représentation schématique d'une molécule ARN guide	78
Figure 30 : Représentation des domaines de la SpCas9	79
Figure 31 : Mécanisme de reconnaissance et de clivage d'ADN par CRISPR-Cas9	80
Figure 32 : Mécanismes de réparation de coupure double brin dans l'ADN	84
Figure 33 : Création de la librairie GeCKO	86
Figure 34 : Amplification des sgRNA pour préparation au séquençage NGS	94
Figure 35 : Niveaux d'expression de l'ARNm <i>SPRED2</i> dans des patients sensibles vs résistants	140
Figure 36 : Niveaux d'expression de l'ARNm <i>SPRED2</i> dans les populations cellulaires CD38+ vs CD38-	141
Figure 37 : Schéma récapitulatif des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib d'après notre criblage GeCKO et des possibles voies thérapeutiques	161
Figure 38 : Amplicon de PCR avant le séquençage nouvelle génération	167
Figure 39 : Dossier complet sur iOS avant le lancement de Cutadapt et MAGeCK	169
Figure 40 : Configuration de runcutadapt.sh	170
Figure 41 : Script pour lancer CutAdapt	170
Figure 42 : Fichiers Fastq avant et après CutAdapt	171
Figure 43 : Dossier iOS avec les fichiers fastq nouvellement créés	171
Figure 44 : Script pour lancer MAGeCK	172
Figure 45 : Analyse TIDE, exemple pour le gène <i>MED24</i>	173

Introduction

Le taux de mortalité causé par le cancer dans le monde ces 25 dernières années est en nette diminution grâce aux travaux de recherche qui, de manière régulière, dévoilent les vulnérabilités de cette pathologie et découvrent de nouveaux agents thérapeutiques efficaces et ciblés. Au cours de ces dernières années, mon travail de thèse était de découvrir des gènes, des voies de signalisation ou des mécanismes cellulaires potentiellement impliqués dans la résistance au traitement contre une forme de cancer du sang, la leucémie myéloïde chronique (LMC). Pour ce faire, nous avons dû mettre au point et utiliser une librairie de CRISPR-Cas9 pour effectuer un criblage génétique *in vitro* sur une lignée cellulaire de LMC. Grâce à cette technique, nous avons identifiés certains gènes essentiels pour la réponse optimale au traitement dans la LMC et en dernier lieu, nous avons essayé de viser ces gènes, pour découvrir de nouvelles thérapies efficaces contre cette pathologie.

Au cours de ce manuscrit, nous allons aborder plusieurs thématiques importantes concernant le cancer, son traitement et la possible résistance aux thérapies. C'est pour cela que dans un premier temps, il est essentiel de pouvoir caractériser cette maladie de manière générale, mieux comprendre les mécanismes cellulaires ciblés par les thérapies, pour ensuite appréhender comment la cellule cancéreuse peut résister au traitement. Ensuite, nous allons nous focaliser sur la pathologie phare de notre laboratoire, la LMC, en décrivant comment elle se traite actuellement et comment nous pourrions combattre les formes de résistance. Lors de la partie « Comment traiter le cancer ? », nous avons intentionnellement décrit plus en profondeur les mécanismes de thérapies ciblées antagonistes aux voies de prolifération, ou agonistes à l'apoptose puisque, au cours de mes travaux, ces voies ont été mises en évidence comme étant importantes pour une réponse au traitement. Nous évoquons également l'utilisation de thérapies combinées contre le cancer car cette stratégie a été adoptée en dernière partie de ma thèse.

Finalement, dans la troisième partie de l'introduction, nous allons décrire comment la technologie CRISPR-Cas9 a été découverte et comment nous pouvons l'utiliser pour effectuer des lignées knock-out ou des cribles génome entier sur des cellules de LMC. En effet, cette technique a bouleversé le monde de la recherche en génétique et a accéléré les découvertes dans ce domaine grâce à son efficacité et à sa facilité d'emploi. L'utilisation de bibliothèques de CRISPR-Cas9 associée au séquençage nouvelle génération et aux analyses bio-informatiques nous permet de facilement effectuer des criblages génome entier, afin de découvrir des mécanismes cellulaires et des gènes qui sont impliqués dans notre phénotype recherché : la résistance au traitement dans la LMC.

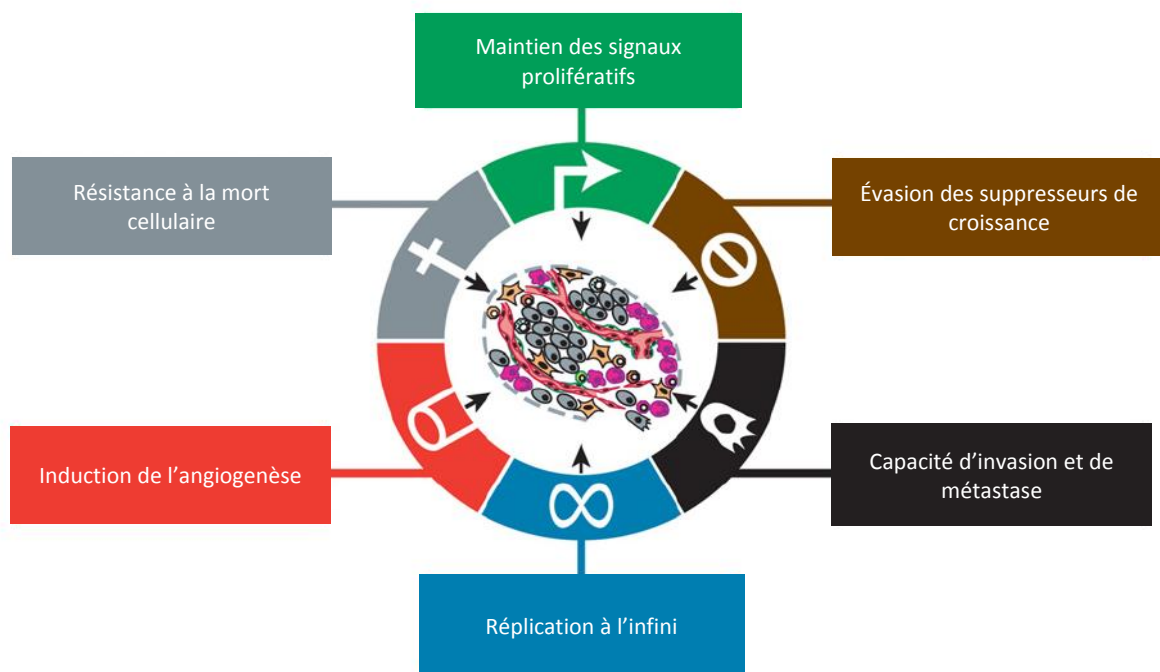
Dans la partie suivante, les résultats obtenus au cours de ce travail seront présentés sous deux formes. Premièrement, deux articles seront exposés, un de type « perspective » qui a été publié en 2016 et un article scientifique qui est actuellement sous revue dans le journal *Leukemia*. Ensuite, plusieurs résultats non-publiés seront décrits.

En dernier lieu, nous allons discuter des résultats obtenus en décrivant des mécanismes putatifs de résistance au traitement que nous avons observés au cours du criblage CRISPR-Cas9. En effet, certains des gènes et des mécanismes cellulaires sont de nos jours connus et étudiés, mais d'autres le sont moins. Nous discutons du rôle potentiel des gènes identifiés dans la résistance au traitement puis nous considérons certaines molécules thérapeutiques qui pourraient être utilisées seule ou en combinaison, pour le traitement de cellules initialement résistantes.

L'étude des mécanismes cellulaires qui forgent la progression cancéreuse et la résistance aux thérapies est essentielle, afin de continuer à découvrir des moyens de se battre contre cette pathologie si mortelle. Ce travail, ainsi que de milliers d'autres dans le monde, sert à mettre toutes les chances du côté des patients atteints de cancer pour qu'ils puissent, un jour, être traités de manière efficace contre tous types de prolifération néoplasique.

A) Les tumeurs malignes

Le cancer, première cause de mortalité en Europe de l'Ouest, est caractérisé par une prolifération cellulaire anormale et non contrôlée au sein d'un tissu de l'organisme. En 2018, environ 17 millions de nouveaux cas de cancer sont apparus dans le monde avec 9,6 millions de décès (selon Cancer Research UK). Le « cancer » est un terme utilisé pour désigner un ensemble de maladies différentes partageant les mêmes traits anormaux. D'après Hanahan et Weinberg, la majorité, voire tous les cancers, partagent les mêmes caractéristiques, nommées « The Hallmarks of Cancer » (**Figure 1**).^{1,2} Ces caractéristiques peuvent être soit, déjà présentes, c'est-à-dire transmises de manière héréditaire, soit acquises dans le temps par une cellule dues à l'accumulation de mutations génétiques dans l'ADN de la cellule. Les erreurs dans le génome peuvent provenir de facteurs internes et/ou externes, qui peuvent altérer l'expression de certains gènes primordiaux pour l'homéostasie cellulaire et la prolifération physiologique.^{3,4} Une fois que cette dérégulation est engendrée, les cellules débutent leur transformation cancéreuse.



Issue de « The Hallmarks of Cancer » Hanahan and Weinberg. Cell 2000

Figure 1 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses possèdent les caractéristiques ci-dessus. L'acquisition de chaque trait se fait par inactivation ou suractivation de gènes dans le génome de la cellule cancéreuse.

1) Les caractéristiques de la cellule cancéreuse

a) Une maladie résultant d'un dérèglement génétique

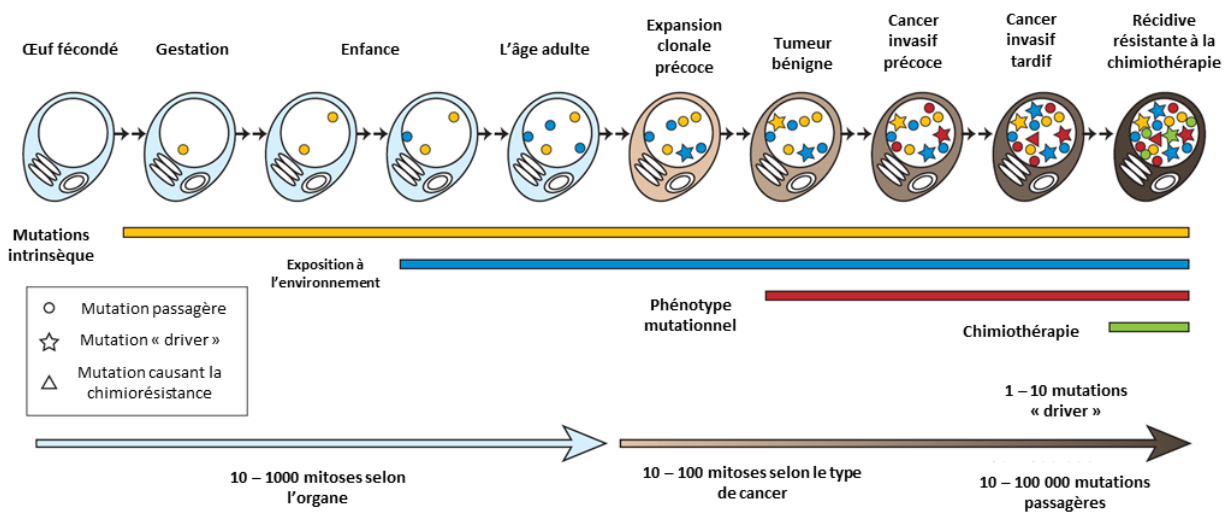
La transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse ou tumorale est un processus qui peut prendre du temps. Cette transformation est étroitement liée à l'intégrité génétique de la cellule. Des mutations dans l'ADN peuvent être déjà présentes, nommées mutations germinales qui sont transmises de manière héréditaire, ou peuvent survenir au cours d'une vie. Ces dernières, dites somatiques, peuvent apparaître lentement de manière naturelle au fur et à mesure des divisions cellulaires, ou de façon plus agressive à cause d'un environnement néfaste.

L'acquisition de mutations génétiques est un processus totalement physiologique et normal. Ces modifications nucléotidiques, qui à l'origine forgent l'évolution naturelle des espèces, se manifestent au cours des divisions cellulaires et des étapes de réplication de l'ADN. En effet, la cellule accumule des erreurs non-réparées dans son ADN à chaque division cellulaire. Il est estimé qu'à chaque mitose, la machinerie de réplication d'ADN produit environ une erreur non réparée pour un milliard de nucléotides répliqués, c'est-à-dire qu'une cellule post-mitotique possède potentiellement trois mutations supplémentaires dans son ADN.⁵

L'environnement de la cellule joue également sur la survenue de mutations génétiques. Ces erreurs induites proviennent de facteurs externes, tels que des radiations ionisantes ou des produits chimiques.⁶ La fréquence d'acquisition de mutations somatiques induites, quant à elle, varie selon l'exposition d'un individu aux facteurs carcinogènes. Par exemple, un tabagisme actif, une exposition abusive aux rayonnements ultraviolets ou une mauvaise alimentation peuvent augmenter la fréquence de ces mutations somatiques.⁷⁻⁹

Bien que la grande majorité des mutations somatiques soit insignifiante (mutations passagères), certaines mutations peuvent occasionnellement altérer l'expression ou la fonction de gènes.¹⁰ Si le gène concerné appartient à la famille des régulateurs de la croissance ou de la survie cellulaire, un avantage prolifératif de la cellule mutée vis-à-vis des autres peut être acquis. Les mutations qui confèrent ce bénéfice sont appelées mutations pilotes ou mutations « driver » et l'accumulation de ces mutations peut être néfaste.¹¹ Effectivement, la transformation d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse nécessite entre 5 et 7 mutations pilotes.¹² De plus, ces mutations sont souvent accompagnées de milliers d'autres mutations moins significatives. De ce fait, la plupart des cancers possèdent en réalité entre 1 000 et 20 000 mutations génétiques différentes

(majoritairement des mutations passagères).^{13,14} La localisation des mutations et l'effet qu'elles peuvent avoir sur l'expression ou l'activité d'un gène vont influencer la cancérogenèse (**Figure 2**).



Issue de « The Cancer Genome » Streatton et al. Nature 2009

Figure 2 : Acquisition de mutations génétiques d'une cellule embryonnaire vers un clone cancéreux

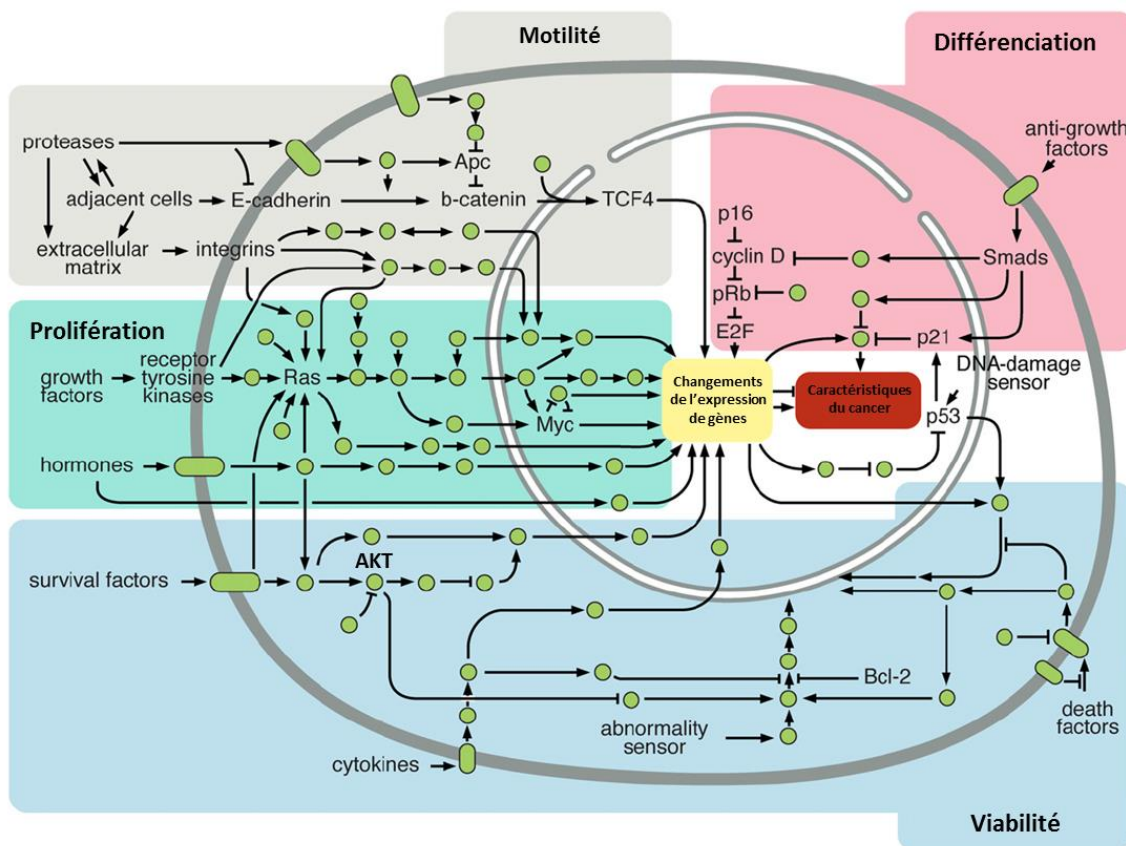
Les mutations génétiques peuvent survenir lorsque la cellule présente un phénotype normal. Ces mutations sont causées par des mécanismes intrinsèques et extérieurs. Les mutations passagères n'ont pas d'effet sur la cancérogenèse, à l'inverse des mutations pilotes qui forgent le phénotype cancéreux. L'éventuelle rechute du traitement est causée par des mutations de résistance qui précèdent souvent la thérapie.

Une forme supplémentaire de régulation de l'expression de gènes dans les cellules cancéreuses peut se manifester par une altération de l'épigénétique. En effet, certains gènes qui régulent la prolifération cellulaire peuvent être inactivés par méthylation ou par modification des histones. Ce contrôle additionnel participe de manière active au développement tumoral.¹⁵ Effectivement, si un gène est « éteint » à cause d'une mutation inactivatrice ou son expression est estompée par régulation épigénétique, le phénotype observé sera identique. Dans un cas, une protéine non-fonctionnelle sera produite, alors que dans un autre cas, la transcription du gène sera bloquée et donc la protéine ne sera pas exprimée. Ceci explique comment l'environnement peut influencer la progression tumorale et comment un clone cancéreux peut s'adapter à son environnement, grâce à une expression altérée de certains gènes. Ces cellules possèdent une certaine hétérogénéité et plasticité cancéreuses.¹⁶

De manière générale, avant que le cancer puisse se développer, le clone initiateur doit présenter des mutations pilotes dans des gènes ayant des caractéristiques particulières, plus spécifiquement dans des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée, la régulation des longueurs des extrémités chromosomiques, la capacité à induire la production de vaisseaux sanguins et la possibilité de générer des métastases.¹

b) Une prolifération non-contrôlée

La régulation de la prolifération, la viabilité, la motilité et la différenciation cellulaire sont des mécanismes extrêmement contrôlés par des réseaux complexes de gènes essentiels à la bonne physiologie de la cellule (Schématisée en **Figure 3**).



Adapté de « *The Hallmarks of Cancer, The Next Generation* » Hanahan and Weinberg. *Cell* 2011

Figure 3 : Réseau intracellulaire des voies de signalisation dans la cellule cancéreuse

Les circuits de prolifération et de viabilité dans le cancer sont gouvernés par des voies de signalisation essentielles. La prolifération est souvent dépendante de l'activité de la voie des MAPK et la survie cellulaire est gouvernée par la voie PI3K/AKT. La surexpression de ces oncogènes pousse la cellule vers une prolifération anarchique non-contrôlée. Également, une inactivation des suppresseurs de tumeurs a des conséquences importantes au niveau de l'état prolifératif de la cellule.

Une partie de ces gènes, appelés oncogènes, active la prolifération cellulaire tandis que les gènes suppresseurs de tumeurs bloquent cette multiplication. Dans une cellule normale, les gènes suppresseurs de tumeurs codent des protéines qui régulent étroitement l'intégrité cellulaire, en créant des points de contrôle du cycle cellulaire, en détectant et réparant des dommages à l'ADN ou en contrôlant la différenciation cellulaire, par exemple.¹⁷ Inversement, les oncogènes codent des protéines qui activent le cycle cellulaire en réponse à des signaux externes tels que des facteurs de croissance, des hormones ou des cytokines. De ce fait, une cellule normale ne prolifère pas en absence de signaux extracellulaires. La balance entre l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs est extrêmement contrôlée dans le temps pour maintenir une bonne physiologie cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, l'équilibre entre l'activation des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs est rompu.

Des mutations génétiques à gain de fonction dans les oncogènes poussent les cellules vers une prolifération anarchique et non-contrôlée.^{18,19} Contrairement à une cellule normale, la prolifération des cellules cancéreuses est indépendante des facteurs de croissance externes. Certains néoplasmes synthétisent eux-mêmes leurs facteurs de croissance pour induire une stimulation proliférative autocrine.²⁰ En revanche, d'autres prolifèrent grâce à une activation constitutive de voies de signalisation intracellulaires telles que principalement les voies mitogen-activated protein (MAP)-kinase, médiée par Ras²¹, ou phospho-inositide 3 (PI3)-kinase²² (**Figure 4**).

L'activation de la prolifération cancéreuse peut également survenir à cause de mutations pertes de fonction dans les gènes suppresseurs de tumeurs. Les deux gènes suppresseurs de tumeurs majeurs qui sont régulièrement inactivés dans le cancer codent les protéines RB (Rétinoblastoma) et TP53. Des mutations au sein du gène *Rb* causent une progression non-contrôlée dans le cycle cellulaire²³, tandis qu'un TP53 non fonctionnel se traduit par une mauvaise vérification et correction des dommages cellulaires ou dommages à l'ADN²⁴ (**Figure 4**).

Fréquemment, la cellule cancéreuse va accumuler des mutations activatrices d'oncogènes et inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces défauts participent conjointement à l'accélération de la prolifération cellulaire de manière non-contrôlée.

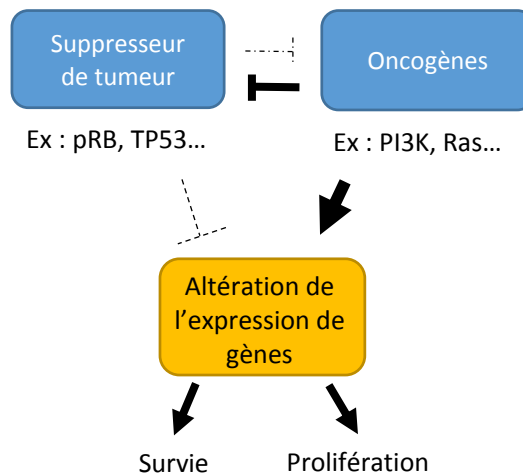


Figure 4 : Le déséquilibre oncogènes/suppresseurs de tumeurs dans le cancer

Dans les cellules cancéreuses, les supresseurs de tumeurs n'ont plus la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire ou de bloquer les oncogènes. A l'inverse, les oncogènes fonctionnent de manière exacerbée, entraînant prolifération anarchique.

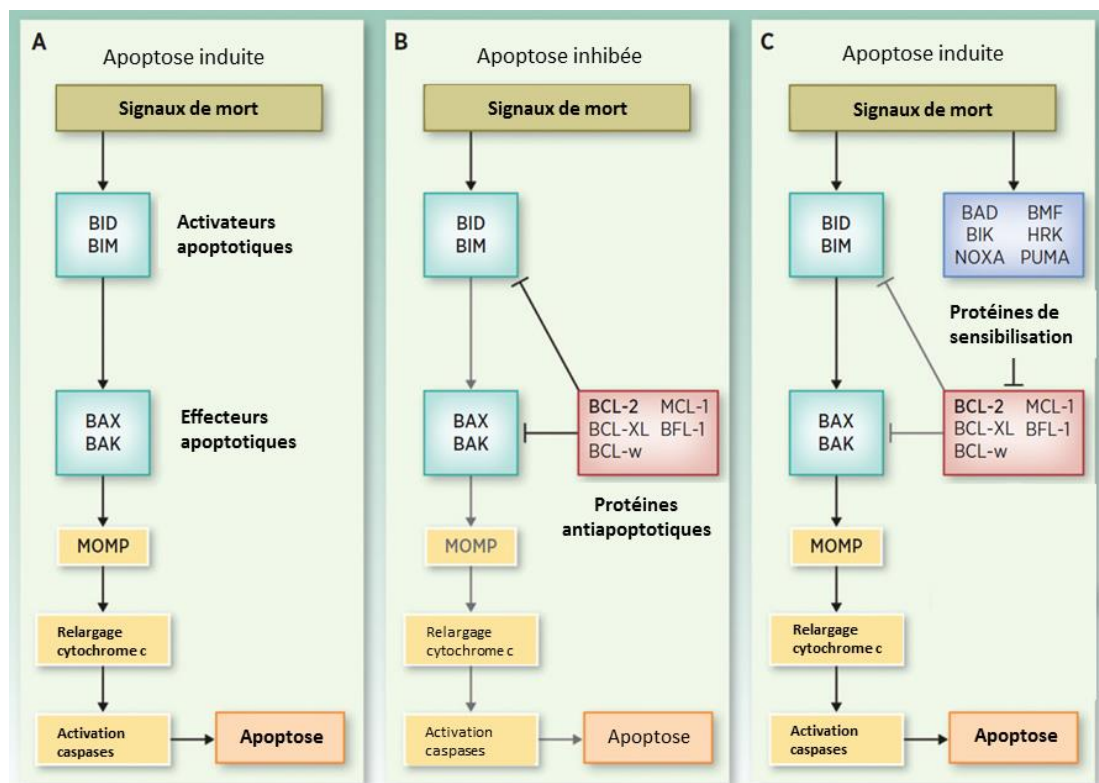
c) Une évasion de la mort cellulaire programmée

La capacité expansive des cellules cancéreuses ne provient pas uniquement d'une augmentation de la prolifération cellulaire, mais également d'une réduction de la mort cellulaire programmée, nommée apoptose. Ce mécanisme cellulaire est extrêmement important tout au long d'une vie pour le développement de certains tissus, le bon fonctionnement du système immunitaire et pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme.²⁵ L'induction de l'apoptose peut se faire via deux mécanismes distincts, par la transmission de signaux extracellulaires (apoptose extrinsèque) ou intracellulaires (apoptose intrinsèque).²⁵ Cette dernière constitue habituellement une barrière importante à la progression cancéreuse. Dans la plupart des cas physiologiques, la prolifération non-contrôlée des cellules induit un déséquilibre des protéines régulatrices de l'apoptose intrinsèque, ce qui déclenche la mort cellulaire programmée.²⁶

Les protéines de la famille B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) participent activement au contrôle de l'induction de l'apoptose dans la cellule. La protéine BCL-2, identifiée initialement comme étant surexprimée dans les lymphomes folliculaires t(14;18)²⁷, joue un rôle primordial dans l'inhibition de l'apoptose²⁸, en synergie avec BCL-x_L²⁹, BCL-w³⁰ et MCL-1³¹. Les protéines anti-apoptotiques inhibent les activateurs pro-apoptotiques BID et BIM en se liant à eux. Lorsque ces protéines sont séquestrées par les protéines anti-apoptotiques, BID et BIM ne sont pas capables d'interagir avec les effecteurs de l'apoptose, BAX et BAK, bloquant leur oligomérisation et la formation de pores

dans la membrane mitochondriale externe (MOMP)³², ce qui inhibe le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme. Afin d'activer l'apoptose, ce dernier se fixe au facteur APAF1 (apoptotic protease activating factor-1), formant ainsi un complexe multimérique de clivage de caspases, nommé apoptosome.³³ Le clivage des caspases est l'ultime étape avant l'induction de la mort cellulaire programmée.

Les membres de la famille BCL-2 séquestrent les protéines pro-apoptotiques en se liant à elles via un domaine partagé sous le nom de BCL-2 Homologie 3 (BH3).³⁴ L'inhibition de l'activité des protéines anti-apoptotiques peut se faire par le biais de protéines pro-apoptotiques de sensibilisation à l'apoptose (NOXA, PUMA, BAD). Elles n'agissent pas directement sur l'activation de BAX et BAK, mais par l'inhibition des membres de la famille BCL-2 en se liant à leur domaine BH3 (Figure 5)³⁵.



Adapté de « BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis » Gibson and Davids. AACR 2015

Figure 5 : Vue d'ensemble des protéines pro- et anti-apoptotiques impliquées dans l'apoptose intrinsèque

(A) Les signaux de mort cellulaire déclenchent l'activation de BAX et BAK par le biais de BID et BIM. Une fois formé, le MOMP permet le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme, ce qui induit l'activation des caspases via l'apoptosome et finalement, l'apoptose. (B) Les protéines anti-apoptotiques inhibent les activateurs BID et BIM ainsi que les effecteurs BAX et BAK, et bloquent la cascade d'activation d'apoptose. (C) Les signaux de mort cellulaire peuvent aussi activer les protéines pro-apoptotiques de sensibilisation, qui inhibent l'activité anti-apoptotique des protéines de la famille BCL-2.

Ce processus cellulaire est souvent défectueux ou inactif dans les cellules cancéreuses. Le suppresseur de tumeur TP53 joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose intrinsèque suite à des dommages à l'ADN. Comme précédemment élucidé, la protéine TP53 est souvent non-fonctionnelle dans les cellules cancéreuses, donc ne joue pas le rôle d'intermédiaire entre la détection des dommages chromosomiques et l'induction de l'apoptose.³⁶ Dans les cellules cancéreuses, la balance pro-/anti-apoptotique peut également être bouleversée par la variation de l'expression de gènes apoptotiques. Une surexpression de régulateurs anti-apoptotiques (BCL-2 ou BCL-x_L) ou une diminution de l'expression des protéines pro-apoptotiques (BAX, BIM, PUMA) sont des mécanismes fréquemment associés à la progression cancéreuse.^{37,38}

d) Une croissance illimitée

La prolifération non-contrôlée, couplée à une apoptose inactive, rend les cellules cancéreuses complètement indépendantes des signaux environnementaux. Cependant, toute cellule vivante possède un potentiel répliatif limité.³⁹ Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules entrent en sénescence et cessent de proliférer. L'arrêt de prolifération est causé par la diminution en taille des extrémités chromosomiques, nommées télomères. En effet, après chaque division cellulaire, la taille des télomères est diminuée.⁴⁰ Une fois que les télomères atteignent une taille limite, appelée limite de Hayflick, la cellule entre en sénescence ou en apoptose. Il est estimé qu'une cellule peut effectuer entre 50-70 divisions avant d'atteindre cette limite.⁴¹

Afin d'augmenter la capacité répliative d'une cellule, une enzyme nommée télomérase permet d'agrandir les télomères pour repousser l'évènement de sénescence.⁴² Dans environ 90% des cellules cancéreuses, des modifications génétiques ou épigénétiques peuvent causer une suractivation des télomérases, permettant ainsi un nombre de divisions cellulaires illimité.⁴¹ De manière moins répandue (10% des cas), les cellules cancéreuses peuvent également allonger la taille des télomères en utilisant un système alternatif, nommé ALT (« alternative lengthening of telomeres »).⁴³ Ce système utilise la recombinaison chromosomique afin d'agrandir la taille des extrémités chromosomiques.

e) Une induction de l'angiogénèse

La prolifération anarchique des cellules cancéreuses requiert une quantité élevée d'oxygène et de nutriments apportés par le sang. Afin de continuer à se développer, la masse tumorale doit induire une production de vaisseaux sanguins autour de son environnement. Initialement, les

lésions prolifératives ne possèdent pas la capacité d'induire l'angiogenèse, mais l'acquièrent au fur et à mesure de leur développement.⁴⁴ Cette aptitude est fortement liée à l'expression de facteurs tels que « vascular endothelial growth factor » – A (VEGF-A) ou « fibroblast growth factor » (FGF). Les cellules cancéreuses expriment ces facteurs non seulement en conditions hypoxiques mais également en réponse aux signaux oncogéniques intracellulaires (ex : EGFR, Raf, MEK, PI3K...).^{45,46} Une induction de l'angiogenèse par ces facteurs permet aux cellules cancéreuses de se fournir en molécules et nutriments, favorisant une croissance inhabituellement élevée. Une masse tumorale fortement vascularisée est souvent signe d'un cancer à un stade plutôt avancé.

f) Un potentiel d'envahissement et de métastases

Au cours du développement tumoral, certaines cellules envahissent le tissu sanguin et s'implantent ailleurs dans l'organisme. Ces colonies de cellules cancéreuses, ou métastases, causent 90% des décès suite à un cancer chez l'homme.⁴⁷ Les cellules peuvent envahir d'autres tissus de l'organisme pour profiter d'un nouvel environnement propice au développement et riche en nutriments. Le décrochage de cellules de la tumeur primaire, ainsi que l'envahissement d'un tissu sain par ces colonies cancéreuses passent par une métamorphose phénotypique de la cellule nommée transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ces cellules possèdent des capacités envahissantes, résistent à l'apoptose et peuvent se disséminer.⁴⁸ Elles accèdent à la TEM en exprimant des facteurs de transcription embryonnaires (Snail, Slug, Twist et Zeb1/2) qui servent lors de la morphogenèse au cours du développement de l'individu.⁴⁹ Une fois disséminées, les cellules cancéreuses peuvent coloniser des tissus proches ou lointains. Les mécanismes expliquant la colonisation de cellules circulantes cancéreuses dans un tissu secondaire sont extrêmement complexes car la bonne implantation de métastases dépend d'une multitude de facteurs.⁵⁰

g) De nouvelles capacités supplémentaires

La prolifération anarchique des cellules cancéreuses est caractérisée par les spécificités décrites ci-dessus. Récemment, de nouvelles capacités permettant la survie et la croissance de ces cellules ont été découvertes, notamment au niveau du microenvironnement tumoral et de sa disposition à moduler l'activité cytotoxique du système immunitaire.^{2,51} De manière physiologique, le système immunitaire reconnaît les croissances néoplasiques, entraînant un relargage de facteurs pro-inflammatoires (ex : IFN- γ et IL12), le recrutement de cellules tumoricides (ex : cellules NK, lymphocytes T) et la destruction de cellules néfastes. Au cours du développement cancéreux, les cellules tumorales acquièrent une capacité à moduler la réponse immunitaire, nommée

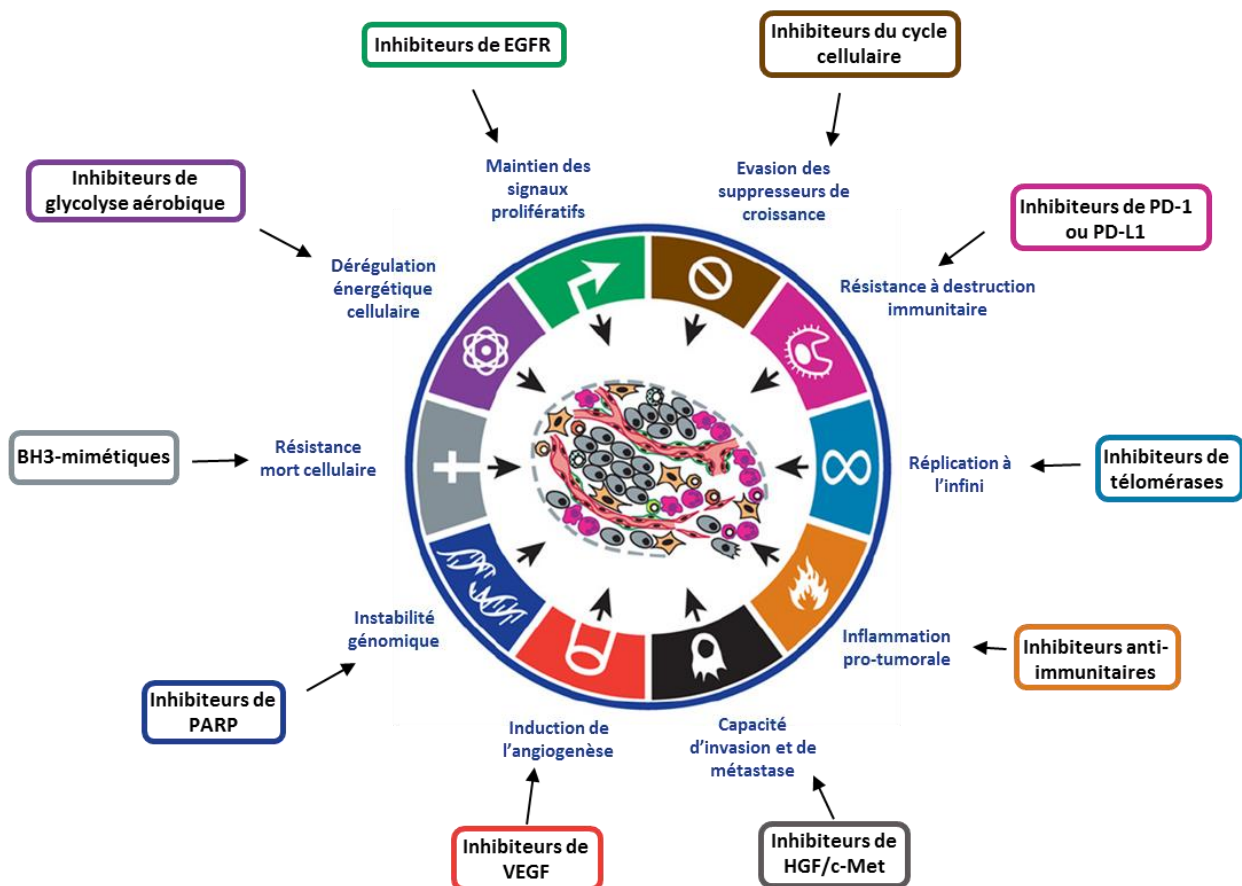
« immunoediting ». ⁵² Une fois activée, les cellules cancéreuses vont promptement modifier leur microenvironnement pour échapper à la surveillance immunologique, permettant à la masse tumorale de croître à l'abri des agressions immunologiques. De plus, d'autres types de cellules stromales, telles que les fibroblastes ou les cellules endothéliales, du fait de leur production et sécrétion de facteurs protumoraux, vont également participer à cette modulation du microenvironnement cancéreux. Nous parlons de fibroblastes associés aux tumeurs ou de cellules endothéliales associées aux tumeurs. ⁵³ En effet, le cancer n'est pas uniquement une masse de cellules tumorales, mais un mélange néfaste de cellules néoplasiques, stromales et immunitaires qui participent toutes à la progression de la pathologie.

Au fur et à mesure de la cancérogenèse, les cellules tumorales accumulent de plus en plus de caractéristiques cancéreuses du fait des altérations génomiques au sein de leur ADN. Les mutations aléatoires dans le génome ou l'inactivation épigénétique de certains gènes permettent la création de sous-clones cancéreux qui peuvent se développer de manière plus ou moins agressive. Cette accumulation de mutations génétiques au sein de la cellule cancéreuse est devenue possible grâce à une diminution de la maintenance de l'intégrité génomique et/ou par une augmentation de la sensibilité des cellules aux agents mutagéniques. ⁵⁴ Ici, le rôle de TP53 est essentiel, car de manière physiologique ce suppresseur de tumeur repère les aberrations génomiques et force les cellules à rentrer en sénescence ou en apoptose. ⁵⁵ Ce rôle primordial a fait de TP53 le « gardien du génome ». ⁵⁶ Des mutations inactivatrices dans le gène *TP53*, ou dans d'autres gènes codant des protéines impliquées dans l'intégrité génomique, rendent la cellule extrêmement susceptible à l'accumulation de mutations et d'aberrations génomiques. L'instabilité du génome participe de manière active à la progression tumorale et ainsi, les sous-clones les plus aberrants et mutés auront tendance à accroître rapidement et à dominer l'environnement tumoral de manière néfaste.

Finalement, le métabolisme des cellules cancéreuses est reprogrammé afin de favoriser des formes de production d'énergie (ATP) différentes. En présence d'oxygène, ou en condition aérobie, les cellules normales produisent de l'ATP par le biais du glucose, qui est converti en pyruvate dans le cytoplasme puis en dioxyde de carbone dans la mitochondrie. En conditions hypoxiques, ou conditions anaérobiques, la glycolyse est préférée, sans passer par la production de pyruvate. Le métabolisme anormal des cellules cancéreuses a été initialement observé en 1956. ⁵⁷ En effet, même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses reprogramment leur métabolisme du glucose pour produire de l'ATP quasi-exclusivement par glycolyse. Ce programme métabolique a ainsi été nommé « glycolyse aérobie ». Afin de se fournir en quantité suffisante de glucose, les cellules tumorales

amplifient l'import de ce sucre en augmentant l'expression de transporteurs, notamment GLUT1.⁵⁸ Ces cellules ont été décrites comme ayant l'effet Warburg, ce qui correspond à une production augmentée de lactate suite à une métabolisation élevée du glucose dans le cytoplasme par glycolyse.⁵⁹ De manière intéressante, ces cellules peuvent ensuite sécréter le lactate qui sera capté par les cellules cancéreuses avoisinantes. Ces dernières emploient le programme de métabolisme des acides citriques pour transformer le lactate en ATP.⁶⁰

La cancérogenèse est un processus complexe qui comprend de multiples transformations au sein de la cellule tumorale. Afin d'acquies une prolifération cancéreuse, un clone cellulaire doit subir plusieurs mutations génétiques aléatoires dans son génome qui affectent la progression tumorale et la survie cellulaire. Les caractéristiques citées ci-dessus sont obligatoires pour la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. L'accumulation de plusieurs caractéristiques peut accélérer la croissance néoplasique, modifier l'interaction du cancer avec son microenvironnement et augmenter sa capacité à envahir des tissus secondaires. Le traitement de cette pathologie cherche à cibler ces caractéristiques afin de tuer, de manière spécifique ou non, les cellules cancéreuses. En effet, chaque caractéristique citée ci-dessus peut potentiellement être ciblée par des agents thérapeutiques (**Figure 6**).



Adapté de « *The Hallmarks of Cancer, The Next Generation* » Hanahan and Weinberg. *Cell* 2011

Figure 6 : Le ciblage thérapeutique des caractéristiques du cancer

Les agents thérapeutiques qui interviennent dans la prolifération et la progression des cellules cancéreuses ciblent les caractéristiques du cancer. Les molécules citées sont uniquement des exemples illustratifs.

2) Comment traiter le cancer ?

Le traitement du cancer au cours de l'Histoire de l'Homme a drastiquement évolué grâce à la progression constante de la compréhension des processus biologiques causant cette pathologie. L'ablation de masses tumorales par chirurgie a été utilisée dès l'Égypte Antique (1500 av. J.C), la radiothérapie a été développée au cours du 19^e siècle, la chimiothérapie et les thérapies ciblées sont issues de travaux du 20^e siècle. De nos jours, de nouvelles stratégies thérapeutiques émergent avec les découvertes scientifiques actuelles, telles que l'immunothérapie, l'utilisation de thérapies ciblées combinatoires ou les outils permettant l'oncologie de précision.

a) L'origine des traitements anticancéreux

Les stratégies thérapeutiques anticancéreuses ont significativement évolué dans le temps avec une meilleure compréhension de la maladie. La première stratégie utilisée était la chirurgie, une opération ayant pour but de réaliser une ablation complète de la masse tumorale visible. Avec l'emploi d'anesthésie par John Collins Warren en 1846 et l'utilisation d'antiseptiques par Joseph Lister en 1867⁶¹, le domaine de la chirurgie anticancéreuse a véritablement pris de l'ampleur.⁶² Trois chirurgiens pionniers ont largement contribué à l'évolution de ce domaine : Billroth en Allemagne, Handley en Angleterre et Halsted aux Etats-Unis.⁶³ Cependant, l'intervention par chirurgie restait relativement dangereuse car elle provoquait des taux élevés de mortalité à l'époque.

Plusieurs décennies plus tard, grâce à la découverte du radium par Marie Curie, l'ère de la radiothérapie oncologique a démarré. Principalement deux différents types de radiothérapie existent, la radiothérapie interne et externe. L'institut Curie a mis au point le traitement par radiothérapie interne, nommé curiethérapie. Pour ce faire, l'isotope radioactif est mis en contact ou en proximité directe de la masse tumorale. Ce type de traitement est utilisé pour soigner de multiples cancers. La radiothérapie externe, quant à elle, doit son existence à Wilhelm Röntgen qui a découvert les rayonnements X. En effet, ces rayonnements sont utilisés pour diagnostiquer des maladies de manière non invasive, mais aussi pour traiter le cancer par radiothérapie externe. Les rayonnements ionisants émis par radiothérapie produisent des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses ciblées, ce qui induit leur mort cellulaire.⁶⁴

Au milieu du 20^e siècle, l'amélioration des technologies en physique et en informatique a permis l'utilisation de la radiothérapie de manière précise. En effet, un radiologue peut cibler la masse tumorale avec une grande spécificité afin de la détruire.⁶²

En parallèle des découvertes en physique autour des rayonnements ionisants et radioactifs, Paul Ehrlich étudiait l'utilisation de produits chimiques à potentiel thérapeutique pour le cancer, qu'il nomma « chimiothérapies ».⁶⁵ Le potentiel de tels produits chimiques a été compris après que l'utilisation de gaz moutarde en 1943 et des antagonistes de l'acide folique en 1948 induisirent une rémission temporaire chez des enfants atteints de leucémie.⁶⁵ Le principe de la chimiothérapie est simple, les substances chimiothérapeutiques fonctionnent en bloquant la mitose et en tuant toute cellule ayant une croissance élevée.⁶⁶ La dose de la chimiothérapie à administrer doit être calculée pour limiter les effets secondaires tout en impactant la prolifération cancéreuse. Malheureusement, ce type de traitement n'est pas ciblé, il tue également les cellules saines ayant un niveau de prolifération élevé.

b) La révolution de la thérapie ciblée

Même si l'utilisation de la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie ont révolutionné le traitement du cancer, ces traitements, seuls, ont des défauts non-négligeables. La chirurgie localisée ne permet pas d'éliminer les cellules cancéreuses circulantes ou métastases, la radiothérapie peut causer des dommages à l'ADN dans les cellules saines, produisant ainsi des cancers secondaires, et la chimiothérapie cible les cellules cancéreuses et les cellules saines à croissance rapide, causant un grand nombre d'effets secondaires.

A partir des années 1980, les avancées dans la compréhension des causes biologiques du cancer ont permis le développement de thérapies ciblées. Grâce aux innovations technologiques, de nouveaux systèmes de criblage de composés pharmaceutiques et la découverte de cibles thérapeutiques propres au cancer, de nouveaux traitements ciblés anticancéreux sont apparus. L'archétype des thérapies ciblées est l'imatinib mesylate (Gleevec), une molécule à structure relativement simple qui possède toutes les caractéristiques idéales en tant que composé de thérapie ciblée.⁶⁷ En effet, l'imatinib a révolutionné le traitement des patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) en ciblant et inhibant la kinase BCR-ABL1, une protéine de fusion codée par la translocation chromosomique caractéristique de la pathologie.⁶⁸ Depuis la mise sur le marché de l'imatinib, une multitude de petites molécules à activité ciblée antitumorale ont été générées et

utilisées pour le traitement de divers cancers. Depuis 2001, plus de 10 000 brevets ont été déposés pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de kinases aux Etats-Unis.⁶⁹

c) La thérapie ciblée contre la prolifération non-contrôlée

La prolifération cancéreuse est le fruit de multiples évènements cellulaires, dont l'activation ou l'augmentation d'expression de certains oncogènes qui codent des protéines activatrices des voies de prolifération cellulaire. Inhiber l'activité de ces protéines est une stratégie thérapeutique importante et a fait l'objet d'un grand nombre d'essais cliniques pour essayer de nouveaux traitements efficaces contre le cancer. En effet, chaque agent thérapeutique peut cibler le ou les facteurs oncogéniques spécifiques d'un type de cancer. Avant 2018, 37 inhibiteurs de kinases ont été autorisés sur le marché, dont 31 anticancéreux (**Figure 7**).⁶⁹

Autorisation de mise sur le marché aux USA des inhibiteurs de kinases									
2003	2004	2005	2006	2007	2009	2011	2012	2013	2014
◆ Imatinib (2001) ◆ Gefitinib	◆ Erlotinib	◆ Sorafenib	◆ Sunitinib	◆ Lapatinib ◆ Dasatinib	◆ Temsirolimus ◆ Everolimus ◆ Nilotinib	◆ Vemurafenib ◆ Vandetanib ◆ Ruxolitinib ◆ Crizotinib	◆ Axitinib ◆ Regorafenib ◆ Pazopanib ◆ Tofacitinib ◆ Cabozantinib ◆ Bosutinib ◆ Ponatinib	◆ Afatinib ◆ Dabrafenib ◆ Trametinib ◆ Ibrutinib	◆ Ceritinib ◆ Idelalisib ◆ Nintedanib ◆ Alectinib
2015	2016	2017							
◆ Lenvatinib ◆ Osimertinib ◆ Palbociclib		◆ Brigatinib ◆ Alectinib ◆ Ribociclib ◆ Midostaurin ◆ Osimertinib							

Adapté de « Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions » Bhullar et al. *Molecular Cancer* 2018

Figure 7 : Liste de dates d'autorisation de mise sur le marché des inhibiteurs de kinases

Dans le cas de la LMC, l'imatinib peut inhiber efficacement la croissance cellulaire en bloquant la kinase BCR-ABL1 suractivée. Cette molécule peut également cibler d'autres types d'enzymes à activité tyrosine kinase, comme « stem cell factor receptor » (ou KIT), « *abl*-related gene » (ARG) et « platelet-derived growth factor receptor » A et B (PDGFRA et PDGFRB)⁷⁰, la rendant

efficace pour le traitement de pathologies supplémentaires telles que les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST)⁷¹ et le syndrome d'hyperéosinophilie (HES).⁷² En effet, l'imatinib peut cibler et inhiber la suractivation de KIT dans les GIST et de PDGFRB dans les HES.

Des voies de signalisation complémentaires peuvent aussi être ciblées par de petites molécules anticancéreuses. Par exemple, le sorafenib permet une inhibition de la suractivation de la voie des MAPK en ciblant VEGF, souvent hyperactif dans les carcinomes hépatocellulaires et les carcinomes rénaux avancés, et les inhibiteurs de « epidermal growth factor receptor » (EGFR), gefitinib et erlotinib, permettent de bloquer la prolifération de cellules du cancer du poumon non-à-petites cellules, en inhibant aussi la voie des MAPK.⁷³⁻⁷⁵ Inhiber cette voie de prolifération peut aussi se faire en aval, en bloquant l'activité de MEK1/2 par le pimasertib ou le trametinib, par exemple. Par ailleurs, cibler la voie de PI3K par les petites molécules temsirolimus et everolimus est aussi une stratégie thérapeutique efficace, car cette voie de signalisation est suractivée dans un grand nombre de cancers (vessie, cerveau, sein, poumon, prostate, mélanome, cellules rénales et thyroïde) (**Figure 8**).^{76,77}

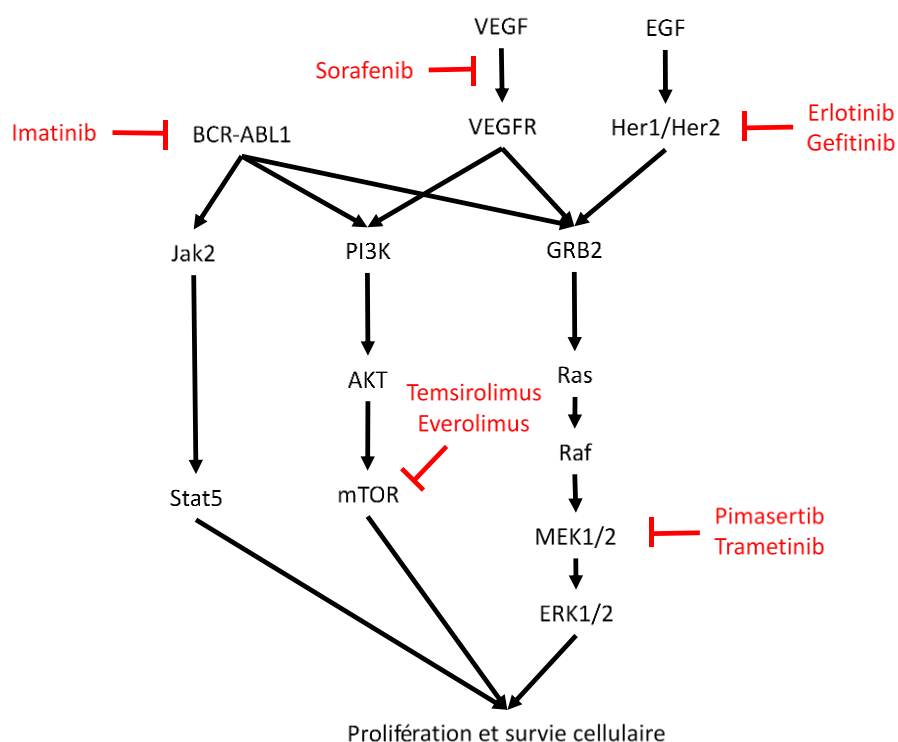


Figure 8 : Exemple de voies de signalisation suractivées dans des cancers avec des exemples de thérapies ciblées

En noir, les voies de signalisation Jak2/Stat5, PI3K/AKT/mTOR et Ras/Raf/MEK/ERK, souvent suractivées dans le cancer. L'activation de ces voies peut se faire par l'expression de la protéine de fusion BCR-ABL1, ou par l'activation de récepteurs à activité kinase VEGFR et Her1/Her2. En rouge, les agents thérapeutiques ciblés contre l'activation de ces voies de signalisation.

L'inhibition des voies de signalisation dans les cellules cancéreuses par thérapie ciblée de type cytostatique, en bloquant la prolifération cellulaire, induit une activation des signaux pro-apoptotiques intracellulaires d'ores et déjà amorcés. Les cellules créent des pores mitochondriaux et entrent de manière irréversible en apoptose.

d) Induire l'apoptose grâce aux BH3-mimétiques

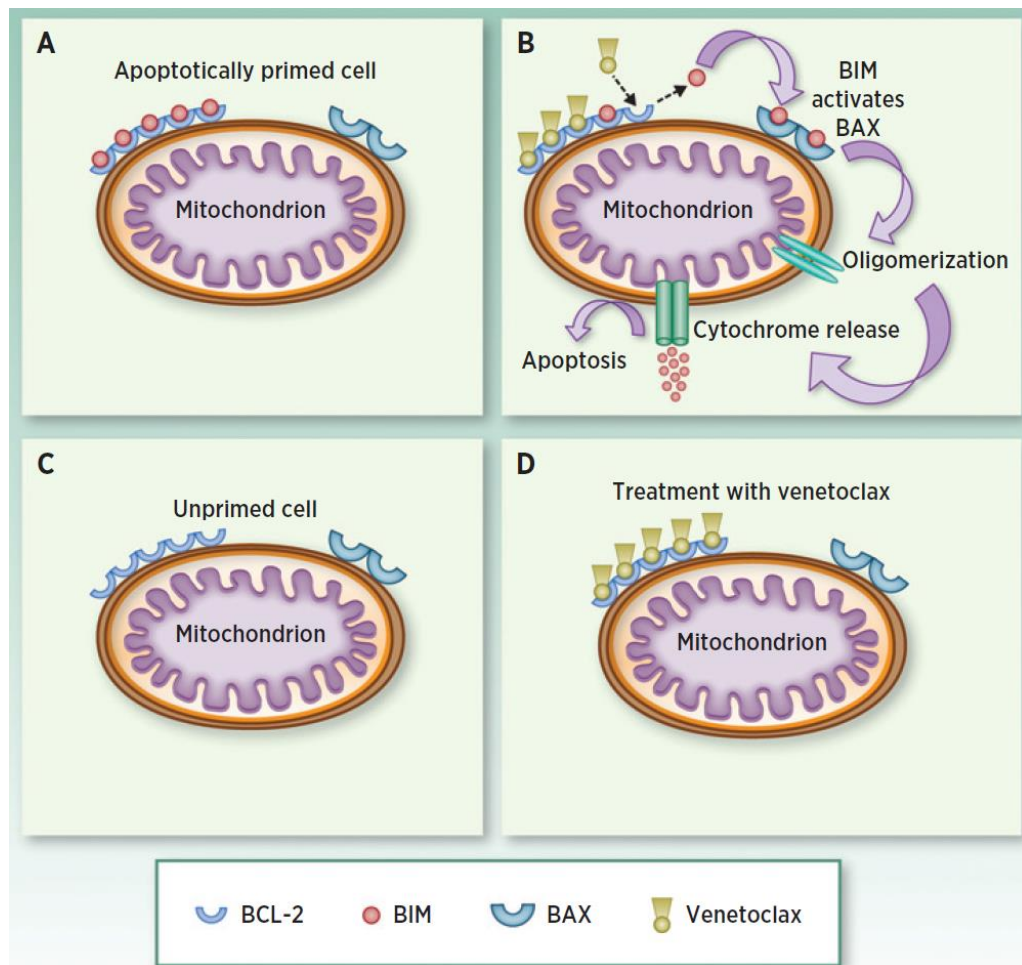
Une autre stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer est l'utilisation de molécules qui induisent directement l'apoptose. Cette méthode pourrait, en théorie, réactiver la mort cellulaire programmée dans les cellules cancéreuses afin de les éliminer en ciblant les protéines du programme d'apoptose intrinsèque.⁷⁸

Les protéines de la famille BCL-2 participent activement au contrôle de l'induction de l'apoptose dans la cellule en inhibant les facteurs pro-apoptotiques en se liant à leur domaine BH3. Cette inhibition physiologique peut être mimée avec l'utilisation de molécules pharmaceutiques nommées BH3-mimétiques. Les antagonistes les plus puissants et sélectifs de BCL-2 sont de nos jours développés par le laboratoire Abbott, en commençant par l'ABT-737⁷⁹ et son homologue biodisponible par voie orale, le navitoclax (ABT-263)⁸⁰ puis avec le venetoclax (ABT-199)⁸¹. Ces molécules, nommées BH3-mimétiques, miment l'action pro-apoptotique des protéines à domaine unique BH3 en se liant directement aux domaines de liaison BH3 des molécules anti-apoptotiques, libérant ainsi les activateurs et effecteurs d'apoptose, BIM, BID, BAX et BAK, dans les cellules amorcées à l'activation de l'apoptose (**Figure 9**).

Le navitoclax, ou ABT-263, possède une forte affinité pour BCL-2, BCL-x_L et BCL-w.⁸⁰ En clinique, le navitoclax est utilisé en essai avec des résultats encourageants pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) réfractaire ou en rechute, avec des taux de réponse partielle à 35% et avec des niveaux de survie sans progression de la maladie plus élevés.⁸² Par contre, du fait de l'inhibition de BCL-x_L, le développement de thrombocytopenie comme effet secondaire était parfois associée à ce traitement. Pour cette raison, le laboratoire Abbot a généré le venetoclax, ou ABT-199, qui inhibe BCL-2 de manière spécifique, avec trois fois moins d'affinité pour BCL-x_L.⁸¹

De nos jours, le venetoclax est utilisé en essais cliniques pour le traitement de la LLC, en monothérapie⁸³ ou en combinaison avec des anticorps monoclonaux⁸⁴ et des agents cytotoxiques⁸¹. La LLC est caractérisée par une augmentation de l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2, la cible directe du traitement par BH3-mimétiques.⁸⁵ Des études précliniques ont également démontré l'activité significative du venetoclax dans le traitement de nombreuses formes de lymphomes non-

Hodgkiniens⁸¹, ainsi que dans la leucémie aiguë myéloïde⁸⁶. Généralement, l'administration de BH3-mimétiques se fait pour des types de cancers ayant un niveau d'expression élevé de BCL-2.



Issue de « BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis » Gibson and Davids. AACR 2015

Figure 9 : L'amorçage de l'apoptose et le mécanisme d'action des BH3-mimétiques

(A) Dans une cellule amorcée à l'apoptose, BCL-2 ou d'autres protéines anti-apoptotiques séquestrent les protéines pro-apoptotiques, comme BIM. (B) La liaison des BH3-mimétiques à BCL-2 libère BIM qui active BAX (ou BAK). (C) Une cellule non amorcée à l'apoptose exprime peu de BIM. (D) Le traitement par BH3-mimétiques dans une cellule non amorcée à l'apoptose est donc inefficace.

Un nombre de questions concernant les mécanismes d'action des BH3-mimétiques et de BCL-2 dans le cancer restent toujours sans réponse. Une piste thérapeutique intéressante à exploiter serait de mieux comprendre l'utilité des BH3-mimétiques en combinaison avec d'autres thérapies. Le venetoclax ou le navitoclax pourrait agir en tant qu'agent chimiosensibilisant en combinaison avec des chimiothérapies classiques ou ciblées en bloquant plusieurs caractéristiques du cancer simultanément.

e) La thérapie combinée contre le cancer

L'utilisation de thérapie combinée, un programme de traitement qui associe au minimum deux agents thérapeutiques, est actuellement en plein essor. L'amalgame de drogues anticancéreuses améliore l'efficacité de traitement en comparaison à la monothérapie puisque cette approche cible des voies caractéristiques du cancer de manière additive ou synergique. La thérapie combinée pourrait réduire les taux de résistances aux traitements initiaux, en apportant des effets anticancéreux en réduisant la prolifération cellulaire simultanément à l'induction de l'apoptose, par exemple.⁸⁷

Le choix des molécules thérapeutiques à administrer en combinaison au patient se décide selon un certain nombre de critères. Dans un premier temps, une analyse et une caractérisation de la population de cellules cancéreuses doivent être effectuées, couramment par séquençage d'un panel de gènes ou du génome entier. Si, au cours de cette analyse, des aberrations génétiques sont identifiées dans plusieurs gènes ou dans plusieurs voies de signalisation, une stratégie de thérapie combinatoire peut être envisagée.^{88,89} Les agents thérapeutiques administrés peuvent cibler deux voies de signalisation parallèles (combinaison horizontale), deux cibles dans la même voie de signalisation (combinaison verticale), deux sites de liaison sur la même cible protéique (combinaison allostérique) ou deux mécanismes cellulaires différents (combinaison indépendante). Par exemple, un patient atteint d'un mélanome muté Braf V600E, une mutation présente dans environ 50% des mélanomes⁹⁰, qui présente une résistance au traitement simple par vemurafenib, un inhibiteur spécifique de Braf V600E, pourrait bénéficier d'une thérapie combinée verticale en associant le vemurafenib avec un inhibiteur de MEK, le cobimetinib (**Figure 10**, vert).⁹¹ Également, un patient atteint d'un cancer du poumon non-à-petites cellules avancé pourrait profiter d'un traitement par combinaison horizontale en inhibant de manière concomitante les activités de EGF et PI3K avec l'erlotinib et l'everolimus (**Figure 10**, bleu).⁹² Similairement, des études évaluant l'effet d'une inhibition combinée de BCR-ABL1 par traitement de combinaison allostérique par le nilotinib et l'ABL001 sont actuellement en cours (**Figure 10**, violet).⁹³ En effet, le nilotinib, inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération d'ABL1, et l'ABL001, inhibiteur du site de myristoylation d'ABL1, peuvent agir de manière simultanée sur la même cible, BCR-ABL1. Finalement, une combinaison indépendante peut être envisagée pour le traitement de la leucémie aiguë myéloïde en combinant le BH3-mimétique navitoclax avec un inhibiteur de MEK1/2, le pimasertib (**Figure 10**, rouge).⁹⁴

Plusieurs start-ups aux Etats-Unis utilisent le séquençage nouvelle génération couplé à des analyses bio-informatiques pour trouver la meilleure combinaison thérapeutique possible

pour un cancer en particulier. CureMatch, une société basée à San Diego en Californie, utilise le « machine learning » et l'intelligence artificielle pour analyser les mutations génétiques d'un patient atteint d'un cancer et propose les meilleures combinaisons de traitements possibles pour le patient de manière personnalisée. Ainsi, chaque patient pourrait bénéficier d'une thérapie véritablement propre à l'état mutationnel de ses cellules cancéreuses.

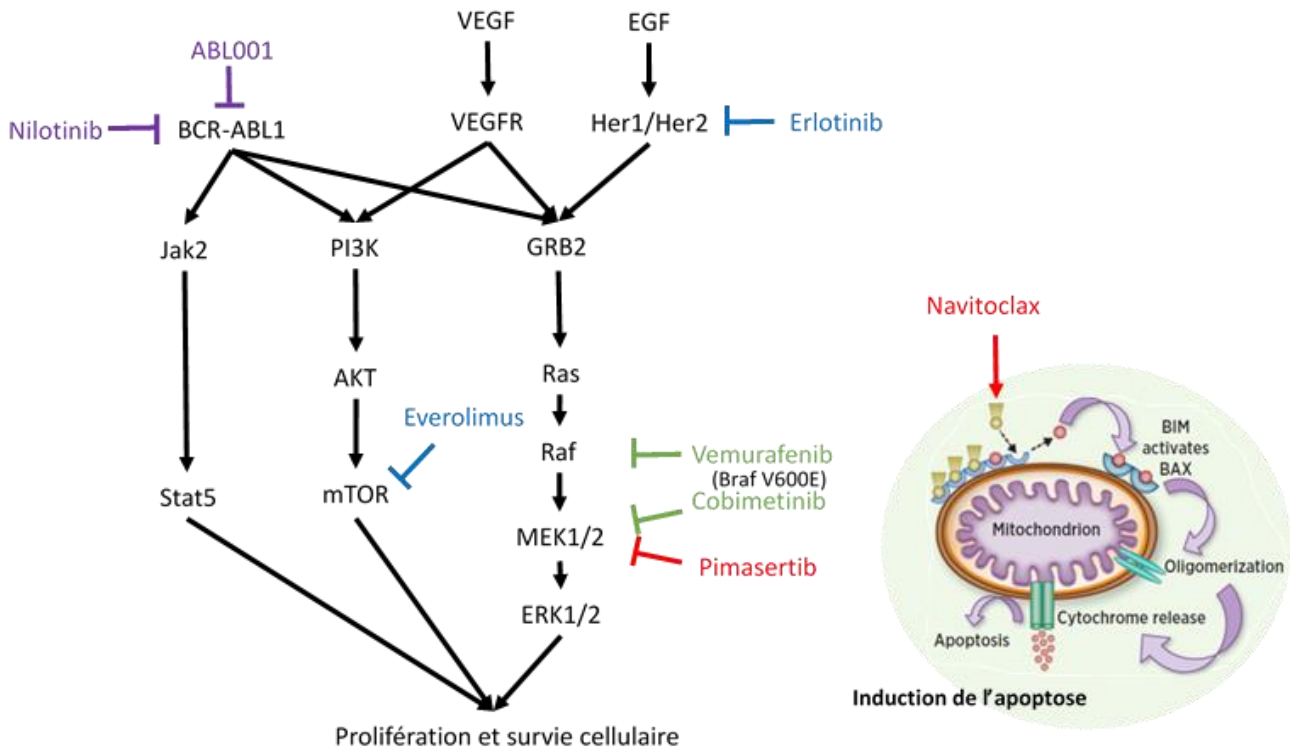


Figure 10 : Différentes stratégies de thérapies combinées utilisées dans le traitement de cancer

En vert, combinaison verticale, l'inhibition de Braf V600E par le vemurafenib et l'inhibition de MEK1/2 par le cobimetinib est efficace chez des patients atteints de mélanome Braf V600E avancé. En bleu, combinaison horizontale, l'inhibition de mTOR par l'everolimus et de Her2 par l'erlotinib agissent de manière synergique chez les patients atteints de cancer du poumon non-à-petites cellules. En violet, combinaison allostérique, l'inhibition de BCR-ABL1 par l'ABL001 et le nilotinib de manière concomitante permet de traiter des formes de leucémies myéloïdes chroniques résistantes. En rouge, combinaison indépendante, le pimasertib, inhibiteur de MEK1/2 bloque la prolifération et le navitoclax en induisant l'apoptose, coopèrent de manière synergique dans le traitement de la leucémie aiguë myéloïde.

L'oncogénèse est un processus complexe à plusieurs étapes impliquant de nombreuses aberrations génétiques parfois aléatoires. Il est alors compréhensible que le traitement personnalisé du cancer soit décidé selon l'état mutationnel des cellules cancéreuses ou selon le profil d'expression de certains gènes. Même si la combinaison de plusieurs agents anticancéreux peut augmenter les effets non-désirables, le bénéfice d'un tel traitement n'est pas négligeable. Le

choix d'effectuer une thérapie combinatoire peut se faire pour des formes de cancer avancées ou en cas de résistance au traitement initial.

f) Cibler l'environnement du cancer avec l'immunothérapie

Finalement, comprendre les mécanismes par lesquels les cellules cancéreuses interagissent avec leur environnement est un enjeu majeur pour la découverte de thérapies qui ciblent cette communication intercellulaire. De nos jours, de nombreuses équipes cherchent à manipuler ou mimer le système immunitaire pour spécifiquement éliminer les cellules tumorales. Les inhibiteurs de PD-1 (programmed cell death -1) et de PD-L1 (programmed cell death ligand 1) bloquent l'effet anti-inflammatoire des cellules cancéreuses, permettant ainsi leur destruction par activation des lymphocytes T et des macrophages.⁹⁵ Récemment, des laboratoires cherchent aussi à modifier directement les lymphocytes T en remodelant l'expression de certains récepteurs pour spécifiquement cibler une cellule tumorale. Ces cellules sont nommées « chimeric antigen receptor » – T (CAR-T) et de nos jours il existe plusieurs essais cliniques qui emploient ce type de traitement personnalisé.^{96,97}

3) La résistance aux traitements anticancéreux

Les avancées technologiques ont significativement contribué à la compréhension et aux traitements de multiples types de cancer, améliorant la durée et la qualité de vie de patients atteints de telles maladies. Cependant, la réponse favorable initiale au traitement peut évoluer, menant ainsi à une possible rechute. Ce phénomène de résistance au traitement est un problème majeur dans le traitement thérapeutique efficace du cancer.

a) Les formes de résistance

Il existe deux formes de résistance aux agents anticancéreux, la résistance primaire (ou intrinsèque) et la résistance secondaire (ou acquise). En cas de résistance primaire au traitement, les taux de réponses à la thérapie sont faibles dès la première exposition aux agents thérapeutiques. Fréquemment, certains types de carcinome hépatocellulaire, de cancer du rein et de mélanome malin manifestent des résistances intrinsèques à la chimiothérapie.⁹⁸ Dans d'autres cas, la réponse initiale au traitement est positive mais elle peut être suivie d'une rechute à mauvais pronostic, causée par l'acquisition de résistance dans le temps ou la sélection d'un clone rare résistant.⁹⁹ L'acquisition de résistance apparaît avec l'accumulation de mutations génétiques dans les cellules cancéreuses qui les rendent plus agressives et complexes. Ces cellules ne dépendent plus d'un seul mécanisme pour assurer leur prolifération et survie mais de plusieurs.¹¹

b) Les mécanismes de résistance

Les mécanismes de résistance aux agents anticancéreux peuvent provenir de nombreuses sources intracellulaires et extracellulaires. Ci-dessous sont exposés les mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux les plus courants. Parmi les mécanismes de résistance aux thérapies, l'accumulation de mutations génétiques, la surexpression de transporteurs, la réparation de l'ADN et le microenvironnement causent la majorité des formes de résistance.

i) L'accumulation de mutations génétiques

Le succès des thérapies ciblées a souvent été assombri par l'apparition de mutations génétiques supplémentaires abrogeant l'efficacité thérapeutique et rendant les cellules résistantes. Ces mutations peuvent soit, apparaître dans le gène codant la protéine ciblée par l'agent thérapeutique, changeant sa conformation et diminuant son affinité pour le traitement (mutation secondaire), soit apparaître dans d'autres voies parallèles, en inactivant des suppresseurs de

tumeurs ou en suractivant des oncogènes (activation par contournement). De plus, les protéines appartenant à la même voie de signalisation mais en aval de la cible thérapeutique peuvent être suractivées (activation en aval) et peuvent maintenir l'activation la voie de signalisation.¹⁰⁰

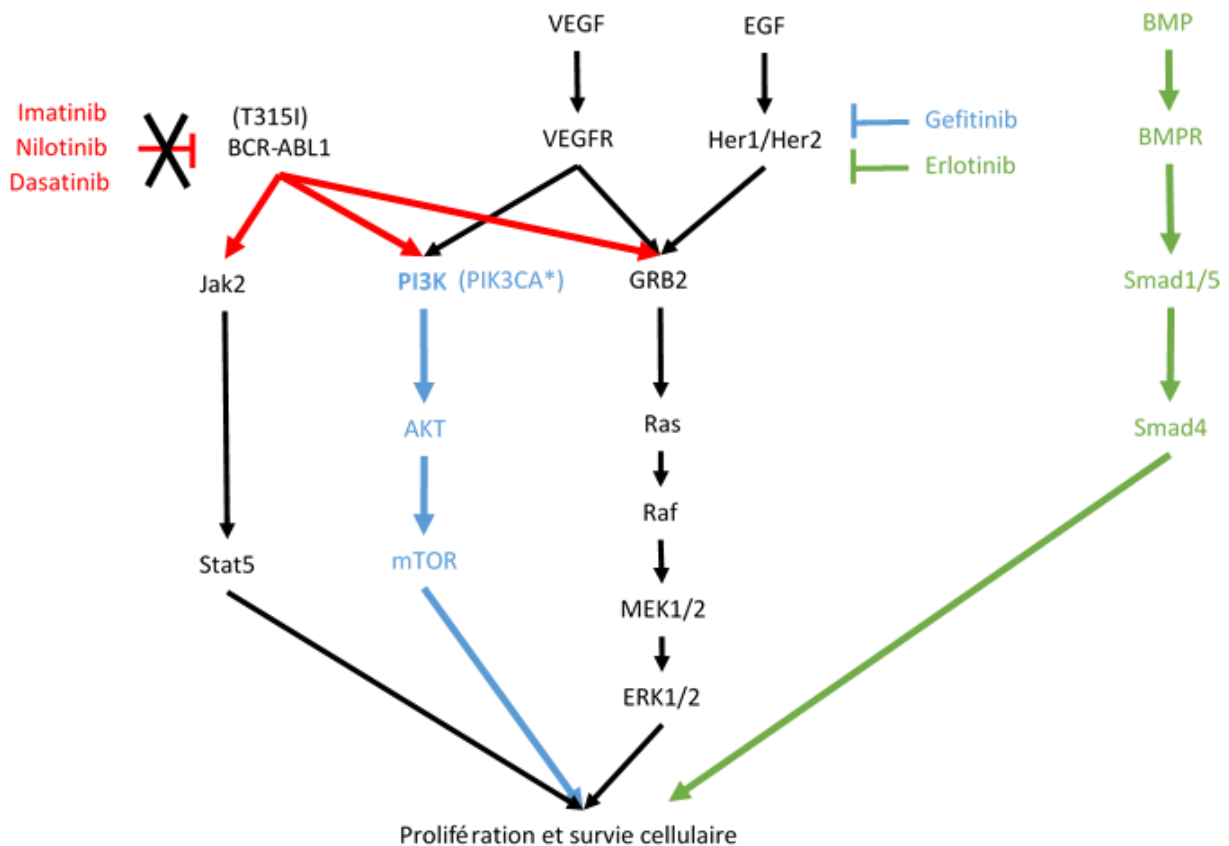


Figure 11 : Exemples de types de résistances génétiques aux thérapies ciblées

En rouge (résistance par mutation secondaire), la résistance aux inhibiteurs de BCR-ABL1 est due à la mutation T315I dans le domaine kinase d'oncogène. L'activation des voies Jak2/Stat5, PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK est maintenue, même en présence d'agent thérapeutique. En vert (résistance par activation par contournement de la prolifération), la résistance à l'erlotinib peut résulter d'une suractivation de la voie BMP-BMPR. En bleu (résistance par activation en aval), la résistance au gefitinib est causée par une suractivation de la sous-unité catalytique de PI3K, PIK3CA.

Il a été démontré par séquençage Sanger et de nouvelle génération que de multiples mutations dans le domaine kinase de ABL1 causent la résistance à l'imatinib, inhibiteur de BCR-ABL1, dans la leucémie myéloïde chronique.¹⁰¹ Les inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération (dasatinib et nilotinib) ont spécifiquement été générés afin de combattre cette résistance et peuvent être utilisés pour traiter de tels patients.^{102,103} Malheureusement, la mutation T315I dans le domaine kinase d'ABL1 rend la cellule résistante à ces inhibiteurs de deuxième génération (**Figure 11**, rouge).¹⁰⁴ D'autres voies de signalisation peuvent aussi être activées, causant

une réactivation de la prolifération par contournement de l'agent thérapeutique. L'activation concomitante de la voie de « bone morphogenic pathway » (BMP) peut engendrer des formes de résistance à l'inhibition de EGFR par l'erlotinib dans le cancer du poumon (**Figure 11**, vert).¹⁰⁵ Aussi, dans ce même type de cancer, la réactivation de la prolifération peut résulter de l'activation de protéines en aval de la cible thérapeutique. La suractivation de la sous-unité catalytique de PI3K, PIK3CA confère la résistance au gefitinib en suractivant la voie les PI3K/AKT/mTOR (**Figure 11**, bleu).^{106,107}

ii) La surexpression de transporteurs

Une grande partie des résistances primaires est associée à l'expression anormale de transporteurs ou de protéines membranaires. Ces protéines agissent soit directement, en exportant des molécules thérapeutiques hors de la cellule pour réduire leur concentration intracellulaire, ou indirectement en affectant l'accumulation d'agents thérapeutiques à travers des processus physico-chimiques.^{108,109} La surexpression de MDR1 (multidrug resistance 1), une pompe membranaire ATP-dépendante, est associée à la résistance au traitement pour un grand nombre de cancers¹¹⁰ par l'export actif de molécules thérapeutiques hors de la cellule cancéreuse.¹¹¹ Bien évidemment, d'autres pompes membranaires (ABCC1, ABCG2, MRP1...) peuvent participer aux phénotypes de résistance en agissant de manière similaire.¹¹²⁻¹¹⁴

iii) La réparation de l'ADN

Un exemple supplémentaire de processus cellulaire impliqué dans la résistance au traitement est le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN. Lorsque la cellule cancéreuse génère des mutations génétiques, induites ou non par les chimiothérapies, le mécanisme de réparation de l'ADN joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité génomique. Un gène important dans ce mécanisme est *ERCC1*, qui participe activement à la reconnaissance des dommages à l'ADN.¹¹⁵ La surexpression de ce gène dans le cancer du poumon non-à-petites cellules est corrélée à un mauvais pronostic pour les patients recevant un traitement de chimiothérapie alkylant à base de cisplatine.¹¹⁶ L'effet cytotoxique de cette chimiothérapie qui vise à générer des dommages irréversibles à l'ADN est abrogé par une augmentation de la réparation de ces erreurs.

Une autre protéine cruciale impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique est TP53, qui déclenche le processus apoptotique en réponse aux dommages à l'ADN. Ce « gardien du génome » a un rôle capital dans la carcinogenèse et dans la résistance aux thérapies. Si TP53 est muté, les cellules ne bloquent pas leur cycle cellulaire et ne sont pas capables d'induire l'apoptose.^{56,117}

iv) Le microenvironnement tumoral

Autour de la masse cancéreuse, le microenvironnement tumoral peut aussi agir sur la réponse optimale au traitement.¹¹⁸ Par exemple, le système immunitaire et les fibroblastes associés au cancer participent à la régulation du microenvironnement tumoral et à la croissance néoplasique. La modulation du système immunitaire par les cellules cancéreuses est un procédé actif qui permet le maintien de la prolifération anarchique des cellules néoplasiques, sans contrôle immunitaire ni inflammation.⁵² L'augmentation de l'expression de facteurs anti-inflammatoires (les interleukines IL-4, IL-13, IL-10) et de TGF- β , couplée à une diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires IFN- γ et IL-12, régulent la différenciation des cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK, inhibant ainsi leur activité cytotoxique et promouvant l'angiogenèse, l'activité de phagocytose, le remodelage tissulaire et les activités protumorales.^{119,120} Les fibroblastes associés au cancer, quant à eux, peuvent sécréter des facteurs qui augmentent la prolifération de cellules cancéreuses telles que « fibroblast growth factor » (FGF), « monocyte chemotactic protein 1 » (MCP-1), « platelet-derived growth factor » (PDGF), « tissue inhibitor of metalloprotease 1 » (TIMP-1) et « tumor transforming growth factor- β » (TGF- β).¹²¹ Ensemble, l'immunomodulation et la sécrétion des fibroblastes associées aux tumeurs augmentent la capacité proliférative des cellules cancéreuses, ce qui peut dominer sur l'effet des agents thérapeutiques et causer des formes de résistances aux traitements.^{99,118}

c) Comment remédier à la résistance aux traitements ?

Certains mécanismes de résistance dépendent de l'état mutationnel de la cellule cancéreuse, de l'expression de gènes impliqués dans le transport de molécules, la réparation de l'ADN ou dans la prolifération cellulaire. De même, la résistance au traitement peut provenir des cellules du microenvironnement tumoral, qui peuvent limiter la réponse inflammatoire et créer un milieu favorisant la prolifération et la survie. La stratégie de thérapie combinatoire pourrait être utilisée pour contrer ces formes de résistances primaires ou acquises, spécifiquement en ciblant des protéines suractivées, des cellules du système immunitaire ou des fibroblastes associés au cancer, de manière synergique avec les mutations pilotes initiales de la cellule cancéreuse. Avec l'accessibilité et l'émergence des technologies comme le séquençage nouvelle génération et le « machine learning » ou intelligence artificielle, les données génétiques de patients atteints d'un cancer pourraient être traitées de manière personnalisée, influençant ainsi le choix des agents thérapeutiques à administrer pour combattre spécifiquement les mutations présentes au sein du

cancer.¹²²⁻¹²⁴ Nous rentrons dans l'ère de l'oncologie de précision, une stratégie thérapeutique prometteuse qui pourrait être utilisée fréquemment dans le futur.¹²⁵

B) La leucémie myéloïde chronique (LMC) : une maladie modèle

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques sont des formes rares de cancers du sang à progression lente, dans lesquels la moelle osseuse effectue une surproduction de globules rouges, de globules blancs ou de plaquettes, qui s'accumulent dans le tissu sanguin. Les patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) présentent une augmentation de la prolifération de cellules myéloïdes matures (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et de précurseurs hématopoïétiques dans le sang (**Figure 12**).¹²⁶ C'est pour cela que l'on parle de maladie de la cellule souche.

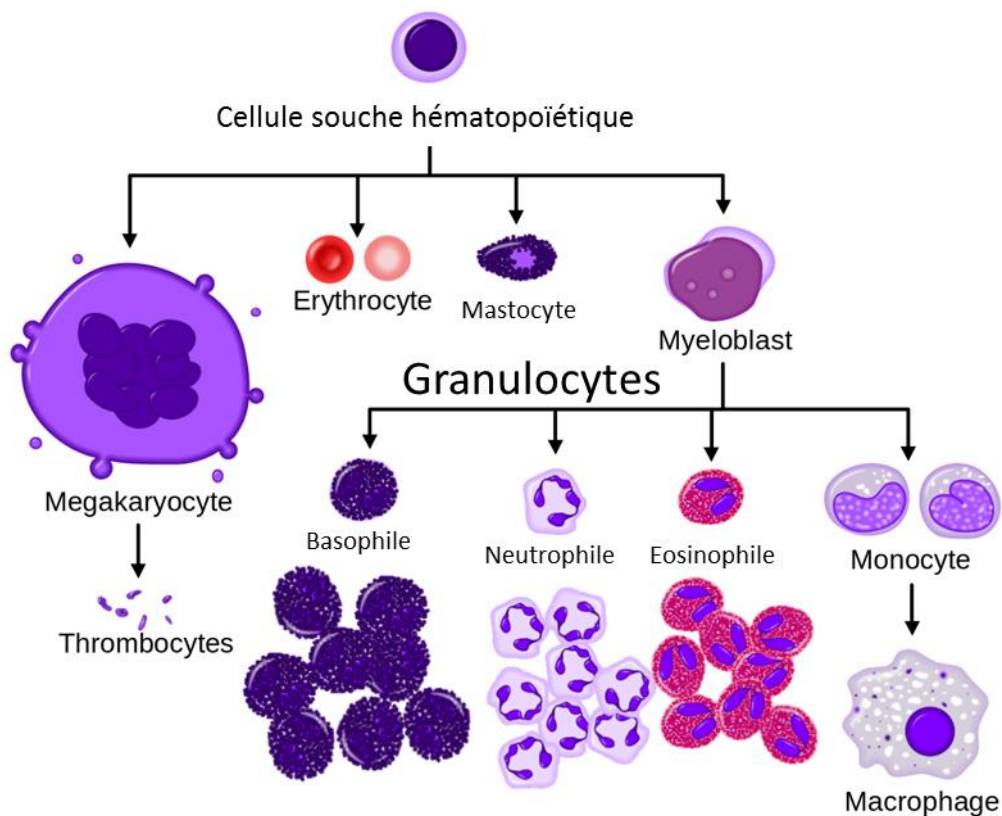


Figure 12 : Les cellules de la lignée myéloïde qui sont atteintes de la LMC

Le précurseur myéloïde peut se différencier en plusieurs types de cellules sanguines. Dans la LMC, les granulocytes (basophiles, neutrophiles et éosinophiles) présentent une production élevée et sont en surnombre dans le sang.

Cette maladie rare d'incidence faible (1-2 cas pour 100 000 adultes) compte pour environ 15% des leucémies de l'adulte nouvellement diagnostiquées.¹²⁷ La moitié des patients diagnostiqués ne présentent aucun symptôme et la maladie est généralement remarquée après un examen

médical de routine. La LMC peut être classée en trois phases, la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique. La majorité (90-95%) des patients présentent une LMC en phase chronique qui peut durer plusieurs années. Si cette maladie n'est pas traitée, l'accumulation de mutations génétiques dans les cellules de LMC fait progresser le syndrome vers les phases accélérée puis blastique.¹²⁸ Cette caractéristique fait aussi de la LMC une maladie modèle car elle illustre le développement d'un cancer en plusieurs étapes. Par exemple, tout comme la LMC, le développement du cancer du côlon passe par plusieurs étapes : un polype du colon (phase chronique) devient dégénéré (phase d'accélération) et pour finir en adénocarcinome (phase blastique).¹²⁹ L'étude de la transition entre ces différentes phases sur le modèle de la LMC pourrait aider à mieux comprendre cette transition dans d'autres types de transformations malignes.

Les gènes impliqués dans la transition de la phase chronique vers les phases accélérée et blastique sont majoritairement inconnus. Néanmoins, une inactivation rare des suppresseurs de tumeurs p53¹³⁰ ou Rb¹³¹ a été observée dans des cellules en phase blastique. Cette dernière phase, appelée également phase de crise blastique, ressemble plus à une leucémie aiguë et entraîne le décès en 3 à 6 mois.¹³² Le traitement de cette pathologie par thérapie ciblée est directement issu des avancées technologiques et des découvertes concernant le fonctionnement moléculaire de cette leucémie.

1) La biologie moléculaire de la LMC

La découverte du chromosome de Philadelphie (Ph) en 1960¹³³ par Peter Nowell et David Hungerford a révolutionné le domaine de l'oncologie. En effet, c'était la première fois qu'on observait une corrélation étroite entre une anomalie chromosomique et la formation d'un cancer. Il a fallu attendre treize ans avant de comprendre que cette aberration chromosomique résultait d'une translocation réciproque t(9;22)¹³⁴, puis dix années supplémentaires avant de caractériser la fusion de l'oncogène *ABL1* (Ablason), normalement sur le chromosome 9, avec le gène *BCR* (breakpoint cluster region) sur le chromosome 22.^{135,136} L'activité tyrosine kinase dérégulée de la protéine ABL1 a ensuite été définie en tant que facteur causant la prolifération anormale de la LMC.¹³⁷ A la fin du millénaire, le développement d'un inhibiteur spécifique de cette protéine de fusion a été démontré efficace pour le traitement de cette pathologie⁶⁸.

a) La translocation *BCR-ABL1*

i) La fonction physiologique des partenaires de la translocation

De manière physiologique, le gène *BCR* se situe sur le chromosome 22 et le gène *ABL1* est sur le chromosome 9. Les deux protéines BCR et ABL1 sont exprimées de manière ubiquitaire et ont des fonctions distinctes.¹³⁸

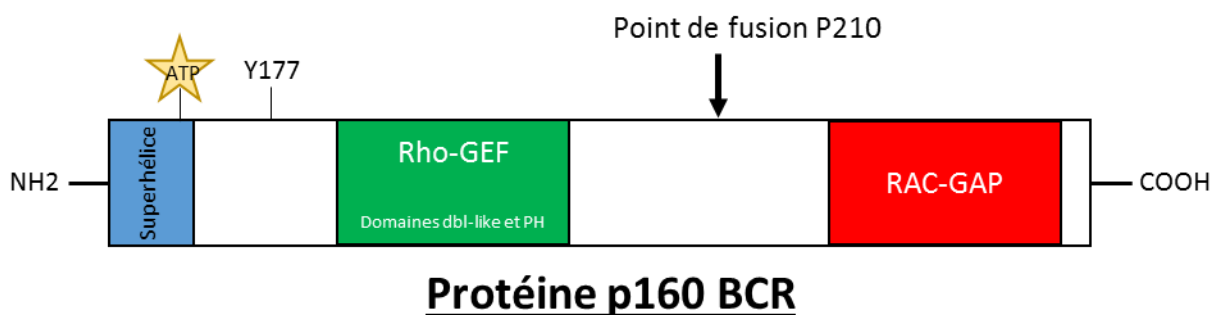


Figure 13 : La protéine BCR

En N-terminal, un domaine en superhélice qui permet sa dimérisation. Ce domaine contient également une sérine-thréonine kinase. Une fois phosphorylée, la tyrosine Y155 permet la liaison à GRB2. Les domaines *dbl*-like et PH codent une Rho-GEF. Le domaine C-terminal code une RAC-GAP.

D'une part, le gène *BCR* code une protéine de 160 kDa qui possède plusieurs activités différentes (**Figure 13**). Le premier exon code une sérine-thréonine kinase qui phosphoryle BAP1¹³⁹ et possiblement BCR¹³⁶ lui-même après une homodimérisation permise grâce à son domaine en superhélice en N-terminal¹⁴⁰. Le milieu du gène contient des régions qui codent des domaines *dbl*-like et PH (pleckstrin-homology) qui activent la transcription de NF- κ B par activité RHO-GEF (GTP exchange factor)¹⁴¹. Le domaine C-terminal a une activité GTPase pour RAC, une petite GTPase de la superfamille de Ras qui régule la polymérisation de l'actine et l'activité de NAPDH oxydase dans des cellules phagocytaires.^{142,143} De plus, après phosphorylation sur la tyrosine 177 (Y177), BCR peut interagir dans l'activation de la voie RAS en liant la protéine régulatrice GRB2¹⁴⁴. Ensemble, ces données confèrent un rôle important de BCR dans la cellule normale, mais sa réelle fonction physiologique reste à déterminer. En effet, des souris *BCR* knock-out sont viables et ne présentent aucun phénotype visible, sauf une augmentation oxydative dans les neutrophiles¹⁴⁵.

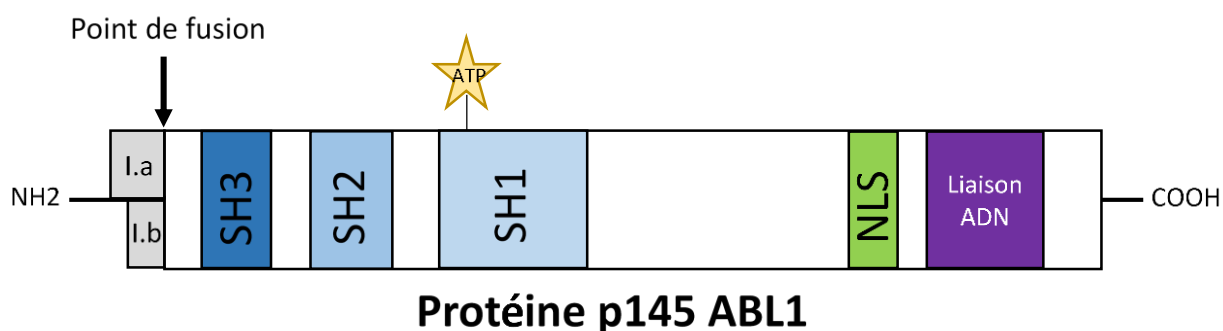


Figure 14 : La protéine ABL1

Les exons I.a et I.b sont systématiquement épissés sur l'ARNm de ABL1. Les domaines d'homologie à SRC, SH2 et SH3 permettent la liaison aux autres protéines. SH3 inactive ABL1 en la maintenant en conformation fermée et inactive. Le domaine SH1 possède une activité de tyrosine kinase. NLS = signal de localisation au noyau. En C-terminal, un domaine de liaison à l'ADN.

D'autre part, le gène *ABL1* code une protéine de 145 kDa à activité tyrosine kinase non-récepteur (**Figure 14**).¹³⁵ Ce gène est un homologue de l'oncogène *v-abl* porté par le virus « Abelson murine leukemia » (A-MuLV)¹⁴⁶, qui peut infecter des souris et causer des leucémies chez ces animaux. Plusieurs domaines structuraux peuvent être définis sur cette protéine. Trois domaines d'homologie à SRC (SH1, SH2 et SH3) sont localisés en N-terminal. Le domaine SH1 possède l'activité tyrosine kinase, alors que les domaines SH2 et SH3 permettent la liaison à d'autres protéines.¹⁴⁷ Le domaine SH3 permet de réguler l'activité d'ABL1 en la maintenant dans une conformation fermée et inactive.¹⁴⁸ Les signaux de localisation au noyau et les motifs de liaison à l'ADN et à l'actine se

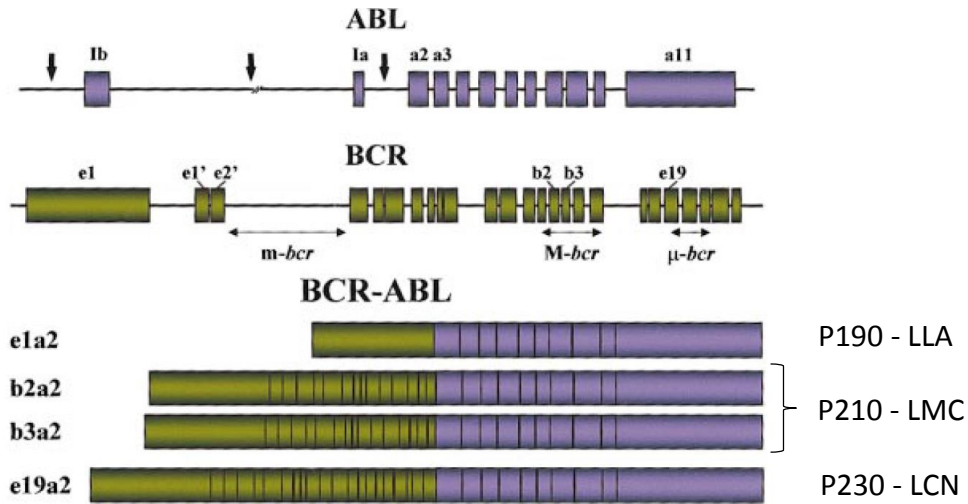
situent en C-terminal.¹⁴⁷ Plusieurs fonctions ont été attribuées à ce gène, telles qu'une régulation du cycle cellulaire¹⁴⁹, un contrôle des stress génotoxiques¹⁵⁰ et une transmission des informations du microenvironnement de la cellule¹⁵¹.

Pour résumer, séparément *BCR* et *ABL1* codent des protéines d'activités diverses impliquées dans différents mécanismes cellulaires. De manière physiologique, la protéine ABL1 navigue constamment entre le cytoplasme et le noyau de la cellule pour interagir avec l'ADN¹⁵² alors que BCR agit exclusivement dans le cytoplasme.¹⁵³

ii) *L'anatomie moléculaire de la fusion BCR-ABL1*

Les points de cassures dans le gène *ABL1* sur le locus chromosomique 9q34 peuvent survenir de manière aléatoire sur une grande région d'au moins 300 kb en extrémité 5' du gène, soit en amont de l'exon I.b, en aval de l'exon I.a, ou de manière plus fréquente, entre les deux (**Figure 15**).¹⁵⁴ Indépendamment du lieu exact de la cassure, la translocation génétique résulte dans la fusion du gène *BCR* avec l'exon 2 du gène *ABL1* (nommé a2). Les cassures dans le gène *BCR* peuvent être localisées dans un des trois clusters de cassures, ou « breakpoint cluster region – *BCR* » en anglais. Pour la majorité des patients atteints de LMC, la cassure dans *BCR* a lieu dans le cluster de cassure majeur, nommé *M-bcr*, entre les exons 12-16, originellement appelés b1-b5. L'épissage de l'ARNm provoque deux transcrits différents, b2a2 (ou e13a2) et b3a2 (ou e14a2), qui codent la protéine de fusion BCR-ABL1 de 210 kDa (P210^{BCR-ABL1}).¹⁵⁵

Dans la leucémie lymphoblastique aiguë, la cassure peut avoir lieu en amont de *M-bcr*, dans la région de cassure mineure *m-bcr*, et pour certaines formes rares de leucémie chronique à neutrophile, la cassure peut avoir lieu en aval, dans la région de cassure μ -*bcr*. Les protéines de fusion résultantes sont de tailles différentes, plus petite pour la fusion résultant de la cassure dans *m-bcr* (protéine de 190kDa, P190^{BCR-ABL1}) et plus grande pour la cassure μ -*bcr* (protéine de 230kD, P230^{BCR-ABL1}).¹⁵⁶



Issue de « The molecular biology of chronic myeloid leukemia » Deininger, Goldman and Melo, Blood, 2000.

Figure 15 : Localisation de points de cassures dans les gènes *BCR* et *ABL1* et structure des gènes de fusions résultants

La forme e1a2 de *BCR-ABL1* code une protéine de 190 kDa qui est majoritaire dans certains types de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). Les formes b2a2 et b3a2 résultant d'un épissage alternatif codent une protéine de 210 kDa qui cause la leucémie myéloïde chronique (LMC). Le dernier type de fusion, e19a2

La protéine de fusion P210^{BCR-ABL1} dans la LMC (**Figure 16**) contient la partie N-terminale de BCR comprenant son domaine d'homodimérisation en superhélice, ses domaines de liaison à GRB2 et son activité RHO-GEF. La majorité du gène *ABL1* est fusionnée à cette partie N-terminale de *BCR*, codant la protéine ABL1 complète sauf l'exon 1.a ou 1.b, qui sont systématiquement épissés.

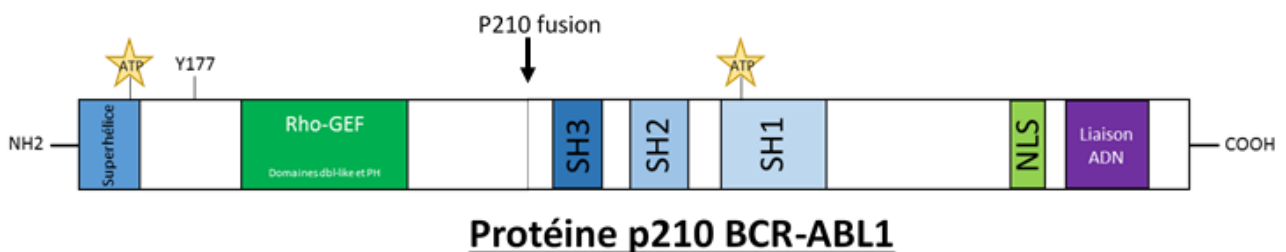
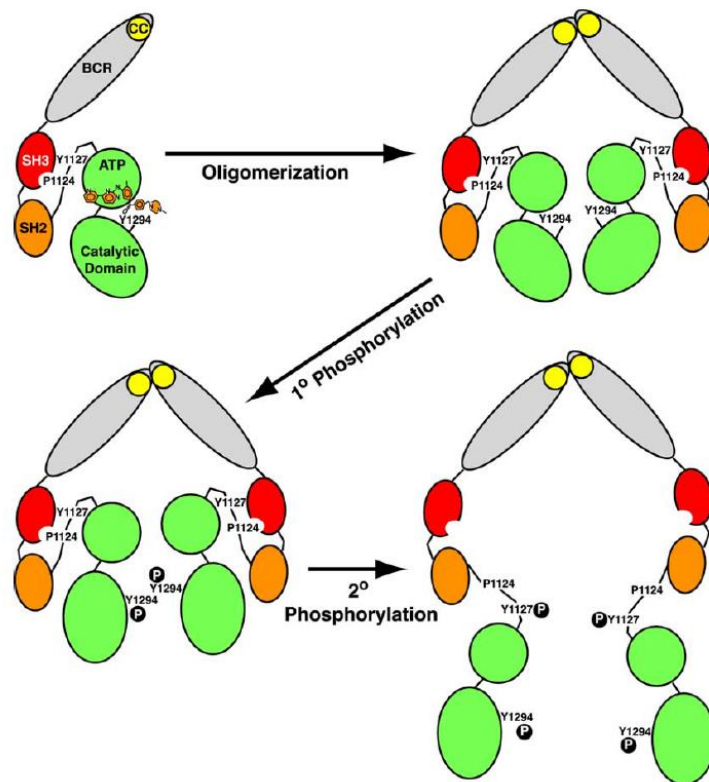


Figure 16 : La protéine de fusion P210 BCR-ABL1

La protéine de fusion contient le domaine N-terminal de BCR, fusionné à la quasi-totalité d'ABL1. En N-terminal, un domaine en superhélice qui permet sa dimérisation. Ce domaine contient également une sérine-thréonine kinase. Une fois phosphorylée, la tyrosine Y155 permet la liaison à GRB2. Les domaines *db1*-like et PH codent une Rho-GEF. Les domaines d'homologie à SRC, SH2 et SH3 permettent la liaison aux autres protéines. SH3 inactive ABL1 en la maintenant en conformation fermée et inactive. Le domaine SH1 possède une activité de tyrosine kinase. NLS = signal de localisation au noyau. Le domaine C-terminal possède un domaine de liaison à l'ADN.

L'activité tyrosine kinase d'ABL1 n'est pas seulement maintenue dans la protéine de fusion BCR-ABL1, elle est exacerbée. Cette augmentation de l'activité de la kinase est la conséquence de la dimérisation de la protéine de fusion due aux domaines d'homodimérisation en superhélice de BCR (**Figure 17**).¹⁴⁸ La dimérisation induit une première autophosphorylation dans son domaine catalytique sur la tyrosine 1294 (Y1294), suivie par une seconde phosphorylation sur Y1127, qui induit un changement de conformation de la protéine de fusion, activant ainsi la kinase de la protéine ABL1.¹⁴⁸ De plus, la protéine de fusion BCR-ABL1 reste majoritairement dans le cytoplasme de la cellule, lieu d'activation et de phosphorylation de multiples cibles dans des voies de prolifération et de survie cellulaire.^{153,157}



Issue de « *Mechansims of transformation by BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era* »
 Van Etten, *Leukemia Research*, 2004

Figure 17 : Un modèle de la régulation de l'activité de BCR-ABL1

Les séquences BCR, SH3, SH2 et domaine catalytique d'ABL1 (SH1) sont schématisés. En monomère, la protéine BCR-ABL1 est inactive. Cette forme se lie aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans le site de liaison à l'ATP. Les domaines en superhélice (CC pour « Coiled-coil » en anglais) permettent l'oligomérisation de la protéine en dimère, induisant une première phosphorylation sur la tyrosine Y1294 et un changement de configuration protéique. Ce changement permet une deuxième phosphorylation sur la tyrosine Y1127, rendant le dimère actif.

b) Les mécanismes de transformation maligne

Depuis sa découverte, la protéine de fusion BCR-ABL1 a été étudiée de manière intensive afin de découvrir ses mécanismes d'action sur la transformation cellulaire. Certains domaines de la protéine de fusion ont été identifiés par analyse mutationnelle comme essentiels pour la transformation maligne de cellules hématopoïétiques. Dans la partie ABL1, les domaines SH1 (domaine catalytique de tyrosine kinase), SH2 et domaines de liaison à l'actine (parmi d'autres protéines) sont essentiels pour cette fonction.¹⁵⁶ Pour la partie BCR, le domaine de dimérisation en superhélice (qui permet la dimérisation puis l'activation de BCR-ABL1)¹⁴⁰ et la tyrosine 177 (qui permet la liaison à GRB2)¹⁵⁸ sont essentiels pour cette fonction de transformation, qui passe principalement par l'activation de voies de prolifération (Ras/MAPK, PI3K/AKT, JAK2/STAT5) et par l'inhibition de l'apoptose (**Figure 18**).

i) Activation de la voie Ras/MAPK

L'activation de la voie Ras/MAPK par BCR-ABL1 se fait par le biais de plusieurs types d'interactions. L'autophosphorylation de la tyrosine 177 permet la liaison à la protéine adaptatrice GRB2 qui, par son interaction avec les protéines SOS et GAB2, stabilise Ras dans sa forme active, liée à la GTP.¹⁵⁸ Également, SHC et CRKL, deux activateurs de la voie Ras, sont des substrats de BCR-ABL1 en se liant aux domaines SH2 (SHC) et SH3 (CRKL).^{159,160} Une fois activée, Ras induit le recrutement de la sérine-thréonine kinase Raf à la membrane plasmique¹⁶¹, initiant ainsi la cascade d'activation de MEK1/2 et ERK1/2, se terminant par la transcription de gènes de prolifération et de survie¹⁶². La voie Ras possède un rôle important dans l'activation de la prolifération de cellules Ph positives (Ph+) car, à l'inverse des cancers plus classiques, peu de mutations dans cette voie ont été découvertes. Ceci suppose que l'activation constitutive de Ras par BCR-ABL1 est suffisante pour la prolifération de ces cellules.¹⁶³

ii) Activation de la voie PI3K

L'activation de la voie PI3K est également primordiale pour la prolifération anarchique de cellules BCR-ABL1 positives. Des complexes multimériques entre BCR-ABL1, PI3K, CBL et les molécules adaptatrices CRK et CRKL sont formés, activant ainsi PI3K.¹⁶⁴ L'activation de cette kinase induit une phosphorylation de la sérine thréonine kinase AKT, qui possède plusieurs fonctions. Premièrement, cette kinase augmente le taux de survie cellulaire en inhibant l'activité des facteurs de transcription FOXO, une famille de régulateurs de la transcription de gènes pro-apoptotiques et suppresseurs de tumeurs.¹⁶⁵ Ensuite, elle peut activer la prolifération en induisant la dégradation par ubiquitinylation du suppresseur de tumeur p27, en augmentant l'expression de l'E3 ubiquitine

ligase SKP2.¹⁶⁶ Finalement, AKT active le complexe mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin »), augmentant ainsi la prolifération cellulaire et la production de protéines.^{167,168}

iii) Activation de la voie JAK/STAT

Une suractivation de la voie de signalisation JAK/STAT a été démontrée dans plusieurs leucémies BCR-ABL1-positives¹⁶⁹ et l'hyperactivation de STAT5 contribue à la transformation maligne des cellules de LMC.¹⁷⁰ Même si STAT5 régule plusieurs fonctions au sein de la cellule hématopoïétique telles que la prolifération, l'apoptose et la différenciation,¹⁷¹ son rôle anti-apoptotique en induisant l'expression de BCL2-x_L est primordial dans le développement de la LMC¹⁷². Également, de manière importante, STAT5 induit l'expression de la cycline D1 (codé par le gène *CCND1*), qui s'associe à CDK4 pour permettre la transition dans la phase G1 du cycle cellulaire en inhibant pRb.¹⁷³ Cette activation passe par BCR-ABL1, qui peut soit activer STAT5 en le phosphorylant directement¹⁷⁰, soit phosphoryler la kinase JAK2¹⁷⁴ qui à son tour phosphoryle STAT5.

iv) Inhibition de l'apoptose

L'inhibition de l'apoptose dans la LMC résulte indirectement de l'activité de BCR-ABL1 dans ces cellules LMC. En effet, la protéine de fusion est capable d'augmenter la transcription du facteur anti-apoptotique BCL-2 de manière dépendante de PI3K ou de Ras.^{175,176} De plus, l'expression de BCL-x_L est élevée grâce à l'activation de sa transcription par STAT5.¹⁷³ Finalement, RAF et PI3K peuvent aussi inactiver la protéine pro-apoptotique BAD par phosphorylation.¹⁷⁷ Il est clair que BCR-ABL1 permet le maintien de la survie cellulaire non seulement en augmentant la prolifération cellulaire mais aussi en inhibant l'apoptose, par le biais de la régulation de l'expression de plusieurs facteurs apoptotiques.

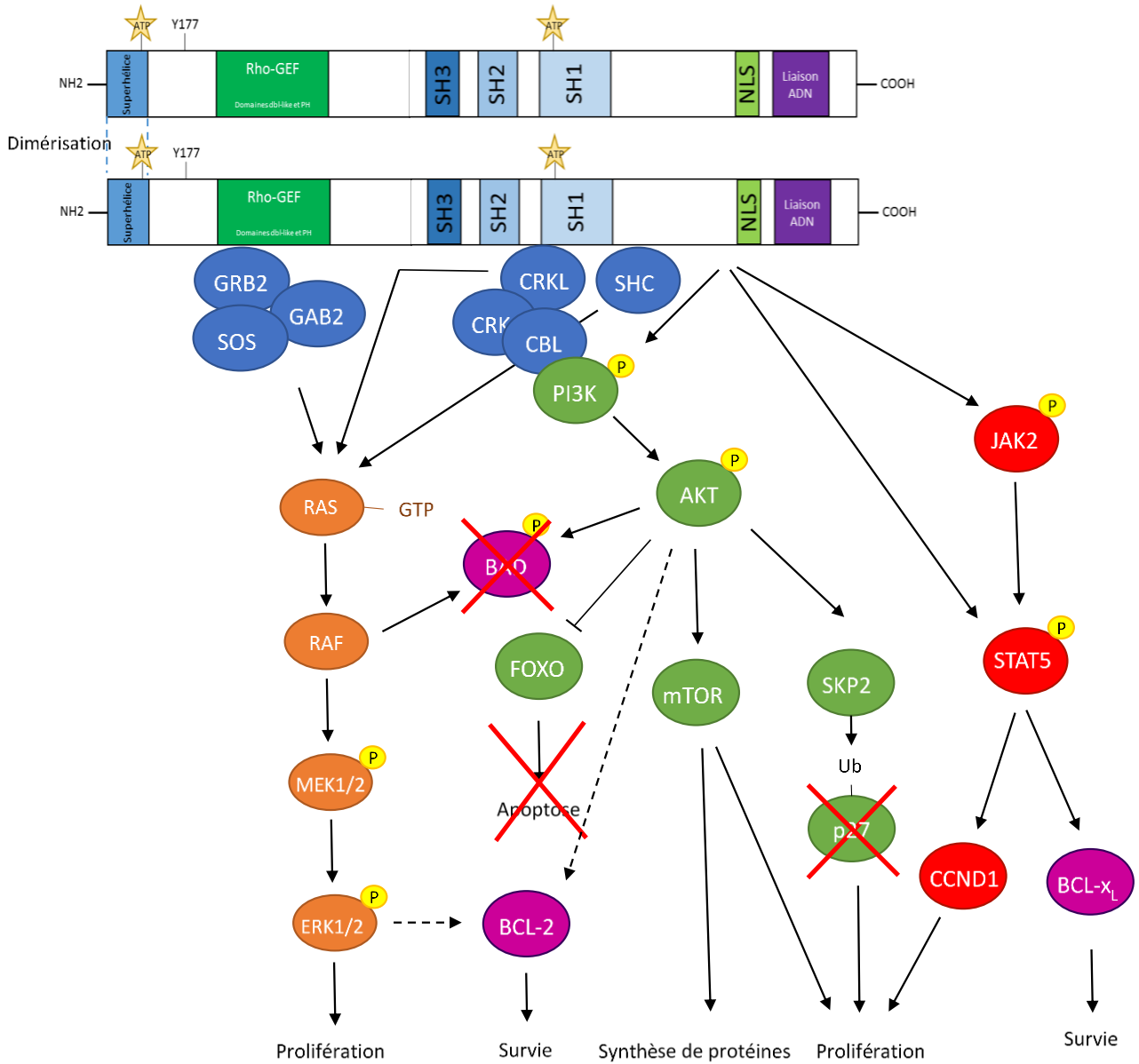


Figure 18 : Les mécanismes moléculaires responsables de la transformation maligne par BCR-ABL1

La protéine de fusion BCR-ABL1 forme un dimère grâce aux domaines en superhélice. Après l'activation de cette dernière (Figure 16), BCR-ABL1 active principalement trois voies de signalisation (RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT et JAK2/STAT5) et inhibe l'apoptose en induisant l'expression de BCL- x_L et BCL-2, et en inactivant BAD. Ensemble, BCR-ABL1 permet une augmentation de la prolifération cellulaire, tout en inhibant l'apoptose.

2) Le traitement de la LMC

Le traitement de la LMC a évolué dans le temps en parallèle des découvertes scientifiques qui ont aidé à comprendre les mécanismes de la pathologie. La première thérapie ciblée efficace contre le cancer (nommée imatinib) a été administrée aux patients atteints de LMC et a complètement révolutionné le domaine de la thérapeutique en oncologie. L'historique du traitement de la LMC peut être divisé en deux périodes qui sont séparées par la découverte de l'inhibiteur de BCR-ABL1, l'imatinib.

a) L'ère pré-imatinib

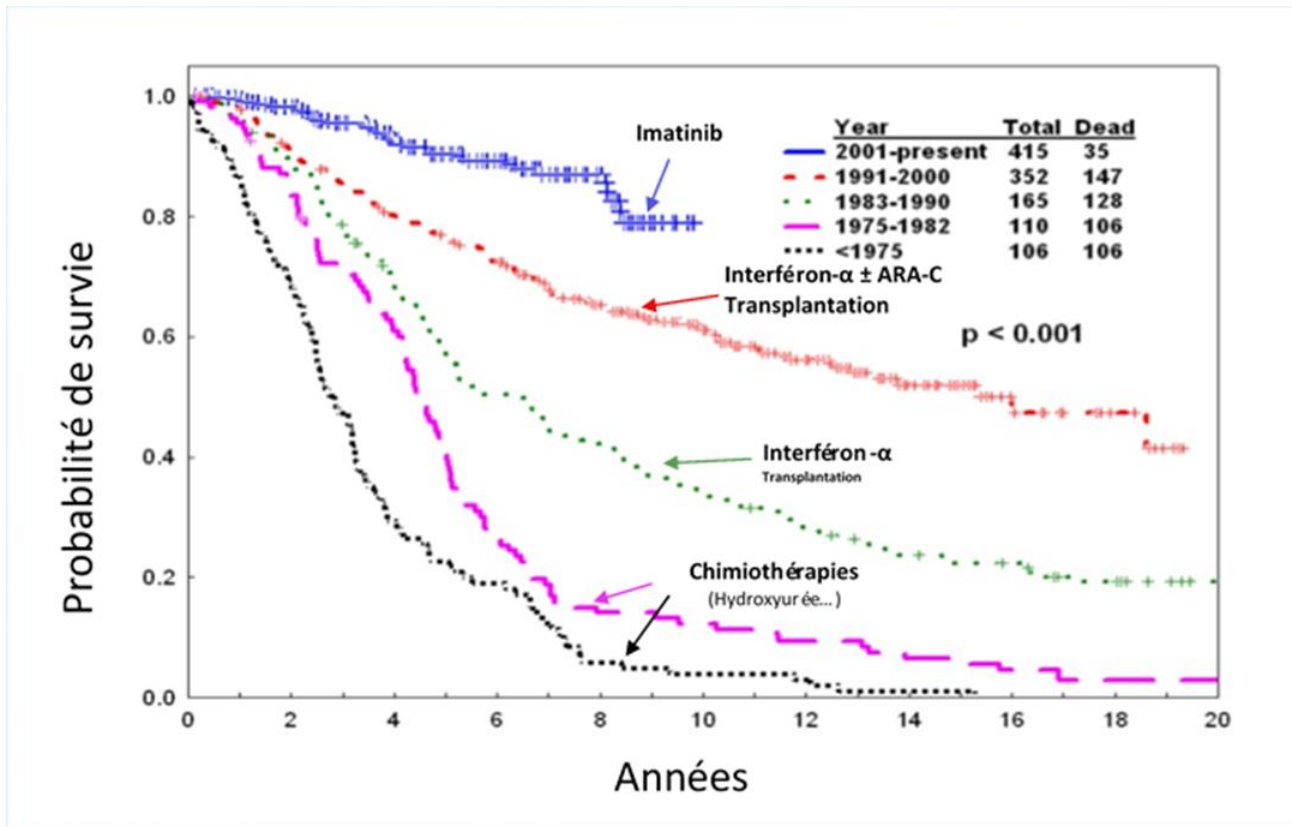
La première thérapie documentée de la LMC date de 1865, lorsqu'un médecin allemand nommé Lissauer observa une amélioration nette chez un patient mourant lorsqu'il lui administra une solution d'arsenic dilué à 1%. Trente ans plus tard, les rayonnements ionisants ont été fréquemment utilisés pour traiter la LMC et d'autres leucémies et lymphomes grâce à la découverte des rayonnements X par Röntgen. À l'époque, le traitement ne rallongeait pas la durée de vie du patient, mais uniquement la qualité de vie. Il fallut attendre la fin de la Seconde Guerre Mondiale et l'invention de la chimiothérapie pour voir une légère amélioration dans la durée de vie des patients atteints de LMC. L'utilisation en premier lieu de gaz moutarde en 1946, de busulfan en 1953 puis d'hydroxyurée en 1969, améliora le traitement pour les patients résistant à la radiothérapie. Le traitement par chimiothérapie avec de l'hydroxyurée est progressivement devenu la thérapie de première ligne pour les patients atteints de LMC.¹⁷⁸ Même si l'utilisation de tels agents chimiothérapeutiques était relativement efficace pour réduire les symptômes de la LMC, aucun traitement ne diminuait la proportion de cellules Ph⁺ dans la moelle osseuse des patients. Dans certains cas, l'utilisation de ces agents alkylants mutagènes accélérail l'apparition de la transformation blastique, qui entraînait le décès du patient.

Des avancées majeures ont eu lieu à la fin des années 1970 lorsque la disparition complète de cellules Ph⁺ a été observée chez quatre patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches de la moelle osseuse de leur jumeau sain.¹⁷⁹ C'était la première « guérison » de la pathologie, mais ce type de traitement n'était bien évidemment pas accessible à chaque patient. Il fut très encourageant d'apprendre en 1983 l'efficacité augmentée du traitement par interféron- α , qui arrivait à diminuer significativement le nombre de cellules Ph⁺ chez un patient atteint de la LMC.¹⁸⁰ Ce traitement

devint le traitement de référence pour la LMC, seul ou en combinaison avec la cytarabine (ARA-C), un agent chimiothérapeutique classique, jusqu'à la découverte et l'utilisation de l'imatinib.¹⁸¹

b) La découverte de l'imatinib

Le développement de l'imatinib en tant qu'agent thérapeutique efficace dans le traitement de la LMC illustre comment la recherche et les découvertes scientifiques peuvent révolutionner la prise en charge de certaines maladies. Initialement, l'efficacité des inhibiteurs de kinase, comme l'imatinib, était fortement mise en doute ; un inhibiteur de kinase a forcément plusieurs dizaines voire centaines de cibles dans la cellule, ce qui produira trop de toxicité en clinique. D'autres considéraient l'inhibition d'une seule enzyme inefficace dans une maladie hétérogène et complexe telle que le cancer. Néanmoins, au début des années 1990, des travaux pour trouver des inhibiteurs spécifiques de BCR-ABL1 dans la lignée cellulaire de LMC K562 ont été initiés.^{182,183} En parallèle, des scientifiques de la société Ciba-Geigy (devenue Novartis) à Bâle ont généré une molécule capable d'inhiber de manière sélective toute forme de ABL1, PDGFR A et B et c-KIT. Cette molécule, nommée CGP-57148B (devenue imatinib, Glivec, Gleevec) pouvait éliminer des cellules Ph⁺ sans endommager les cellules Ph⁻ *in vitro* et *in vivo*.^{184,185} Son utilisation en essai clinique de phase I en 1998 a montré les bénéfices impressionnants du médicament. Les taux de survie de patients atteints d'une LMC ont fortement augmenté entre 1975 et 2001. En effet, depuis l'administration de l'inhibiteur de tyrosine kinase, 80% des patients survivent au moins 10 ans, une amélioration nette depuis 1975 où moins de 10% des patients survivaient une décennie après leur diagnostic (**Figure 19**).¹⁸⁶ L'activité de l'imatinib résulte de dizaines d'années de recherche pour mieux comprendre la biologie moléculaire de la LMC et plusieurs années de développement pour spécifiquement cibler l'oncogène majeur : BCR-ABL1.



Adapté de « Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience » Kantarjian et al, Blood, 2012.

Figure 19 : Survie des patients LMC nouvellement diagnostiqués

Entre 1975 et 2001, le taux de survie à 10 ans a nettement augmenté grâce aux nouveaux agents thérapeutiques. L’interféron-α (vert) et les débuts des transplantations de moelle osseuse montrent une amélioration significative dans la survie des patients comparée à la chimiothérapie (noir et violet). Avec l’utilisation d’ARA-C en combinaison avec l’IFN-α et une meilleure technique de greffe (rouge), la survie des patients a encore augmenté entre 1991-2000. Finalement, environ 80% des patients survivent après 10 ans de traitement par imatinib (bleu).

c) Le mécanisme d’action de l’imatinib

L’imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase qui se fixe au site de liaison à l’ATP de BCR-ABL1.¹⁸⁷ En effet, la molécule thérapeutique résulte d’un criblage d’agents pharmaceutiques qui ressemblent à l’ATP (**Figure 20**), et l’imatinib permet une inhibition de BCR-ABL1 en créant des liaisons hydrogènes et de type Van der Waals avec les acides aminés dans le site de liaison à l’ATP d’ABL1. L’imatinib agit en bloquant la première autophosphorylation activatrice de la protéine de fusion en rentrant en compétition avec les molécules d’ATP (**Figure 17**). Le BCR-ABL1 reste désormais dans la conformation inactive et ne peut pas phosphoryler ses substrats.¹⁴⁸

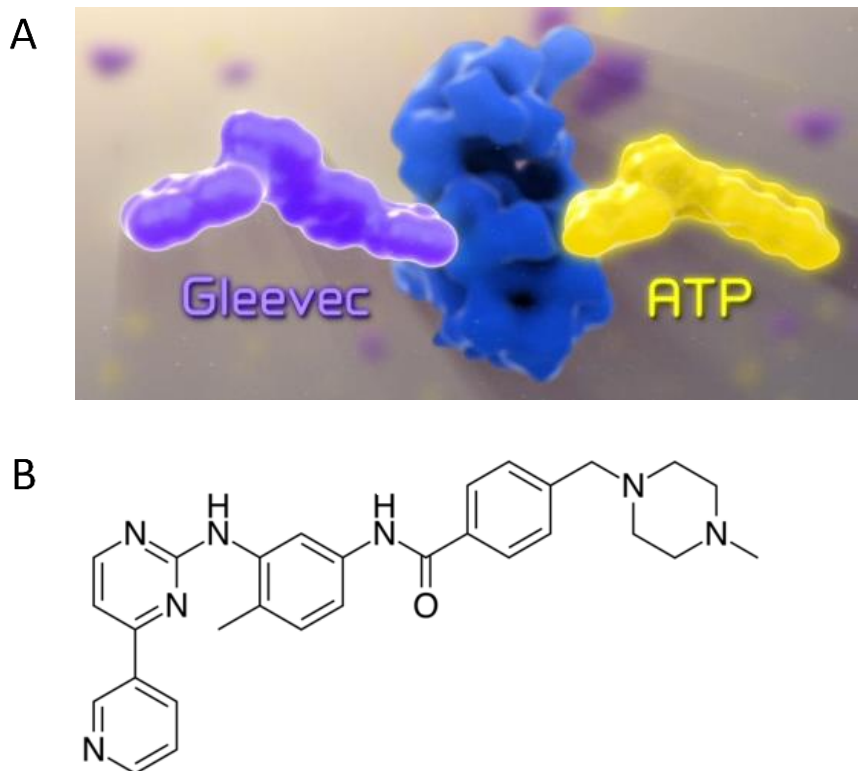


Figure 20 : Le Glivec ou Gleevec en anglais (imatinib) est un inhibiteur compétitif de l'ATP

(A) (Adapté de : <https://www.hhmi.org/biointeractive>) Image schématisant la structure similaire entre le Gleevec (imatinib) et l'ATP. (B) (Adapté de : <https://en.wikipedia.org>) Formule topologique de l'imatinib.

Lorsque le BCR-ABL1 est bloqué par un inhibiteur de tyrosine kinase, les cellules BCR-ABL1-positives entrent en apoptose grâce à un phénomène nommé « addiction oncogénique ».¹⁸⁸ Ce mécanisme provient du fait que dans certaines cellules cancéreuses, un oncogène code une protéine qui peut avoir de multiples rôles dans le réseau complexe de signalisation intracellulaire. L'oncogène *BCR-ABL1*, par exemple, code la protéine de fusion qui active plusieurs voies de prolifération tout en inhibant l'apoptose (**Figure 18**). Ainsi, le circuit intracellulaire physiologique de signalisation est très différent de celui d'une cellule normale et la conséquence de l'inactivation de l'oncogène est importante. En effet, lorsque BCR-ABL1 est inhibé par l'imatinib, la disparition des signaux d'activation de la prolifération et de l'inhibition de l'apoptose causent un « choc oncogénique ».¹⁸⁹ En conséquence, la balance entre les signaux de survie et les signaux de mort s'inverse et les cellules entrent en apoptose.

d) La période post-imatinib et la génération de nouveaux agents thérapeutiques

La résistance à l'imatinib (voir dessous) et la persistance de transcrits *BCR-ABL1* dans le sang et la moelle osseuse de patients sous traitement ont encouragé le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde et de troisième génération. Parmi les dizaines de molécules qui ont été synthétisées et testées en études précliniques, uniquement quatre ont obtenu une autorisation de mise sur le marché (**Tableau 1**).¹⁹⁰

Le dasatinib, une molécule originellement produite en tant que traitement immunosuppresseur en inhibant les kinases de la famille SRC, possède environ 300 fois plus d'affinité pour le BCR-ABL1 que l'imatinib et permet une inhibition plus puissante de cette protéine de fusion.¹⁹¹ En conséquence, cet agent thérapeutique cible également plus de kinases et de ce fait, pourrait être pour certains patients moins bien toléré que l'imatinib. En revanche, des études cliniques ont montré que les profils d'innocuités des deux molécules sont similaires.¹⁹² Le nilotinib, quant à lui, possède une structure dérivée de celle de l'imatinib et a été rationnellement conçu à partir de structures cristallographiques de la liaison imatinib-ABL1 pour augmenter l'affinité et la spécificité du médicament.¹⁹³ Cet agent possède une affinité 20 à 30 fois supérieure à BCR-ABL1 que l'imatinib et peut se fixer sur des formes de la protéine de fusion légèrement modifiées par mutation génétique.¹⁹⁴ Le bosutinib, tout comme le dasatinib, est un inhibiteur puissant des kinases SRC et ABL1.¹⁹⁵ *In vitro*, cette molécule a une affinité 10 fois plus élevée pour le BCR-ABL1 que l'imatinib.¹⁹⁶ Tous les inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération induisent une réponse plus rapide et plus profonde que l'imatinib, mais présentent généralement plus d'effets secondaires comparés à l'inhibiteur de première génération.^{192,197,198}

Le ponatinib, seul inhibiteur de tyrosine kinase de troisième génération, a spécifiquement été conçu pour combattre toutes formes de résistance au traitement, y compris celle causée par la mutation T315I.¹⁹⁹ Tout comme le dasatinib et le bosutinib, le ponatinib cible les kinases de la famille SRC, mais aussi un grand nombre de tyrosine kinases. Du fait de cette spécificité diminuée pour le BCR-ABL1, le ponatinib n'est pas utilisé en tant que traitement de première ligne car plusieurs effets secondaires surviennent à la suite de ce traitement (thrombocytopénie, hypertension, pancréatite, thrombose artérielle et veineuse et même des arrêts cardiaques).¹⁹⁰

Tableau 1 : Liste des inhibiteurs de tyrosine kinase avec une autorisation de mise sur le marché

Nom de molécule	Génération	Informations traitement
Imatinib	1 ^{ere} génération	Première et seconde* ligne
Dasatinib	2 ^{nde} génération	Première et seconde ligne
Nilotinib	2 ^{nde} génération	Première et seconde ligne
Bosutinib	2 ^{nde} génération	Troisième ligne
Ponatinib	3 ^{eme} génération	Seconde ligne si T315I+

L'imatinib, le dasatinib et le nilotinib peuvent tous être utilisés en première ligne pour des patients atteints de LMC. Le bosutinib est uniquement utilisé si les traitements précédents ne sont pas efficaces. Le ponatinib, seul médicament de troisième génération, est uniquement utilisé si le patient possède la mutation T315I dans le domaine tyrosine kinase d'ABL1.

* L'imatinib est rarement utilisé en seconde ligne de traitement étant donné que cet agent thérapeutique

Plus récemment, plusieurs régions allostériques de la protéine BCR-ABL1 ont été identifiées comme sites de ciblage potentiel par des agents thérapeutiques. Un site en particulier, localisé sur le domaine C-terminal de ABL1, peut être ciblé par des molécules qui maintiennent la protéine en conformation fermée. En effet, la protéine ABL1 sauvage peut être maintenue dans cette conformation inactive grâce à une myristoylation dans la partie N-terminale de la protéine. La liaison du myristate à un site hydrophobe en C-terminal d'ABL1 inactive la protéine. Malheureusement, cette régulation par myristoylation en N-terminal de ABL1 est perdue sur la protéine de fusion BCR-ABL1, mais l'utilisation de molécules mimant le myristate peuvent produire le même effet et inactiver la kinase.²⁰⁰ La génération de l'inhibiteur allostérique mimant le myristate, nommé ABL001, a permis la mise en place d'essais cliniques utilisant cette nouvelle molécule en monothérapie ou en combinaison avec des inhibiteurs de tyrosine kinase. L'utilisation de ce type de traitement est efficace pour combattre des formes de résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase.⁹³

3) La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Même avant l'autorisation de mise sur le marché de l'imatinib, notre équipe de recherche étudiait déjà les mécanismes potentiels de résistance multiples et variés aux inhibiteurs de tyrosine kinase *in vitro*.²⁰¹ Nous avons démontré l'importance de l'amplification de *BCR-ABL1* lui-même, mais aussi du gène *MDR1* qui pouvait être surexprimé dans des lignées cellulaires résistantes.^{201,202} Plus tard, nous avons également démontré l'importance de multiples autres facteurs sur la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase, comme le rôle primordial de la protéine pro-apoptotique BIM dans l'induction de l'apoptose intrinsèque suite au traitement^{203,204}, la surexpression de la Src kinase Lyn qui active les voies prolifératives en contournant l'inhibition de *BCR-ABL1*²⁰⁵⁻²⁰⁷, ou même l'implication de la protéine chaperonne HSP70 (heat shock protein 70)²⁰⁸.

Parallèlement aux Etats-Unis, l'équipe de C. Sawyers a démontré que *BCR-ABL1* pouvait échapper à son inhibition pour certains patients atteints de LMC.²⁰⁹ L'analyse d'un petit nombre de patients en LMC en phase blastique ayant rechuté après une réponse initiale au traitement par imatinib, a montré que la protéine de fusion *BCR-ABL1* redevenait active, même sous traitement par son inhibiteur. Le domaine kinase de *ABL1* a été séquencé chez ces patients et de manière surprenante, six patients sur neuf portaient une mutation génétique qui causait la substitution de la thréonine en isoleucine, en position 315 (T315I).²⁰⁹ C'était le premier exemple de résistance dépendante de *BCR-ABL1*, où des anomalies génétiques au sein de l'oncogène causent la résistance. A l'inverse, il existe également des formes de résistance indépendantes de *BCR-ABL1*. Pour ces formes, d'autres gènes ou voies de signalisation sont exprimés de manière aberrante et causent la réponse non-optimale au traitement.²¹⁰ D'autres types de résistance peuvent venir des cellules souches leucémiques, *BCR-ABL1+*, qui ne répondent pas au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase mais qui sont la source de production de cellules leucémiques.²¹¹

a) La résistance dépendante de *BCR-ABL1*

La découverte en premier lieu de la mutation T315I chez des patients en rechute de traitement par inhibiteur de tyrosine kinase a initialement assombri les bienfaits à long terme de la thérapie ciblée car à l'époque il était difficile de prédire la fréquence de la survenue des mutations qui neutralisent l'effet de l'imatinib. Plusieurs années plus tard, les cliniciens et les chercheurs se sont rendu compte que la probabilité de survenue de mutations génétiques dans le domaine tyrosine kinase d'*ABL1* était corrélée à la durée de la maladie avant traitement. Plus la maladie était

dans un stade avancé (phases accélérée et blastique), plus la probabilité de trouver des mutations dans le domaine kinase de ABL1 était élevée.²¹² Dans cette logique, les patients en phase chronique de la maladie présenteraient rarement des mutations dans ce domaine kinase. En effet, moins de 30% des patients résistant au traitement initial portent ce type de profil mutationnel.¹⁹⁰

Lorsque le nombre de patients résistant à l'imatinib augmentait dans le temps, le séquençage du domaine tyrosine kinase de ABL1 quasi-systématique a dévoilé une multitude de mutations supplémentaires.¹⁹⁰ De nos jours, plus de 50 « hotspot » mutationnels associés à la résistance sont connus tout au long du domaine kinase de ABL1 (**Figure 21, A**).²¹³ Parmi ces mutations, huit sont en contact direct avec l'imatinib dans le site de liaison à l'ATP, soit par liaison hydrogène soit par liaison de Van der Waals (**Figure 21, A et 21, B** étoiles vertes).²¹⁴ Les mutations dans les autres régions du domaine tyrosine kinase modifient la conformation de BCR-ABL1, en favorisant sa forme active qui empêche la liaison à l'imatinib.¹⁹⁰

La génération d'inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde et de troisième génération visait à contourner les formes de résistance à l'imatinib en produisant des molécules ayant une affinité supérieure pour la protéine de fusion. En effet, ces médicaments permettent de traiter les patients de manière efficace peu importe leur état mutationnel dans le domaine tyrosine kinase, sauf pour quelques exceptions (**Tableau 2**).^{213,214}

Tableau 2 : Substitutions d'acides aminés causant la résistance aux inhibiteurs de seconde et de troisième génération

nilotinib	dasatinib	bosutinib	ponatinib
Y253F/H	V299L	V299L	T315M
E255K/V	T315I	T315I	T315L
T315I	F317L/V/I/C	?	
F359V/I/C			

La mutation T315I est en gras et surligné car elle cause la résistance au traitement pour tous les inhibiteurs de première et seconde génération. Le point d'interrogation indique que des mutations additionnelles peuvent être découvertes dans un futur proche.

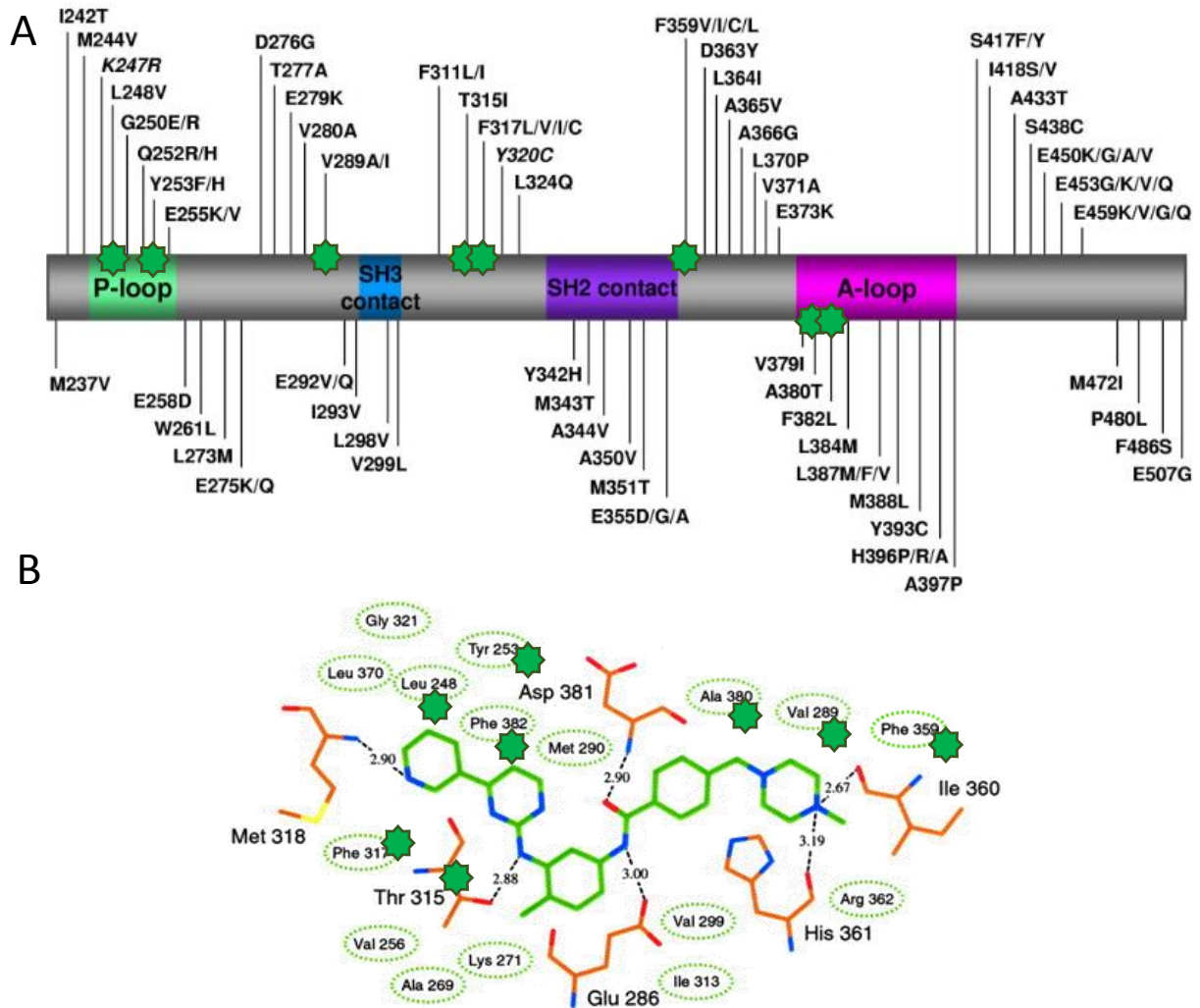


Figure 21 : Représentation des mutations dans le domaine kinase de BCR-ABL1

(A) Issue de « *BCR-ABL1 kinase domain mutation analysis in CML patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet* » Soverini et al., *Blood*, 2011. Liste des substitutions d'acides aminés le long du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL1. (B) Issue de « *Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI571)* » Nagar et al., 2002, *Cancer Research*. La molécule d'imatinib est en vert, les atomes d'oxygène sont en rouge et les atomes d'azote sont en bleu. Les liaisons hydrogènes entre l'imatinib et les acides aminés du domaine ABL1 sont en pointillés noirs. Les acides aminés qui forment des liaisons de Van der Waals avec l'imatinib sont entourés en pointillés verts. (A) et (B) les étoiles jaunes correspondent à des substitutions d'acides aminés ayant un contact direct avec l'imatinib.

Aucun des inhibiteurs de première ou de seconde génération ne permet de neutraliser l'effet de la mutation T315I dans ce domaine. La thréonine en position 315 a été appelée « the gatekeeper residue » puisque sa position stratégique permet de contrôler l'accessibilité du site de liaison à l'ATP et tolère une liaison hydrogène à l'imatinib et aux inhibiteurs de seconde génération.²¹⁴ La substitution de la thréonine par une isoleucine plus hydrophobe et volumineuse élimine la liaison

hydrogène essentielle pour la fixation des inhibiteurs dans le site de liaison à l'ATP.^{209,214} De manière intéressante, des substitutions homologues de thréonine par une isoleucine dans le domaine kinase de c-KIT (T670I) et de PDGFRA (T674I) ont été identifiées chez des patients résistant à l'imatinib dans le traitement des GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales) et du syndrome d'hyperéosinophilie.^{215,216} Afin de contrebalancer l'effet de cette mutation, le ponatinib, inhibiteur de troisième génération a été généré.¹⁹⁹ Malheureusement, le traitement prolongé au ponatinib cause des effets secondaires non-négligeables et peut produire des mutations supplémentaires au niveau du codon 315 par pression de sélection qui causent également la résistance au ponatinib (T315M et T315L).^{217,218}

Des études de prédiction de mutations dans BCR-ABL1 sur un modèle de souris causant la résistance à l'inhibiteur allostérique ABL001 ont récemment été publiées.⁹³ Les résidus mutés diffèrent de ceux impliqués dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase car les sites de liaison avec l'agent thérapeutique sont différents. Généralement, la combinaison d'un inhibiteur de tyrosine kinase et de l'ABL001 agit de manière synergique et permet de bloquer certaines formes mutées de BCR-ABL1.⁹³

Indépendamment des mutations génétiques dans l'oncogène *BCR-ABL1*, l'amplification de ce gène ou de la protéine de fusion engendre également une forme de résistance dépendante de BCR-ABL1.^{219,220} Cette surexpression de BCR-ABL1, qui est fréquemment retrouvée chez les patients résistants, atteint des niveaux trop élevés pour être traités, car l'administration d'une concentration trop forte d'inhibiteur de tyrosine kinase devient toxique.^{209,221} L'utilisation d'inhibiteur plus puissant, comme le dasatinib qui possède 300 fois plus d'affinité pour le BCR-ABL1 que l'imatinib, peut agir contre ces taux anormaux de BCR-ABL1.

La résistance dépendante de BCR-ABL1 reste de nos jours la forme de résistance la plus étudiée concernant la LMC. Il existe d'autres types de résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase qui ne touchent pas l'oncogène lui-même, ce sont les résistances indépendantes de BCR-ABL1.

b) La résistance indépendante de BCR-ABL1

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosines kinase ont largement été étudiés depuis la découverte de la mutation T315I en 2001. Il est estimé qu'environ 50% des patients résistants ou en rechute après traitement par imatinib possèdent des mutations dans le domaine tyrosine kinase de BCR-ABL1 ou présentent une surexpression de cet oncogène.²²² Pour l'autre moitié des patients résistants, l'hypothèse est que l'activation de voies de signalisation parallèles

compense l'inhibition de BCR-ABL1 et maintient les cellules leucémiques en prolifération anarchique, indépendamment de la protéine de fusion.

Les premiers cas étudiés de résistances indépendantes de BCR-ABL1 montraient une augmentation de l'expression de *HCK* et *LYN*, deux kinases de la famille des proto-oncogènes SRC, chez les patients résistants et dans des lignées cellulaires résistantes. La surexpression de ces facteurs permettait un maintien de l'activation des voies de BCR-ABL1, avec ou sans inhibiteur de tyrosine kinase.^{223,224} Plus récemment, des études ont démontré l'importance d'autres gènes dans la résistance au traitement, tels que *FOXO1*²²⁵, β -caténine²²⁶, *STAT3*²²⁷ et du complexe *mTOR*²²⁸. En effet, leur ciblage par thérapie combinée permet de retrouver une sensibilité au traitement et une diminution de la prolifération *in vitro* dans des cellules initialement résistantes à la monothérapie par inhibiteur de tyrosine kinase.

La résistance primaire au traitement, qui se traduit par un échec de la réponse thérapeutique chez des patients traités par inhibiteur de tyrosine kinase, a également été corrélée à une expression anormale de certains transporteurs. Par exemple, la surexpression du transporteur membranaire ATP-dépendant *MDR1*²⁰², qui permet un export actif de l'imatinib de la cellule, ou la diminution de l'activation du transporteur *hOCT1*^{229,230}, qui permet l'importation de l'agent thérapeutique, ont été associées à une résistance primaire au traitement par imatinib *in vitro* et *in vivo*. De plus, la voie de l'apoptose intrinsèque semble moduler la réponse initiale au traitement, surtout par modification de l'expression de *BIM*, un activateur important de l'apoptose.²³¹

Une multitude de techniques différentes ont été utilisées *in vitro* afin de dévoiler des gènes ou des voies de signalisation qui sont impliqués dans la résistance au traitement. Originellement, les lignées résistant aux inhibiteurs de tyrosine kinase ont été générées en incubant des cellules sensibles dans un milieu contenant des concentrations de plus en plus élevées en agent thérapeutique.^{103,201} Progressivement, les cellules deviennent résistantes au traitement grâce à une pression de sélection puissante dans le milieu de culture. Plus récemment, l'utilisation de molécules d'ARN interférents ou de banques de « small hairpin » (sh)ARN a permis d'identifier les protéines impliquées dans la résistance au traitement en effectuant un criblage génétique par diminution d'expression (knock-down) de gènes.^{225,232} Néanmoins, les études concernant la résistance indépendante de BCR-ABL1 restent relativement minoritaires et la découverte de nouveaux facteurs clés qui causent une réponse non-optimale au traitement reste urgente.

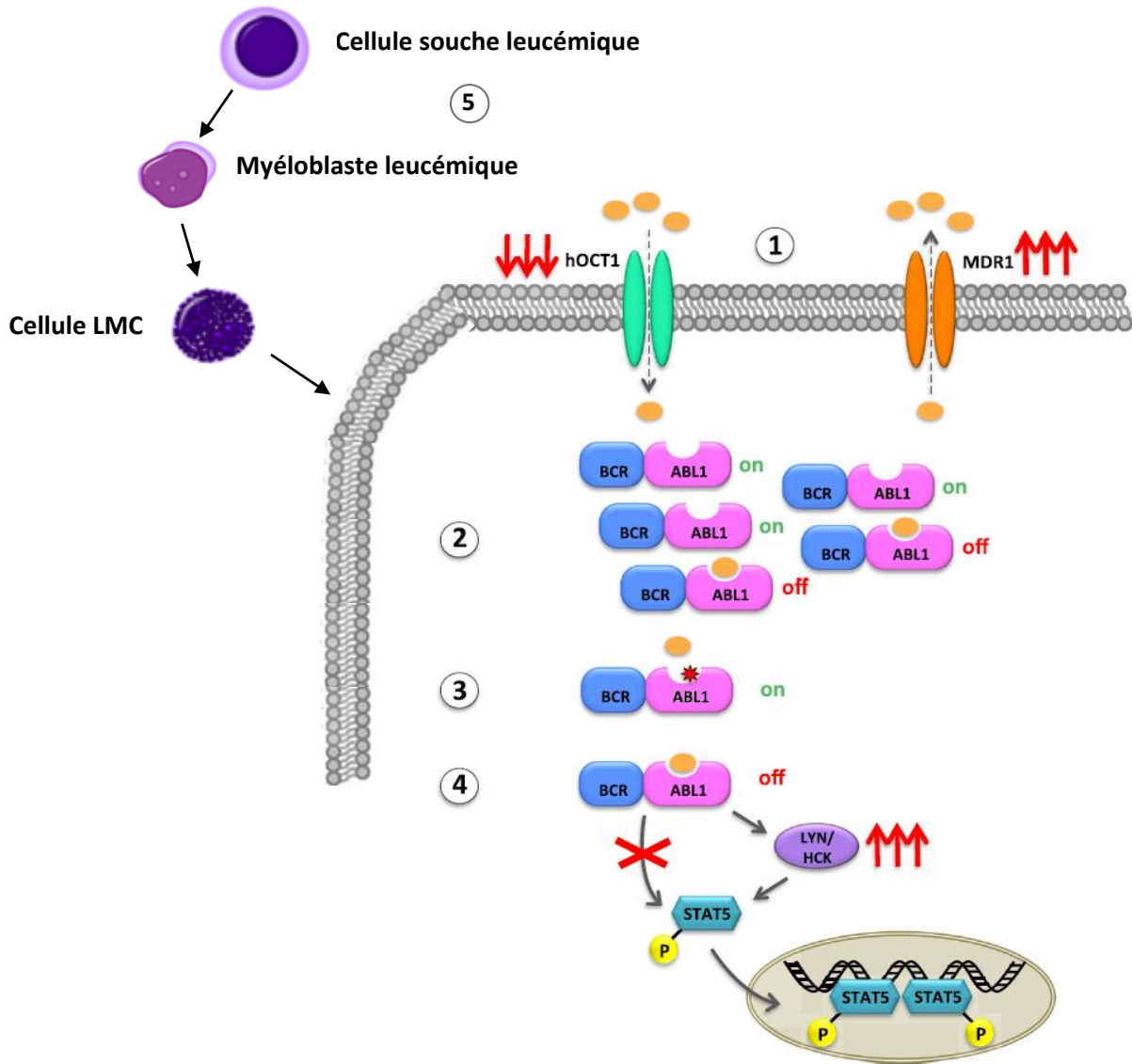
c) La résistance des cellules souches leucémiques

La LMC est une pathologie qui résulte d'une translocation chromosomique t(9;22) dans un précurseur hématopoïétique. Ce précurseur dans la moelle osseuse va constamment générer des cellules leucémiques BCR-ABL1 positives dans le sang, qui peuvent être éliminées par inhibiteur de tyrosine kinase grâce au phénomène d'addiction oncogénique. Contrairement à ces cellules sensibles, les cellules souches de LMC ne dépendent pas de l'activité de BCR-ABL1 pour survivre, et donc restent insensibles aux traitements par inhibiteur de tyrosine kinase.²³³ Cette propriété des cellules souches leucémiques est un obstacle important vis-à-vis du traitement efficace et complet de la pathologie, car si une cellule souche LMC persiste, elle peut continuer à produire des cellules leucémiques.

Depuis 2007, des études d'arrêt de traitement par inhibiteur de tyrosine kinase chez les patients atteints de LMC ont été conduites. Les critères d'arrêt de traitement sont assez stricts. Les patients doivent être en réponse moléculaire complète au traitement pendant au moins 2 ans avant une éventuelle cessation.²³⁴ Parmi les centaines de patients inclus dans les essais d'arrêt de traitement autour du monde, environ 50% rechutent en moins de 6 mois.²³⁵ Une des hypothèses expliquant les taux assez élevés de rechute porte sur la persistance de cellules souches leucémiques résistantes au traitement. En effet, si ces cellules ne sont pas éliminées par le traitement, la maladie peut se perpétuer.

Cibler les cellules souches leucémiques est donc primordial afin d'essayer de véritablement guérir la leucémie myéloïde chronique. Plusieurs études cherchent à trouver le talon d'Achille de ces cellules résistantes pour spécifiquement les éliminer.²³⁶⁻²³⁸ Une étude pionnière a démontré l'efficacité d'une combinaison d'imatinib avec des agonistes de PPAR γ pour la destruction de cellules souches leucémiques, en exposant une co-inhibition de BCR-ABL1 et des facteurs de quiescence (CITED2 et HIF2 α) des cellules progénitrices.²³⁹ De plus, une étude sur des cellules souches pluripotentes induites a démontré que l'imatinib pouvait, à l'inverse du travail précédent, maintenir les cellules souches en état immature en augmentant l'expression de marqueurs de la cellule souche.²⁴⁰

La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la LMC peut venir de sources différentes (**Figure 22**). De nos jours, découvrir de nouvelles vulnérabilités de la cellule souche ou de la cellule leucémique différenciée pourrait aider à éradiquer cette pathologie.²⁴¹ Afin de trouver de potentielles cibles thérapeutiques pour combattre la LMC, j'ai effectué un criblage génomique pour découvrir des gènes impliqués dans la résistance au traitement par imatinib.



Adapté de « Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy » Soverini et al, *Molecular Cancer*, 2018.

Figure 22 : Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase

La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase peut être due à (1) une expression anormale de transporteurs, (2) une surexpression de la protéine de fusion BCR-ABL1, (3) une mutation dans le domaine kinase de BCR-ABL1, (4) une voie de signalisation alternativement activée ou (5) une cellule souche persistante qui génère des cellules leucémiques.

C) La technologie CRISPR-Cas9, du simple knock-out au criblage génome entier

L'édition génétique, l'introduction d'une modification voulue à un site précis dans le génome d'une cellule vivante, est actuellement en plein essor grâce à ses applications dans le domaine de la recherche biomédicale. Cette technologie a le potentiel de réaliser de futures thérapies efficaces pour tous types de maladies génétiques. La découverte de la technologie « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » (CRISPR)-CRISPR associated (Cas) en 2012 par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier a révolutionné ce domaine de recherche.²⁴² Rapidement, de nombreuses équipes de recherche dans le monde ont exploité les capacités de cette technologie pour produire des outils de manipulation génétique révolutionnaires.²⁴³

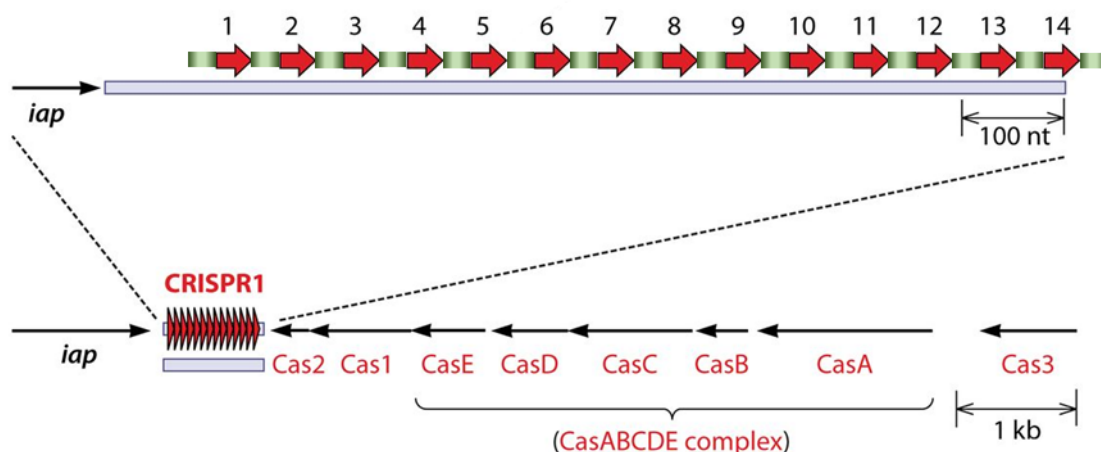
1) La découverte de la technologie CRISPR-Cas

Le domaine de la recherche en génétique a véritablement fait un bond en avant grâce à l'arrivée de la technologie CRISPR-Cas9. Avant la découverte de cette technique, les manipulations génétiques *in vitro* étaient souvent fastidieuses et coûteuses. Mais depuis, la modification d'un locus d'ADN de cellules eucaryotes et procaryotes se fait de manière efficace, précise et rapide.²⁴⁴⁻²⁴⁶ Auparavant, la mutagenèse ciblée dans une cellule vivante se faisait avec des protéines de fusion telles que les « Zinc Finger Nuclease » (ZFN)²⁴⁷ ou les « Transcription Activator-Like Effector Nuclease » (TALEN)²⁴⁸. Le principe est simple, un domaine de liaison à l'ADN (« zinc finger » ou « TALE ») est fusionné à la nucléase FokI qui permet d'effectuer une coupure double brin dans l'ADN. L'exécution, quant à elle, est plus complexe ; les manipulations pour générer un ZFN ou TALEN demandent un travail conséquent, allant de plusieurs jours voire plusieurs semaines.^{249,250} Heureusement, cet obstacle technique a été contourné avec la découverte du système CRISPR-Cas9.^{242,251}

a) D'une séquence particulière dans l'ADN bactérien...

Les toutes premières séquences CRISPR ont été découvertes il y a plus de trente ans dans le génome bactérien d'*Escherichia coli* lors d'une analyse sur le gène *iap* (isozyme conversion of alcaline phosphatase).²⁵² A l'époque, la prédiction de fonctions biologiques de ces séquences

répétées était difficile à effectuer à cause des quantités insuffisantes de données génétiques accessibles. Cette fonction a été élucidée environ vingt ans plus tard en 2005, par trois équipes travaillant indépendamment sur les séquences génomiques CRISPR.²⁵³⁻²⁵⁵ Ils ont démontré que sur le locus CRISPR, des fragments d'ADN extra-chromosomiques, provenant de bactériophages, prophages ou de plasmides, étaient intercalés entre les séquences répétées palindromiques.^{253,254} En parallèle, l'étude des séquences en aval du locus CRISPR a montré la présence de plusieurs gènes *Cas*, pour « CRISPR associated »²⁵⁶, codant des protéines qui sont exprimées conjointement avec les CRISPR. De plus, ces équipes ont suggéré que les bactéries peuvent, grâce à un mécanisme inconnu à l'époque, stocker un fragment d'ADN exogène dans le locus CRISPR pour constituer un catalogue de fragments d'ADN des agressions génétiques passées^{253,254}, créant ainsi un système immunitaire acquis bactérien²⁵⁷ (**Figure 23**). La fonction immunitaire du système CRISPR-Cas a été démontrée expérimentalement en 2007, en générant une souche de bactérie *Streptococcus thermophilus* résistante à un phage par l'insertion d'une répétition CRISPR qui peut reconnaître et s'hybrider à l'ADN de ce phage.²⁵⁸



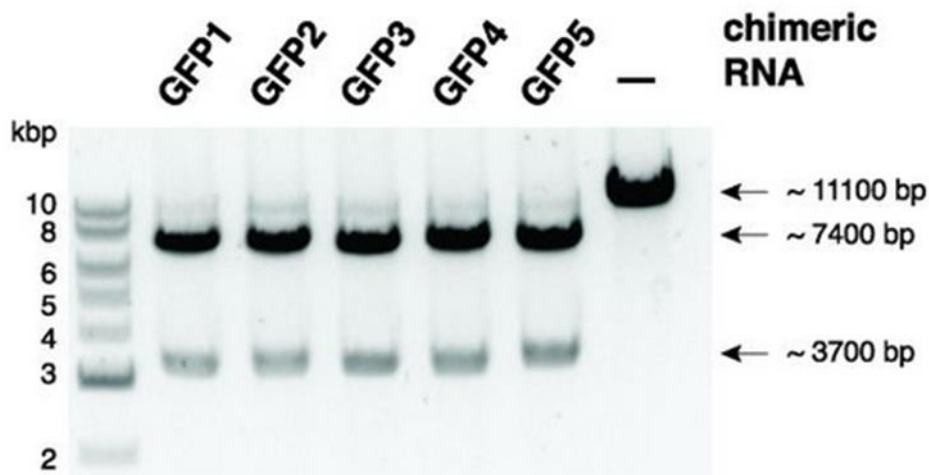
Adapté de « History of CRISPR-Cas from encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology » Ishino et al, *Journal of Bacteriology*, 2018.

Figure 23 : Le locus CRISPR-Cas

En étudiant le gène *iap* chez *E. Coli*, une séquence ordonnée et répétée a été découverte. En effet, des séquences extra-chromosomiques (flèches rouges) sont encadrées par de courtes séquences répétées palindromiques (rectangles verts). Les gènes *Cas* ont été caractérisés en aval du locus CRISPR.

b) ...à une endonucléase d'ADN guidée par ARN

La démonstration de la réelle fonction de ce complexe a été publiée en août 2012 par les laboratoires de Jennifer Doudna et d'Emmanuelle Charpentier²⁴², et deux semaines plus tard par le laboratoire DuPont²⁵¹. En effet, ces études ont affirmé *in vitro* que l'association de la Cas9, un membre de la famille Cas qui permet la fonction immunitaire de la bactérie²⁵⁹, avec une molécule d'ARN nommé CRISPR (cr)ARN pouvait spécifiquement cliver l'ADN à un locus bien particulier^{242,251} (**Figure 24**). L'année suivante, les équipes de Feng Zhang et George Church ont prouvé que le complexe CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* peut ensuite être appliqué à la modification génétique dans des cellules de mammifère.^{244,260} De manière intéressante, la cible à cliver dépend exclusivement de la séquence de la molécule d'ARN qui est associée à l'endonucléase Cas9. Etant donné que ces ARN peuvent être synthétisés dans un laboratoire pour spécifiquement cibler une séquence particulière dans l'ADN génomique d'une cellule, l'édition ciblée du génome est devenue accessible et rapide à effectuer. Ces quatre publications ont bouleversé le domaine de la recherche en génétique et depuis 2012 ont été citées plus de 20 000 fois.



Issue de «A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity» Jinek et al, Science, 2012. Figure. 5.D

Figure 24 : Le système CRISPR-Cas9 est programmable

Sur cette figure, Jinek *et al.*, ont démontré pour la première fois que le système CRISPR-Cas9 peut cliver un plasmide contenant le gène *GFP* en ciblant 5 endroits différents sur ce gène avec 5 crARN différents (GFP1-5). Après coupure, le plasmide a été digéré par enzyme de restriction et deux bandes apparaissent, montrant l'efficacité redoutable du système CRISPR-Cas9.

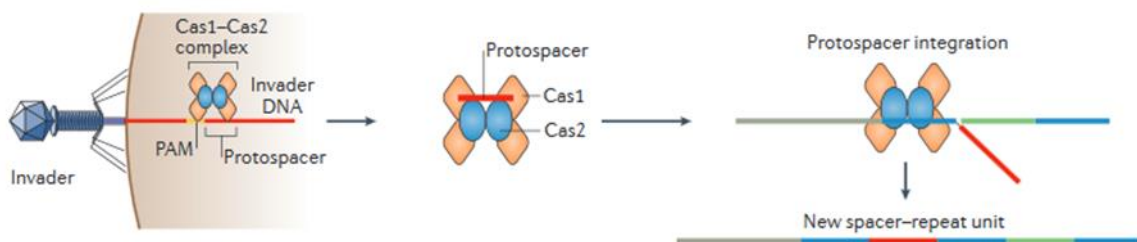
c) La fonction physiologique du système CRISPR-Cas chez les bactéries

La première hypothèse quant à la fonction physiologique du système CRISPR-Cas chez les bactéries était que ce système, tout comme le système d'ARNi chez les eucaryotes, fonctionnait par interférence en bloquant l'expression de l'ADN du bacteriophage.²⁵⁷ Les découvertes concernant l'activité endonucléase de la Cas9 ont changé la compréhension du mode de fonctionnement des CRISPR et ont agi en tant que catalyseur pour les recherches autour de ce système. De ce fait, une multitude de nouveaux systèmes CRISPR-Cas ont été découverts dans des souches bactériennes et d'archées.

Une classification récente des systèmes CRISPR-Cas, qui range les différents loci en catégories selon les gènes *cas* exprimés, inclut 2 classes, divisées en 6 types et 19 sous-types.²⁶¹⁻²⁶³ Parmi tous les différents sous-types, nous retrouvons deux modules : un module d'adaptation et un module effecteur.

i) Le module d'adaptation

Les séquences répétées dans le locus CRISPR, également appelées « spacer » ou « protospacer » (**Figure 23**, flèches rouges), représentent une archive des agressions de phages précédentes. Associés à ce locus se situent les gènes *cas1* et *cas2*, essentiels à l'adaptation du système immunitaire bactérien par CRISPR. Ce module d'adaptation, qui comprend le locus CRISPR et les gènes *cas1* et *cas2*, est ubiquitaire dans toutes les catégories différentes de CRISPR et permet la première étape d'immunité acquise bactérienne par CRISPR-Cas.²⁶³



Issue de «CRISPR-Cas Adaptation, Insights into Mechanisms of Action» Amatai and Sorek, Nature, 2016.

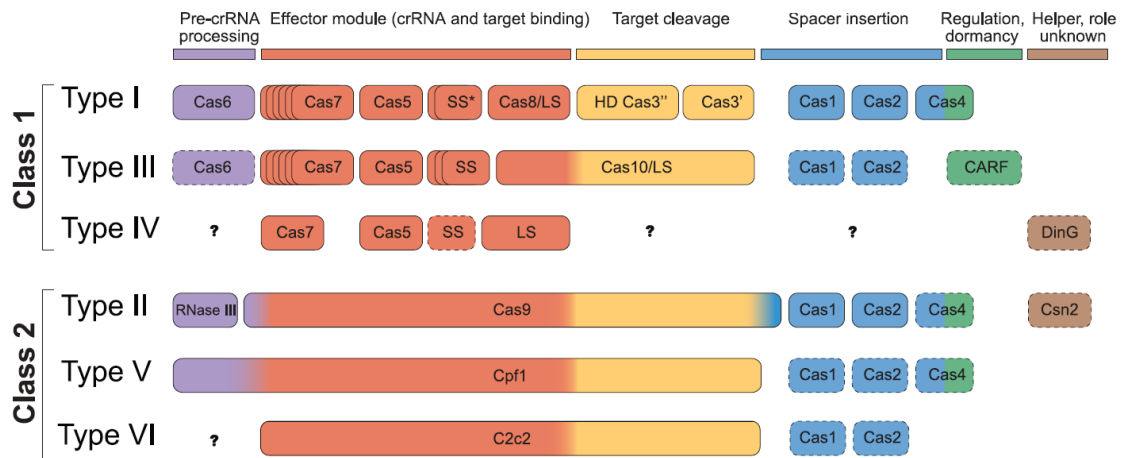
Figure 25 : Le module d'adaptation et l'intégration de protospacer dans le locus CRISPR

Le complexe Cas1-Cas2 découpe un protospacer qui juxtapose une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif). Le protospacer est ensuite intégré dans le locus CRISPR et une nouvelle répétition est générée.

Effectivement, à chaque infection par virus ou bactériophage, le système CRISPR peut capturer une séquence virale grâce à l'expression des Cas1 et Cas2, qui forment un complexe qui reconnaît l'ADN de l'agresseur. Ce complexe peut ensuite découper un fragment de sa cible, le protospacer, typiquement de 30 à 40 pb selon le type de CRISPR²⁶⁴, et l'insérer dans le locus CRISPR entre deux séquences répétées, nouvellement dupliquées (**Figure 25**).²⁶⁵ La découpe du protospacer se fait juste en amont d'une courte séquence de 2 à 7 nucléotides, appelée PAM (Protospacer Adjacent Motif).²⁶⁶ Le motif PAM permet la discrimination entre la reconnaissance du soi et du non-soi, puisque cette séquence est obligatoire afin de cliver l'ADN étranger, et son absence dans le locus CRISPR bactérien empêche la reconnaissance du soi.²⁶⁷

ii) Le module effecteur

Contrairement au module d'adaptation, partagé entre tous les types de CRISPR, le module effecteur varie et définit le sous-type du système CRISPR-Cas de l'espèce en question (**Figure 26**).²⁶⁸ Les systèmes CRISPR de classe 1, présents dans les bactéries et les archées, sont composés de complexes de 4 à 7 sous-unités Cas différentes qui varient selon chaque sous-type et peuvent cibler de l'ADN ou de l'ARN.^{263,269} Par exemple, les CRISPR de classe 1, type 1 forment un complexe entre les protéines Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, une petite sous-unité, une hélicase Cas3' et une nucléase Cas3'', ciblent et clivent des fragments d'ADN viral. Les CRISPR de classe 2, plus rares que ceux de classe 1, sont présents quasi-exclusivement dans les bactéries.²⁶³ Les modules effecteurs, pour cette classe, sont composés d'une seule protéine effectrice.²⁶⁸ Le CRISPR de type II est le plus connu car il comprend l'endonucléase Cas9, enzyme fréquemment utilisée de nos jours en biologie moléculaire.²⁷⁰



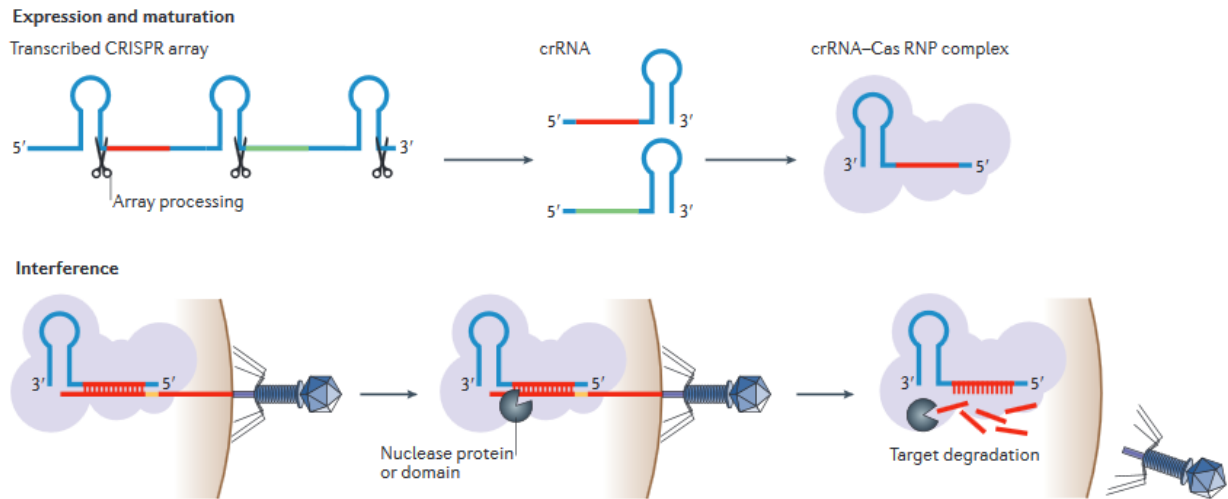
Issue de «Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems» Mohanraju et al., Science, 2016.

Figure 26 : Les locus Cas des deux classes de système CRISPR

Les CRISPR-Cas sont divisés en 2 classes, 6 types et 19 sous-types. Les CRISPR-Cas de classe 1 sont composés de complexes protéiques avec entre 4 et 7 sous unités, alors que les CRISPR-Cas de classe 2 sont composés d'une seule protéine effectrice. L'intégration de protospacer par Cas1-Cas2 est possible parmi tous les types de CRISPR-Cas.

iii) L'assemblage du complexe CRISPR-Cas pour une activité endonucléase

Afin de reconnaître et de cliver les acides nucléiques du virus ou bactériophage, les protospacers dans le locus CRISPR doivent être transcrits, maturés et complexés avec les protéines effectrices Cas. Dans un premier temps, les séquences CRISPR sont transcrites ensemble, sur un long fragment d'ARN qui présente une conformation secondaire en épingle à cheveux, structure qui correspond à l'hybridation des séquences palindromiques des séquences répétées. Chaque protospacer associé à sa séquence palindromique est ensuite clivé, formant ainsi le crARN.²⁷¹ Par la suite, la molécule crARN va pouvoir se lier directement au complexe Cas ou, à l'aide d'une molécule supplémentaire dans le cas de la Cas9, le « trans-activating CRISPR » (tracr)ARN, qui s'hybride sur le crARN et stabilise le complexe.^{242,271,272} Une fois assemblé en complexe ribonucléoprotéique (RNP), le système CRISPR-Cas peut ensuite reconnaître sa cible nucléotidique et la cliver (**Figure 27**).²⁶³



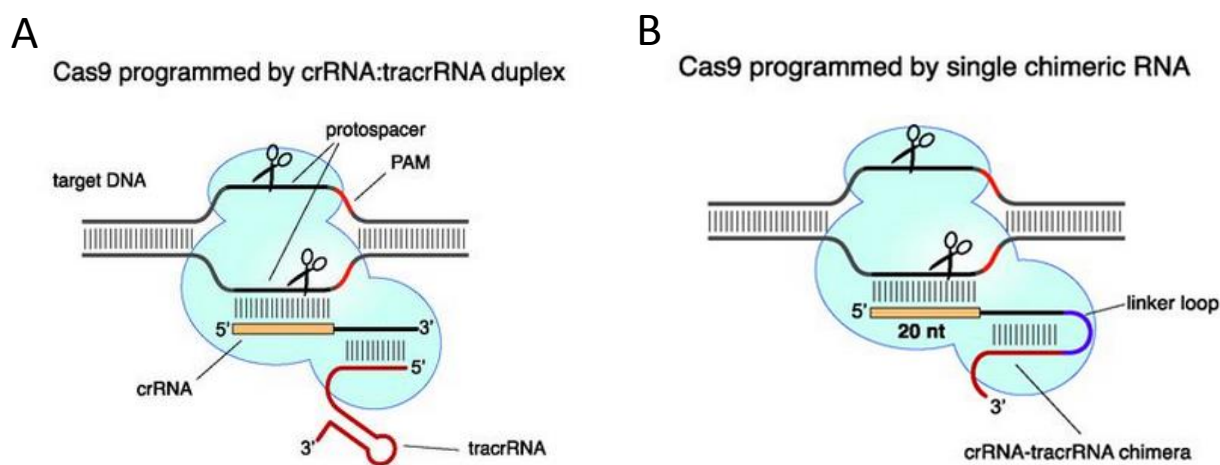
Issue de «CRISPR-Cas Adaptation, Insights into Mechanisms of Action» Amatai and Sorek, Nature, 2016.

Figure 27 : La maturation des crRNA et la reconnaissance et dégradation de nucléotides viraux

L'ensemble du locus des séquences CRISPR répétées est transcrit et chaque crRNA individuel est maturé et complexé avec les protéines Cas, formant le complexe de ribonucléoprotéine (RNP). Ce complexe peut ensuite cibler et cliver l'ADN viral par reconnaissance de séquence homologue au protospacer (en rouge et en vert).

2) Le mécanisme d'action du système CRISPR-Cas9

Au cours de ma thèse, j'ai uniquement utilisé le CRISPR-Cas de type II de la souche bactérienne *Streptococcus pyogenes* (Sp) qui produit la SpCas9. De manière physiologique, le crARN doit s'associer avec le tracrARN afin de se complexer avec la SpCas9 (**Figure 28A**). Dans l'article de *Jinek et al.*, la fusion de ces deux molécules d'ARN en une, nommée ARN guide (gRNA ou single guide (sg)RNA), permet une activité endonucléase de la Cas9 aussi efficace qu'avec le duplex crRNA:tracrRNA, mais avec une seule molécule d'ARN pour faciliter les manipulations au laboratoire (**Figure 28B**).²⁴²



Issue de «A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity» Jinek et al, Science, 2012. Figure. 5.A

Figure 28 : La fusion des ARN CRISPR (crRNA) et trans-activating CRISPR (tracr) permet de maintenir l'activité endonucléase de la Cas9

(A) Le complexe RNP Cas9 physiologique dans la souche bactérienne *Streptococcus Pyogenes* avec le crRNA qui s'hybride sur le tracrRNA pour permettre la liaison à la Cas9. (B) La fusion des deux molécules d'ARN permet de maintenir l'activité endonucléase de la Cas9.

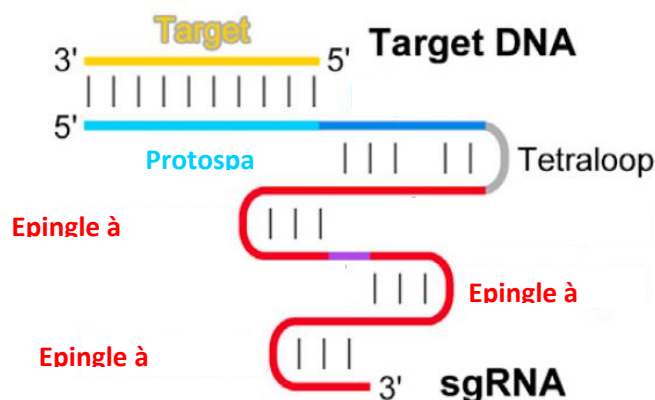
Le système CRISPR-Cas9 permet de cliver de l'ADN double brin de manière précise et spécifique dans la majorité des cellules eucaryotes et procaryotes. L'endonucléase Cas9 coupe l'ADN uniquement si elle est guidée vers une séquence particulière grâce à la molécule gRNA. La molécule gRNA doit scanner des millions voire des milliards de paires de bases de l'ADN génomique pour éventuellement reconnaître et s'hybrider à une séquence de 20 nucléotides (nt) directement en amont du PAM pour ensuite effectuer une coupure double brin.^{244,273} Plusieurs étapes sont nécessaires avant de pouvoir réaliser un clivage dans l'ADN, le complexe gRNA-Cas9 doit se former,

scanner l'ADN pour trouver des séquences complémentaires, puis finalement effectuer le clivage double brin. En conséquence, la cellule doit, en réponse à ce dommage génomique, recruter des complexes de réparation de l'ADN pour corriger la cassure. Cette réparation n'est pas systématiquement fidèle et peut, de temps en temps, créer des mutations dans l'ADN.^{244,260,274}

a) La molécule d'ARN guide

La molécule d'ARN guide ou gRNA permet de littéralement guider le complexe CRISPR-Cas9 vers un locus précis de 20-nt dans l'ADN génomique pour effectuer une coupure double brin. La structure de cette molécule d'ARN de 118 bases est extrêmement importante afin de pouvoir, dans un premier temps, se lier à l'endonucléase Cas9, mais aussi pour reconnaître sa séquence homologue dans l'ADN génomique (**Figure 29**).²⁷³ La liaison à la Cas9 se fait majoritairement grâce aux structures en épingle à cheveux et à la structure en « tetraloop ».²⁷⁵ La liaison à l'ADN, quant à elle, dépend de la séquence du protospacer de 20 nt. Cette dernière peut être divisée en deux régions de taille inégale, une région distale en 5' (≈ 15 nt) et une région proximale en 3' (≈ 5 nt), nommée « seed », qui est cruciale pour l'initiation de l'hybridation du sgRNA sur l'ADN génomique.^{273,275,276}

De manière physiologique, le protospacer provient de l'ADN du bactériophage qui infecte la bactérie. Dans le laboratoire, nous pouvons spécifiquement choisir la séquence du protospacer pour effectivement guider un complexe CRISPR-Cas9 quasiment où l'on veut dans le génome.



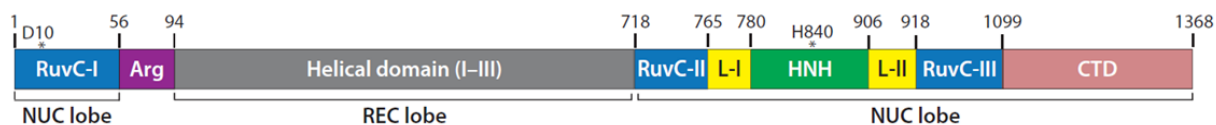
Adapté de «Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA» Hishimasu et al., Cell, 2014. Figure. 1.B

Figure 29 : Représentation schématique d'une molécule ARN guide

Le protospacer de 20 nucléotides peut se lier à l'ADN cible. La structure tetraloop permet l'hybridation physiologique entre crRNA and tracrRNA, ici fusionnées. Les trois structures en épingle à cheveux (rouge) permettent la liaison à la Cas9.

b) L'endonucléase Cas9

La (Sp)Cas9 de *Streptococcus pyogenes* est une endonucléase d'ADN multifonctionnelle à multi-domaines assez large de 1368 acides aminés (**Figure 30**). Elle est composée de deux lobes majeurs, un lobe de reconnaissance à l'ADN (lobe REC) et un lobe nucléase (lobe NUC).



Issue de « CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms » Jiang et Doudna, *Annu. Rev. Biophys.*, 2017.

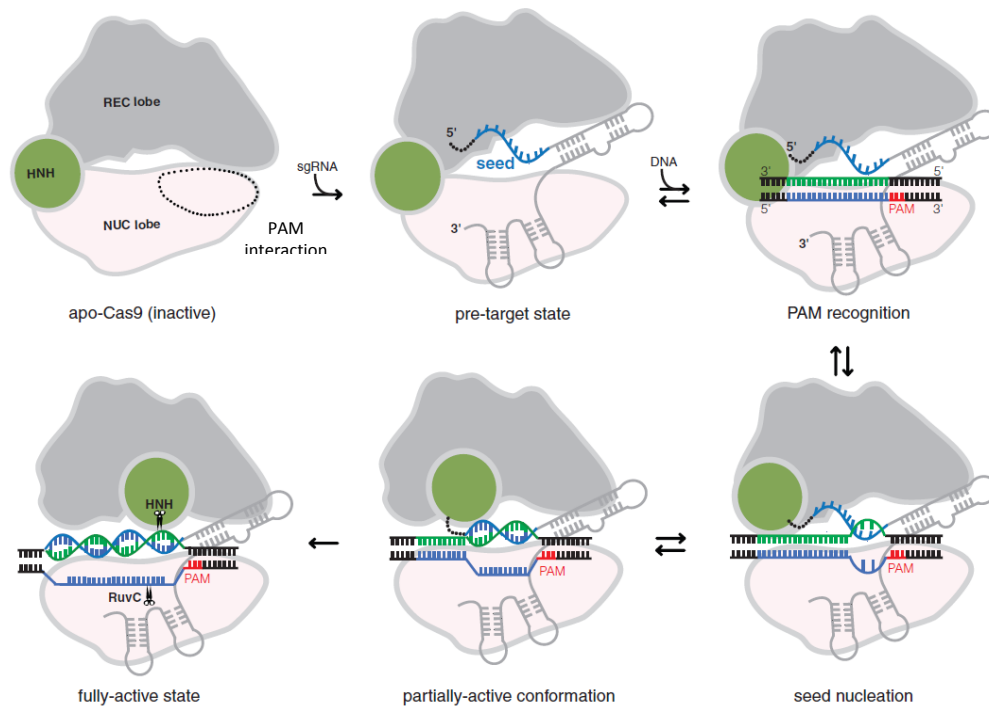
Figure 30 : Représentation des domaines de la SpCas9

La SpCas9 est composée principalement de deux lobes, un lobe à activité nucléase (NUC) et un lobe de reconnaissance d'ADN (REC). Le lobe NUC contient les trois sous-domaines nucléases RuvC I – III, le domaine nucléase HNH, deux domaines riches en leucines (L I – II) et un domaine C-terminal (CTD).

La reconnaissance de l'ADN et du sgRNA se fait principalement grâce aux domaines hélicoïdaux dans le lobe REC. Le domaine C-terminal (CTD) permet également l'initiation de l'hybridation du sgRNA avec l'ADN cible.²⁷⁵ Le clivage double brin par la Cas9 est réalisé généralement à 3 nucléotides en amont du PAM grâce à deux domaines endonucléases distincts dans le lobe NUC : un domaine nucléase HNH qui clive le brin complémentaire du sgRNA, et trois sous-domaines nucléases RuvC (I – III) qui, regroupés dans la bonne configuration, clivent le brin opposé.²⁷⁷ La conformation de la Cas9 varie en fonction de son état d'activation, qui est déterminée par sa liaison à un sgRNA et par sa liaison stable à une séquence d'ADN.²⁷⁸

c) L'activation du complexe sgRNA-Cas9

L'activation du complexe CRISPR se fait en plusieurs étapes (**Figure 31**). Dans un premier temps, lorsque la nucléase n'est pas liée à un sgRNA, elle est dans un état inactif.²⁴² En effet, les sous-domaines RuvC I - III dans le lobe NUC sont désordonnés et le domaine HNH est localisé hors du site actif de clivage d'ADN.²⁷⁹ De plus, le domaine d'interaction au PAM, en C-terminal de la protéine, est désorganisé et ne permet pas de se lier de manière stable à l'ADN.²⁸⁰



Issue de « A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition » Jiang et al., Science, 2015.

Figure 31 : Mécanisme de reconnaissance et de clivage d'ADN par CRISPR-Cas9

Lorsque la Cas9 est inactive, son site d'interaction avec le PAM est désorganisé. Lié au sgRNA, le complexe peut chercher et reconnaître des PAM dans l'ADN cible. La Cas9 dénature l'ADN en amont du PAM pour essayer d'hybrider son sgRNA sur l'ADN par complémentarité. Lorsque le sgRNA est entièrement lié à sa séquence complémentaire, les domaines HNH et RuvC changent de conformation et clivent chacun un brin de l'ADN.

La conformation de la Cas9 est modifiée lorsqu'elle se lie à une molécule sgRNA. Un domaine hélicoïdal dans le lobe de reconnaissance ainsi que plusieurs domaines différents (Arg et CTD) se lient aux structures secondaires d'épingle à cheveux du sgRNA.²⁷⁵ Cette liaison va modifier la conformation du complexe CRISPR, ce qui permet de se fixer aux sites PAM, de dénaturer l'ADN double brin et de tester la complémentarité des 5 nucléotides proximaux du protospacer (seed) avec les nucléotides d'ADN.^{273,275}

Ainsi, dans la majorité des cas, le sgRNA ne va pas pouvoir se fixer à l'ADN car les séquences formant le duplex sgRNA-ADN ne sont pas complémentaires. En effet, le complexe sgRNA-SpCas9 dénature l'ADN à chaque fois qu'il interagit avec une séquence PAM (5' – NGG – 3', où le N peut être n'importe lequel des quatre nucléotides).²⁴² Statistiquement, la SpCas9 peut interagir avec l'ADN tous les 10 nucléotides, car la probabilité approximative de trouver deux guanines côte à côte sur les deux brins d'ADN est de 10,6%, sachant que le pourcentage de GC dans le génome humain est environ de 46%.²⁸¹

Lorsque le complexe sgRNA-Cas9 découvre la séquence complémentaire du sgRNA, elle s'hybride sur l'ensemble des 20 nt de l'ADN génomique, ce qui stabilise le complexe Cas9-sgRNA:ADN et permet de moduler la conformation du domaine HNH afin de devenir actif et cliver le brin complémentaire.²⁸² Ces changements de conformation dans le domaine HNH vont diriger le brin opposé au brin complémentaire vers le site catalytique des trois sous-unités RuvC, d'ores et déjà regroupées, et permettre le clivage de celui-ci.^{283,284} Suite à la coupure double brin de l'ADN, le complexe sgRNA-Cas9 reste fortement lié sur l'ADN clivé jusqu'à ce que les enzymes de recyclage protéique libèrent l'ADN du complexe.²⁸⁰

d) Le clivage non spécifique de CRISPR-Cas9

Une fois formé, le complexe sgRNA-Cas9 est capable de se lier et cliver l'ADN si la molécule de sgRNA s'hybride sur une séquence complémentaire d'ADN de 20 nt. La complémentarité de la molécule sgRNA et la molécule d'ADN, quant à elle, ne doit pas obligatoirement être parfaite, c'est-à-dire qu'un duplex sgRNA-ADN peut se former s'il y a des mésappariements entre ces deux molécules.^{276,285,286} La région la plus importante pour stabiliser le duplex sgRNA-ADN est la région proximale au PAM ou seed, car les cinq premiers nucléotides du sgRNA régulent l'initiation de la liaison à l'ADN. S'il y a des mésappariements entre ADN et sgRNA au niveau du seed, le complexe sgRNA-Cas9 se déloge de l'ADN et cherche un prochain PAM. Par contre, si les mésappariements sont distaux du PAM, la formation de duplex sgRNA-ADN peut s'effectuer et le complexe peut cliver une séquence d'ADN non voulue.^{285,286}

3) L'édition du génome par CRISPR-Cas9

Les nucléases programmables ont émergé ces dernières années en tant qu'outils performants pour effectuer de l'ingénierie du génome de manière précise et spécifique au sein d'une cellule vivante.^{242,248,249} L'utilisation des endonucléases Cas9 guidées par une molécule d'ARN est devenue la technique de prédilection pour facilement cibler et effectuer un clivage double brin à une séquence d'ADN spécifique.^{244,260}

De manière physiologique, les cassures double brin de l'ADN surgissent constamment à cause de facteurs externes, des rayonnements ultraviolets ou des carcinogènes par exemple^{287,288}, ou internes comme lors du crossing-over au cours de la méiose²⁸⁹. C'est pour cela que les cellules ont généré des mécanismes de réparation de cassures d'ADN.²⁹⁰ Il y a principalement deux types de réparation de cassures doubles brins dans l'ADN, une forme mineure, la recombinaison homologue (RH) et une forme majeure de réparation, la jonction des extrémités non-homologues (« non-homologous end-joining » ou NHEJ).

a) La création de mutations ponctuelles par recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un mécanisme de réparation de cassures d'ADN double brin extrêmement fidèle mais assez minoritaire, car ce type de réparation a lieu uniquement lors des phases S et G2 du cycle cellulaire.²⁹¹ La réparation d'une cassure de l'ADN s'appuie sur la présence d'une molécule d'ADN homologue pour répliquer la version non-endommagée au sein du site altéré. Pour cela, la chromatide sœur est recrutée au site de coupure et utilisée en tant que matrice pour la réparation (**Figure 32**).²⁹¹

La correction des cassures double brin dans l'ADN par recombinaison homologue après clivage par CRISPR-Cas9 a été adaptée par des équipes de recherche pour effectuer des mutations ponctuelles dans le génome.^{292,293} Pour cela, une séquence d'ADN exogène possédant la mutation d'intérêt et deux bras d'homologies doit être à proximité du site de coupure pour induire la réparation homologue. Néanmoins, les taux de réparation par ce système reste relativement faible et ce type de réparation pour effectuer des mutations ponctuelles n'est pas optimal dans les cellules de mammifères.²⁴³ Au cours de ma thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la génération de cellules dont l'expression d'un gène était éteinte par knock-out.

b) La création de knock-out génétique par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)

Le deuxième type de réparation de coupures double brin est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé dans les cellules de mammifères, la NHEJ.²⁴³ Contrairement à la recombinaison homologue, la NHEJ ne requiert pas de matrice d'ADN complémentaire afin de corriger la cassure, mais raboute directement les deux extrémités cassées de l'ADN.²⁹⁴ Ce mécanisme de réparation n'est pas systématiquement fidèle et peut générer de courtes délétions et insertions. En effet, lorsque la cassure a lieu dans l'ADN, un couple de protéines Ku70/80 est rapidement recruté aux extrémités clivées d'ADN, formant un anneau qui protège l'ADN d'une dégradation par exonucléase.²⁹⁵ L'hétérodimère Ku70/80 recrute ainsi des protéines du complexe NHEJ, notamment les protéines structurales XLF, APLF et XRCC4, et la kinase DNA-PKcs qui activent la ligation des deux extrémités d'acides nucléiques par phosphorylation et l'activation de la Ligase IV.^{290,295} Cette réparation rapide peut rabouter les extrémités de manière exacte ou, de temps en temps, rajouter par erreur de 1 à 4 nucléotides par synthèse de courts fragments nucléotidiques.²⁹⁶ Mais, si le recrutement de Ku70/80 est retardé, les extrémités d'ADN peuvent subir de petites dégradations par exonucléase et perdre plusieurs nucléotides.²⁹⁷ Le complexe NHEJ va ensuite liguer des fragments d'ADN, réparant ainsi la cassure double brin en y créant une courte délétion.²⁹⁶ La réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ peut donc engendrer de courtes délétions ou insertions, nommées indels (**Figure 32**).

De plus, il existe un mécanisme supplémentaire de réparation par NHEJ nommé NHEJ alternative ou MMEJ (Microhomology-mediated end-joining), qui repose sur la présence de petits fragments homologues de part et d'autre du site de coupure.²⁹⁸ Lors de la réparation, ces courtes séquences peuvent s'hybrider entre elles formant ainsi un duplex double brin. Le produit résultant possède des indels de tailles supérieures à celles de la NHEJ classique.²⁹⁶

La technologie CRISPR-Cas9 peut être utilisée pour la création de cellules dont l'expression d'un gène est éteinte. En effet, si le sgRNA cible un exon codant d'un gène, les indels générées par NHEJ décaleront le cadre ouvert de lecture du gène, qui entraînera un codon stop prématuré ou la dégradation de son ARNm par NMD (« nonsense mediated decay »), ce qui aura pour conséquence l'extinction stable du gène.^{244,260} Le système CRISPR-Cas9 est de nos jours l'outil idéal pour les applications d'édition génétique et la création de lignées cellulaires knock-out.

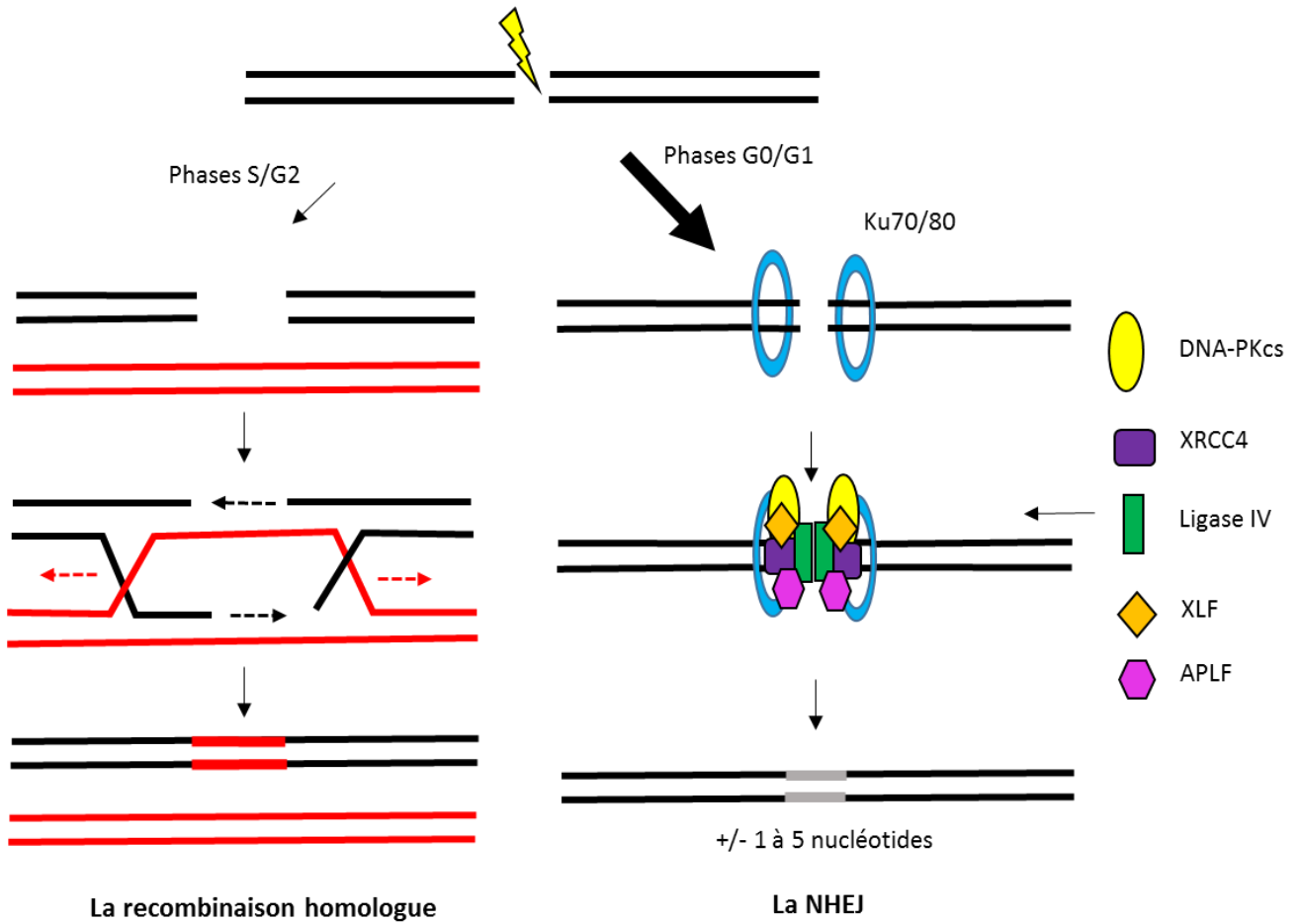


Figure 32 : Mécanismes de réparation de coupure double brin dans l'ADN

Le mécanisme de réparation de cassures double brin est effectué selon la phase du cycle cellulaire, en S/G2 la recombinaison homologue (RH) est prédominante et en G0/G1 la NHEJ est favorisée. Dans les cellules de mammifères, la réparation par NHEJ est largement majoritaire par rapport à la RH.

4) Le criblage génome entier par CRISPR-Cas9

Un criblage génétique est une technique expérimentale puissante pour découvrir des gènes impliqués dans un phénotype particulier au sein d'une population mutagénisée.²⁹⁹ Au cours de ma thèse, j'ai utilisé une méthode de crible avec la technologie CRISPR-Cas9 pour trouver des gènes et des voies de signalisation qui sont impliqués dans la résistance au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique.

Avec une librairie de sgRNA, l'endonucléase Cas9 peut générer des mutations perte de fonction dans un grand nombre de gènes différents. Une population cellulaire hétérogène peut ensuite être produite avec un seul gène muté par cellule, pour investiguer des phénotypes particuliers. J'ai utilisé la librairie de sgRNA qui a été générée par le laboratoire de Feng Zhang au Massachusetts Institute of Technology (MIT), nommée GeCKO pour Genome-scale CRISPR Knock-Out.³⁰⁰ Pour ce criblage, ainsi que tous types de criblage CRISPR, un certain protocole doit être respecté.

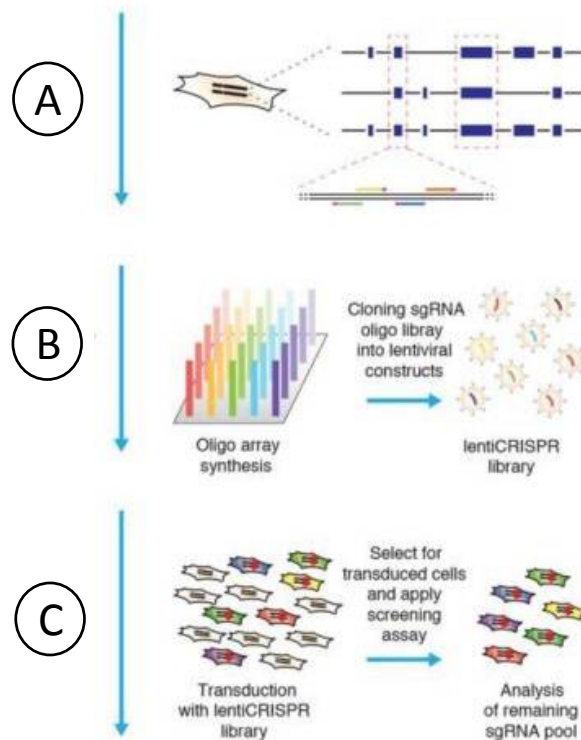
a) Les caractéristiques de la librairie GeCKO

La création d'une librairie de sgRNA s'effectue grâce à l'utilisation de logiciels bio-informatiques et de synthèse d'oligonucléotides.³⁰⁰ Pour la génération de la banque GeCKO, les auteurs ont décidé d'utiliser des sgRNA qui ciblent les premiers exons constitutifs de chaque gène codant une protéine, et qui ne possèdent pas (ou peu) de cibles off-target. La librairie GeCKO contient 121 413 sgRNA qui ciblent 20 914 gènes et micro (mi)ARN. Dans cette banque, chaque gène codant une protéine dans le génome est ciblé par 6 sgRNA différents et chaque miARN est ciblé par 4 sgRNA. Les gènes et miARN sont ciblés par plusieurs sgRNA différents pour augmenter la robustesse des résultats du criblage : si tous les sgRNA qui ciblent un gène génèrent le même phénotype, le résultat est plus puissant que si seulement un ou deux sgRNA le font (**Figure 33A**).

Après la création *in silico* des séquences des sgRNA de la banque, ces molécules sont synthétisées en simultané en microarray et sont clonées dans des vecteurs lentiviraux (**Figure 33B**).³⁰⁰ Il est primordial d'avoir empaqueté les sgRNA dans des lentivirus car l'analyse des données se fait en amplifiant par PCR la séquence des sgRNA qui s'est intégrée dans le génome des cellules d'intérêt via le mécanisme d'intégration des lentivirus.³⁰¹

b) Transduction de cellules par la banque CRISPR

La première étape de tout crible CRISPR est la transduction de lentivirus contenant le complexe CRISPR-Cas9 dans les cellules d'intérêt. Afin de limiter le nombre de sgRNA par cellule, la transduction se fait à une multiplicité d'infection (MOI) faible de 0,3. Les cellules ayant un sgRNA sont ensuite sélectionnées et le criblage peut débuter (**Figure 33C**).



Issue de « Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells » Shalem, Sanjana et al., Science, 2014.

Figure 33 : Création de la librairie GeCKO

(A) Les sgRNA sont générés *in silico* en ciblant des protospacers uniques dans les premiers exons constitutifs de chaque gène. (B) Les sgRNA sont ensuite synthétisés sur microarray puis clonés dans des vecteurs lentiviraux. (C) Les cellules sont transduites puis sélectionnées.

c) Le choix de la librairie CRISPR à utiliser

Les premières utilisations de banques CRISPR ont été décrites en 2014 lorsque deux laboratoires ont publié deux banques CRISPR différentes le même jour (12 décembre 2014).^{300,302} L'une, la banque GeCKO que nous avons utilisée lors de ce travail, a été générée pour cibler tous les gènes codants du génome ainsi que 1000 miARN.³⁰⁰ Tandis que l'autre, la banque du laboratoire de Sabatini, a été divisée en 5 sous-banques afin de pouvoir effectuer des criblages plus ciblés sur des mécanismes cellulaires particuliers.³⁰²

Depuis la création des banques CRISPR en 2014, de multiples équipes ont généré leurs propres banques CRISPR avec des caractéristiques différentes pour effectuer des criblages génétiques.³⁰²⁻³⁰⁷ Certaines librairies proposent jusqu'à 50 sgRNA par cible, pour une banque ciblée spécifique à la voie de signalisation Ras³⁰⁸ par exemple, mais également des librairies fortement optimisées avec une activité hautement élevée et spécifique des complexe sgRNA-Cas9 propose 4 sgRNA par cible³⁰⁷. Les banques peuvent cibler le génome entier pour l'analyse globale des gènes ou cibler un processus cellulaire spécifique (kinases, cycle cellulaire, nucléaires...)^{300,302}

d) Comparaison avec d'autres technologies de criblage

Avant l'apparition de la technologie CRISPR-Cas9, le criblage du génome entier était accompli grâce à l'utilisation de technologies à ARN interférant, notamment les short hairpin (sh)ARN. La différence la plus considérable entre ces deux techniques est le mécanisme par lequel l'activité d'un gène est réprimée. Les shARN peuvent diminuer l'expression d'un gène sans avoir modifié sa structure alors que les CRISPR-Cas9 vont définitivement éteindre son expression.³⁰⁹ Une comparaison entre la banque GeCKO et les shRNA a montré une meilleure efficacité de CRISPR-Cas9 par rapport aux shRNA.³⁰⁰ L'utilisation de cette technologie est aussi meilleure pour découvrir des gènes essentiels.³¹⁰

e) Criblage GeCKO pour découvrir des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib dans la LMC

L'objectif de ma thèse était d'identifier des gènes et des voies de signalisation qui sont impliqués dans la résistance à l'imatinib, inhibiteur de tyrosine kinase dans la LMC. Pour ce faire, nous avons utilisé la banque de sgRNA GeCKO pour générer une population cellulaire hétérogène

avec un complexe sgRNA-Cas9 par cellule qui éteint un seul gène. Nous avons utilisé pour le criblage la lignée cellulaire K562, qui est un modèle cellulaire de la LMC.

Après avoir généré une population de cellules knock-out, nous avons exercé une pression de sélection en supplémentant le milieu de culture avec de l'imatinib. Nous nous attendons à avoir une mortalité élevée avec une sous-population de cellules résistante au traitement. Cette résistance a été créée *in vitro* grâce à l'extinction de certains gènes par CRISPR-Cas9. Le prochain but était d'identifier quels sont les gènes impliqués dans la résistance au traitement par séquençage NGS des sgRNA intégrés dans le génome des cellules résistantes puis par analyse bio-informatique de l'enrichissement des sgRNA dans la population résistante.

f) L'utilisation de criblages CRISPR-Cas9 dans la littérature

Concernant les études de criblage sur lignées leucémiques, plusieurs études ont cherché à déterminer les gènes essentiels à ces cellules. Ces études ont montré que *BCR* et *ABL1* étaient fortement classés en tant que gènes essentiels pour les lignées K562 et KBM7 (une lignée de LMC haploïde) montrant l'importance de ces gènes vis-à-vis de la survie de la lignée leucémique, renforçant la théorie « d'addiction oncogénique ». ³⁰⁵ Les trois gènes essentiels suivants dans leur criblage étaient *SOS1*, *GRB2* et *GAB2*, qui sont tous nécessaires pour l'induction de Ras par BCR-ABL1 (**Figure 18**). De plus, l'étude des réseaux de régulation de miRNA dans les lignées leucémiques a été effectuée afin de découvrir des miRNA qui sont impliqués dans la prolifération de cette pathologie. ^{311,312} Plusieurs miRNA (miR-155, miR150...) régulent la prolifération de ces cellules leucémiques en affectant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, notamment TP53. ³¹² D'autres, tels que miR-1469 et miR-1972, régulent la prolifération cellulaire en affectant la progression dans le cycle cellulaire, respectivement au niveau des points de contrôle G2-M et G1-S. ³¹¹

De manière intéressante, un criblage GeCKO récent dans une lignée de cancer gastro-intestinal (GIST) a été effectué afin de découvrir des gènes de résistance à l'imatinib. ³¹³ Parmi les gènes candidats, TP53 et SOCS6 étaient les cibles les plus intéressantes grâce à leurs implications respectives dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, et la régulation des voies de prolifération JAK et PI3K/mTOR.

Objectif

La caractérisation des tumeurs malignes et la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux sont essentielles pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. La LMC est une maladie myéloproliférative chronique à plusieurs phases qui peut servir de modèle d'étude pour un grand nombre de cancers différents. La caractérisation de l'activité de la protéine de fusion BCR-ABL1 ainsi que son inhibition par l'imatinib ont véritablement révolutionné le monde de la recherche en oncologie. Effectivement, les chercheurs et médecins commençaient réellement à comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine du développement tumoral et arrivaient à générer des agents thérapeutiques spécifiques pour les bloquer. Malheureusement, pour certains patients, le traitement cesse d'avoir des résultats optimaux à cause de formes de résistance aux thérapies.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'effectuer un criblage génome entier avec la technologie CRISPR-Cas9 afin de découvrir des gènes et des voies de signalisation qui pourraient être impliqués dans la résistance au traitement par inhibiteur de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique. L'expérience de criblage génétique a été conçue pour découvrir des formes de résistances indépendantes de BCR-ABL1. En effet, la découverte de gènes impliqués dans ce type de résistance pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes de réponse cellulaire après inhibition de BCR-ABL1 par l'imatinib.

Par exemple, la résistance pourrait directement affecter l'importation de l'imatinib dans la cellule. Si un transporteur crucial est inactivé, l'agent thérapeutique ne pourrait pas entrer dans la cellule pour trouver sa cible. Nous avons détaillé certaines formes de résistances connues dans l'introduction et le dérèglement de l'expression de canaux membranaires qui peuvent causer la résistance. La résistance pourrait également affecter le phénomène « d'addiction oncogénique ». En effet, si un deuxième oncogène est activé, la cellule ne dépend plus uniquement de l'activité de BCR-ABL1 afin de maintenir une prolifération anarchique et son inhibition aurait moins d'effet.

La découverte éventuelle de gènes après le criblage génétique pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes de résistance à l'imatinib indépendante de BCR-ABL1. Cette avancée trouverait sa place au sein des recherches actuelles autour de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique car de nos jours, peu de laboratoires effectuent des criblages pangénomiques pour découvrir des gènes de sensibilité à l'imatinib.

Matériel et Méthodes

Réactifs

L'imatinib mesylate (imatinib, Euromedex), l'ABT-263 (navitoclax, Abbot) et l'inhibiteur de MEK1/2 (pimasertib, Merck Serono) proviennent de Selleck Chemicals LLC. La puromycine, le G418 et la doxycycline proviennent de chez Sigma Aldrich. L'annexine V-APC et l'iodure de propidium ont été fournis par BioLegend (Ozyme).

Culture Cellulaire

Les lignées cellulaires modèles de la LMC, K562 (ATCC #CCL-243) et LAMA-84 (ATCC #CRL-3347), proviennent de DSMZ et ont été utilisées à faible passage. Les cellules ont été incubées dans un milieu RPMI 1640 (ThermoFisher), 10% sérum de veau foetal (SVF, Eurobio), 100 UI/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine à 37°C dans un incubateur humidifié à 5% CO₂. Les cellules ont été diluées tous les 2-3 jours afin de maintenir une croissance logarithmique entre 2.10⁵ et 1.10⁶ cellules/mL.

La génération d'une lignée cellulaire doxycycline inducible SpCas9

Le vecteur contenant la SpCas9 sous l'expression d'un promoteur Tet-On (pCW-Cas9) (Addgene #50661) a été modifié pour remplacer le gène de résistance à la puromycine par celui de la résistance à la blasticidine. Les vecteurs ont été amplifiés et empaquetés dans des lentivirus. Les cellules K562 et LAMA-84 ont été transduites à une MOI (multiplicity of infection) de 1. Les cellules ont été ensuite incubées dans un milieu contenant 10 mg/mL de blasticidine pendant 7 jours. Le pool de cellules a été sous cloné dans du milieu méthylcellulose (Stemcell) à une densité de 200 cellules/mL. Les clones individuels ont été repiqués après 10 jours de culture et transférés dans des puits de plaque 96 puits. Après 7 jours supplémentaires de culture, les clones cellulaires (doxy-Cas9) ont été transférés dans des flasques et une partie des cellules a été cultivée dans un milieu contenant de la doxycycline. L'expression de la Cas9 a été détectée par western blot et l'activité de la Cas9 a été évaluée grâce à un test de clivage de la GFP.^{242,300} Brièvement, des lignées clonales doxy-Cas9 ont été transduites par un lenti-GFP et sélectionnées par le G418 à 750 µg/mL pendant 5 jours. Les cellules GFP-positives ont ensuite été transduites par un lenti-sgRNA-antiGFP (protospacer sgRNA antiGFP : *GGCCACAAGTTCAGCGTGTC*) et l'expression de la GFP a été suivie sur un cytomètre en flux FACS Canto II (Becton Dickinson). Les cellules, dont la fluorescence de la GFP s'éteignait, montrant une activité correcte de Cas9, ont été congelées et utilisées pour le criblage GeCKO.

La transduction et le criblage de la librairie GeCKO

Comme préconisé par Shalem *et al.*, les deux sous-banques GeCKO A et B (Addgene #52962) ont été amplifiées avant d'être empaquetées dans des lentivirus.³⁰⁰ Ces deux banques contiennent 122 417 plasmides lentiGuide-puro différents correspondant à l'ensemble des sgRNA de la banque GeCKO.

Les cellules K562-Cas9 positives ont été incubées à 1.10^6 /mL dans 50 mL dans deux flacons de culture cellulaire de 225 cm² (Falcon). Cent cinquante μ L de préparation lentivirale de la librairie GeCKO ont été rajoutés à chaque flacon afin de transduire les cellules à une MOI de 0,3 et à une représentation de 250X par sgRNA, le minimum préconisé. Ce taux faible de multiplicité d'infection est utilisé pour limiter l'intégration de multiples sgRNA différents dans la même cellule. Après une incubation de 24h, les cellules provenant des deux flacons de culture sont mélangées, centrifugées et resuspendues à 2.10^5 cellules/mL (environ 5 flacons 225 cm² à 100 mL de milieu de culture). Puis environ 6 heures après, 35 μ L de puromycine à 10 mg/mL (Cf = 3,5 μ g/mL) et 10 μ L de doxycycline à 10 mg/mL (Cf = 1 μ g/mL) sont ajoutés dans le milieu afin d'une part de sélectionner les cellules ayant intégré le lentiGuide-puro et d'autre part d'induire l'expression de la Cas9. Les cellules sont maintenues dans ce type de milieu pendant 10 jours afin de permettre aux complexes sgRNA-Cas9 de se former et d'effectuer un knock-out de leur cible.

Après 10 jours de culture, 3.10^7 cellules sont collectées et constituent la population contrôle prétraitement et 12.10^7 cellules sont incubées dans un milieu contenant 1 μ M imatinib pendant 4 jours, ce qui permet d'éliminer environ 90-95% des cellules. Après la sélection par imatinib, les cellules survivantes ont été isolées par gradient de centrifugation FICOLL, resuspendues et cultivées pendant 3 jours dans un milieu sans imatinib à 20% SVF pour permettre aux cellules de reprendre leur prolifération après le choc du traitement imatinib. Ces cellules ont été collectées et constituent la population post-traitement. Le criblage a été effectué en duplicat sur les cellules K562.

Extraction d'ADN, amplification des sgRNA et séquençage NGS

L'ADN des populations pre- et post-traitement a été extrait avec l'utilisation de colonnes Genomic 500/G tips (Qiagen). Afin de maintenir la représentativité complète de la banque de sgRNA, 120 μ g minimum d'ADN des populations précédentes doivent être extraits (*Étant donné que la masse d'un génome est d'environ 3,6 pg (\approx un sgRNA par génome), afin de garder une représentabilité de 250X de chaque sgRNA, il faut ($250X \times 122\ 417$ sgRNA différents $\times 3.6$ pg) ≈ 120 μ g).*³⁰⁰

Après l'extraction d'ADN, deux étapes de PCR doivent être réalisées (**Figure 34**) : une première PCR pour amplifier les gRNA puis une deuxième PCR afin de rajouter les adaptateurs nécessaires pour effectuer le séquençage nouvelle-génération (NGS).

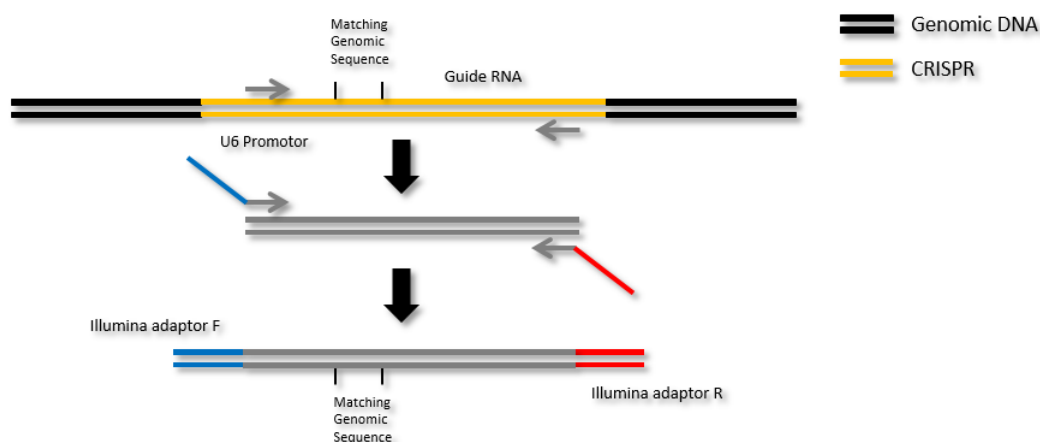


Figure 34 : Amplification des sgRNA pour préparation au séquençage NGS

Afin de séquencer les sgRNA par NGS, il faut effectuer deux PCR successives. La première PCR consiste à amplifier de manière spécifique la séquence des sgRNA de la banque GeCKO. La deuxième PCR permet de rajouter des adaptateurs NGS sur les amplicons pour permettre le séquençage.

Les réactions de PCR pour amplifier les sgRNA de la banque ont été effectuées avec le kit Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent). Cette polymérase a été conçue pour amplifier des fragments ayant un pourcentage de GC élevé ou ayant une structure secondaire compliquée. Etant donné que les amorces utilisées pour ces PCR sont très longues (**Tableau 3**), la Herculase II était la meilleure polymérase pour l'amplification de sgRNA lors d'un crible CRISPR.³⁰⁰

La première PCR (PCR #1) vise à amplifier les gRNA à partir de de 120 µg d'ADN total. Nous devons effectuer 12 PCR de 100 µL en parallèle avec 10µg d'ADN par réaction :

PCR #1

		Volume (µL) pour			
		1		100µl	
Composants				°C	sec
Eau			51	95	120
Tampon 5X	5X		20	95	30
dNTP	25mM		1	58	20
v2Adapteur_F	10µM		2,5	72	30
v2Adapteur_R	10µM		2,5	72	180
Herculase			3	12	inf
ADN	500 ng/µl		20		
Volume total			100		

Après la réaction d'amplification, les 12 réactions de PCR sont mélangées puis purifiées sur billes magnétiques Dynabeads (Thermofisher) et resuspendues dans 40 µL d'H₂O. La deuxième réaction de PCR pour ajouter les adaptateurs pour le séquençage NGS utilise les amplicons de la PCR #1 en tant que matrice. Pour la deuxième PCR (PCR #2), il y a 12 couples d'amorces différentes (**Tableau 3**) avec des « stagger » de tailles différentes, pour donner de la variabilité dans l'ordre de la lecture des nucléotides lors du NGS.

PCR #2

		Volume (µL) pour			
		1		50µl	
Composants				°C	sec
Eau			35,5	98	180
Tampon 5X	5X		10	98	10
dNTP	25mM		0,5	60	15
F1-F12	10µM		0,5	72	20
R1-R12	10µM		0,5	72	300
Herculase			0,5	12	inf
PCR #1			2,5		
Volume total			50		

Il est important de choisir des couples d'amorces différentes (ex : F01-R01, F02-R02...) pour chaque condition du criblage. Nous avons quatre conditions (pré-traitement x2, post-traitement x2) donc nous avons utilisé 3 couples d'amorces pour chaque condition.

Les échantillons de chaque condition sont ensuite mélangés et purifiés sur gel d'agarose 2% puis séquencés par Sanger afin de vérifier la qualité globale des amplifications par PCR (Annexe 1). Finalement, les amplicons sont dosés par électrophorèse capillaire avec une cassette HS D1000 sur TapeStation (Agilent).

Le séquençage a été effectué sur un MiSeq (Illumina) à la plateforme de génomique fonctionnelle à Bordeaux. Brièvement, les amplicons sont dénaturés à l'aide d'une solution de NaOH, puis mis dans un tampon Illumina pour séquençage. Cet échantillon est ensuite mélangé à de l'ADN contrôle du phage PhiX à 20%, pour générer plus de variabilité dans les séquences et pour s'assurer du bon fonctionnement de l'expérience de séquençage. La concentration finale de nos échantillons sur la puce NGS est de 10 pM.

Tableau 3 : Séquences des amorces pour l'amplification des sgRNA

Forward Illumina primers					
Primer no	Illumina F (P5 & Illumina seq)	Stagger	Barcode F	Priming site	
F01	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	t	AAGTAGAG	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F02	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	at	ACACGATC	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F03	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	gat	CGCGCGGT	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F04	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	cgat	CATGATCG	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F05	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	tcgat	CGTTACCA	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F06	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	atcgat	TCCTTGGT	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F07	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	gatcgat	AACGCATT	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F08	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	cgatcgat	ACAGGTAT	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F09	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	acgatcgat	AGGTAAGG	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	t	AACAATGG	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F11	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	at	ACTGTATC	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
F12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	gat	AGGTCGCA	tcttgtaaaggacgaaacaccg	
Reverse Illumina primers					
Primer no	Illumina P7	Barcode R	Illumina seq R	Stagger	Priming site
R01	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AAGTAGAG	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	t	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R02	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACACGATC	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	at	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R03	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CGCGCGGT	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	gat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R04	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CATGATCG	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	cgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R05	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	CGTTACCA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	tcgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R06	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	TCCTTGGT	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	atcgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R07	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AACGCATT	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	gatcgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R08	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACAGGTAT	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	cgatcgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R09	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGGTAAGG	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	acgatcgat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R10	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AACAATGG	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	t	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R11	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	ACTGTATC	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	at	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
R12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT	AGGTCGCA	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT	gat	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT
Reverse "adaptor" to add R priming site to lentiCRISPRv2					
Primer no	Sequence				
v2Adaptor_F	AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTCCG				
v2Adaptor_R	TCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGTgtggcgatgtgcctctg				

Utilisation d'outils bio-informatiques pour générer un classement des gRNA :

L'analyse des données de NGS a été réalisée grâce à l'utilisation d'outils de bio-informatique. Dans un premier temps, afin de pouvoir utiliser et analyser les fichiers de format fastq, nous utilisons une plateforme publique et gratuite en ligne « Use Galaxy » (<https://usegalaxy.org/>) pour préparer les séquences de sortie (fichiers fastq) du NGS. Après le séquençage, ces documents fastq, de type texte permettant de stocker des séquences nucléotidiques associées à un score qualité, sont convertis en format *sanger*. Les fichiers de chaque population sont ensuite fusionnés et sauvegardés sur un opérateur Apple iOS.

Afin de pouvoir effectuer un classement des sgRNA enrichis dans la population résistante à l'imatinib, les logiciels Cutadapt et MAGeCK ont été utilisés.^{314,315} Cutadapt est un programme qui permet d'éliminer toutes les séquences qui ne correspondent pas aux protospacers sur les fichiers fastq, lorsque MAGeCK classe les gènes selon des scores de significativité (Annexe 2).

Pour le criblage d'identification des voies de résistance à l'imatinib, les gènes ont été classés selon leur score d'enrichissement car il s'agit d'un criblage positif : la population résistante était enrichie en sgRNA qui ciblent des gènes importants pour l'induction de la mort cellulaire après traitement par imatinib. En effet, si ces gènes sont éteints par CRISPR-Cas9, la cellule survit au traitement car elle ne peut pas être éliminée en réponse à l'imatinib.

Le logiciel MAGeCK effectue une classification des gènes selon leur enrichissement en générant des scores de « false discovery rate » (FDR), p-value et « robust rank aggregation » (RRA). De manière générale, un gène est bien classé si la majorité des 6 sgRNAs qui le ciblent sont enrichis dans la population résistante. En effet, si uniquement 1 sgRNA sur 6 est fortement enrichi, le phénotype observé est peut être erroné en raison d'un potentiel effet off-target affectant la résistance, d'une amplification trop importante du sgRNA lors des PCR ou d'une intégration de plusieurs sgRNA dans la même cellule résistante. C'est pour cela que pour la majorité des gènes hautement classés, au moins 50% des sgRNAs sont enrichis. Pour résumer, MAGeCK prend en compte le classement individuel de chaque sgRNA pour calculer par RRA les gènes qui sont positivement enrichis dans l'expérience de criblage. Les taux d'erreurs « faux positifs » sont ensuite calculés à partir des p-values avec la procédure statistique de Benjamini-Hochberg.^{314,316}

Le clonage individuel de sgRNA

La création de lignées cellulaires ayant un seul gène éteint a été effectuée par CRISPR-Cas9 individuel. Les séquences des protospacers ont été clonées dans le vecteur lentiGuide-Puro de Addgene (#52963).³⁰⁰ Pour la validation du criblage, les gRNA fortement enrichis des 8 meilleurs gènes de la classification MAGeCK ont été utilisés. Pour effectuer le knock-out de SPRED2, d'autres sgRNA ont été dessinés grâce au logiciel ChopChopV2.³¹⁷ Brièvement, les amorces d'ADN simple brin sens et anti-sens (Eurogentec), ont été hybridées et phosphorylées sur leur extrémité 5' par une T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs). Le produit double brin résultant possède des extrémités 5' cohésives qui permettent une hybridation correcte dans le vecteur lentiGuide-Puro digéré par BsmBI (Thermo Fisher). La ligation des deux produits a été effectuée par la Quick Ligase (New England Biolabs). Ensuite, les plasmides ont été amplifiés par clonage dans des *Escherichia coli* TOP10 et l'intégration des protospacers a été vérifiée par PCR sur colonies en utilisant comme amorces l'oligonucléotide anti-sens simple brin de chaque protospacer et l'amorce universelle du promoteur U6. Les colonies positives ont été transférées dans 50 mL de milieu LB (lysogeny broth) et incubées à 37°C sur la nuit avec agitation. Les plasmides ont été préparés par midiprep sur des colonnes Nucleobond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) et empaquetés dans des lentivirus. La séquence des amorces est dans la partie résultats, en table supplémentaire de l'article scientifique.

Les cellules K562 Cas9 positives ou LAMA-84 Cas9 positives ont été transduites par des lentivirus contenant les sgRNA. La MOI utilisée pour la validation des meilleurs gènes était la même que celle pour le criblage de la banque GeCKO (MOI = 0,3) sauf pour l'étude de SPRED2, BIM et BAX la MOI était de 1. Les cellules ont été incubées pendant 72h avec 5 µg/mL de puromycine et 1 µg/mL de doxycycline, puis uniquement avec de la doxycycline pendant 10 jours supplémentaires.

La validation de la coupure du complexe CRISPR-Cas9 dans le génome

Un lysat de cellules modifiées par CRISPR-Cas9 a été obtenu grâce au kit Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermofisher) puis a ensuite été utilisé comme matrice pour effectuer une PCR. Les amorces utilisées pour vérifier l'intégrité des sites de coupure potentiels s'hybrident de part et d'autre du site de liaison du sgRNA. Les amplicons ont été séquencés par la méthode de Sanger (GATC) puis analysés à l'aide du logiciel FinchTV. Le pourcentage de cellules modifiées par indel a ensuite été déterminé grâce au programme TIDE : Tracking of Indels by Decomposition (Desktop Genetics) (Annexe 3).³¹⁸

Analyses fonctionnelles de réseaux protéiques

L'analyse d'enrichissement d'ensembles de gènes (GSEA) a été effectuée sur la plateforme en ligne GenePattern du Broad Institute en utilisant le module « GSEAPreranked ». ³¹⁹ La liste de gènes classés, utilisée pour cette analyse, était la liste entière du classement MAGeCK du criblage de résistance à l'imatinib. L'analyse fonctionnelle de réseaux protéiques a été effectuée sur STRING-db de l'Institut Suisse de Bio-informatique (<https://string-db.org/>). La liste de gènes utilisée comportait les 158 meilleurs gènes du classement MAGeCK et les points déconnectés étaient éliminés de la figure.

L'analyse de la prolifération cellulaire

Les cellules ont été incubées dans des plaques 96 puits à 1.10^4 cellules par puits (100 μ L) dans du milieu sans ou avec 0,5 μ M imatinib pendant 96h. À chaque point, 20 μ L de solution CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) ont été ajoutés à chaque puits de culture et incubés à 37 °C pendant 3h. L'absorbance a été mesurée à 490nm avec un lecteur de plaques iMark (Biorad).

La caractérisation de l'apoptose

Les cellules ont été incubées dans des plaques 24 puits avec différentes drogues, seules ou en combinaison avec 0,5 μ M d'imatinib, 1 μ M de navitoclax (ABT-263), 10 μ M de pimasertib, ou sans traitement. Les cellules LAMA-84 ont été incubées pendant 24h et les cellules K562 ont été incubées pendant 48h. Les cellules ont été ensuite centrifugées et le milieu a été remplacé par un tampon annexine (HEPES 0,01 M, NaCl 0,14 M, pH 7,4) en présence d'annexine V-APC (BioLegend) à 5 μ L/mL et d'iodure de propidium (BioLegend) à 50 μ g/mL. Les cellules ont été incubées à température ambiante pendant 15 minutes puis analysées par cytométrie sur un Accuri C6 Plus (BD Biosciences). L'apoptose induite a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Apoptose induite (\%)} = \frac{((\% \text{ apoptose cellules traitées} - \% \text{ apoptose cellules non-traitées}) \times 100)}{(100 - \% \text{ apoptose cellules non-traitées})}$$

Western blot

Après électrophorèse sur gel SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (Biorad). Les membranes ont été saturées dans du lait en poudre écrémé à 5%, puis incubées avec les anticorps primaires : souris anti-Cas9 (EpiGentek), chèvre anti-HSP60 (Santa Cruz) et lapin anti-BIM (Sigma Aldrich). Les anticorps ont été utilisés à une dilution de 1/1000. Après hybridation

des anticorps secondaires, l'activité peroxydase a été détectée grâce à un kit ECL Western Lighting Plus (Perkin Elmer).

Analyses de transcrits d'ARNm

L'ARN a été extrait des cellules grâce à des colonnes Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel) et l'ADNc a été généré avec le kit de synthèse d'ADNc Transcriptor First Strand (Roche). Les réactions de RT-qPCR ont été réalisées avec du Brilliant III SYBR Green Mastermix (Agilent) sur un thermocycleur CFX Connect (Biorad) et analysées grâce au logiciel CFX Maestro (Biorad). Le niveau des transcrits a été normalisé par rapport à l'expression du gène ménage *GUSB*.

Analyses statistiques

Chaque expérience réalisée après le criblage CRISPR a été renouvelée 3 fois et les résultats présentés correspondent à la moyenne des résultats +/- l'écart type. Un test de Student pour les valeurs appariées a été utilisé pour l'analyse des données. Les graphiques et analyses statistiques ont été produites sur GraphPad Prism 5.

Résultats

A) Article de type « perspective » publié dans *Hematological Oncology*, 2016

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la découverte de nouveaux mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance à l'imatinib par criblage génétique par la technologie CRISPR-Cas9. Le but de ce travail était de découvrir des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib indépendante de BCR-ABL1 qui pourraient agir de manière synergique avec BCR-ABL1 pour faciliter la cancérogenèse et la résistance au traitement.

Cependant, la résistance indépendante de BCR-ABL1 n'est pas l'unique forme de résistance étudiée actuellement. De multiples équipes dans le monde emploient des techniques différentes pour étudier toutes les différentes formes de résistance au traitement dans la LMC. Par exemple, en Italie, Soverini *et al.*, étudient de manière extensive la résistance dépendante de BCR-ABL1 en effectuant des séquençages nouvelle génération du domaine kinase de *ABL1* chez les patients LMC.^{101,213} En effet, avec cette technique de séquençage plus efficace que le séquençage Sanger, le diagnostic de mutations dans le domaine kinase d'*ABL1* chez des patients résistant à l'imatinib est devenu plus sensible (de 24% pour le séquençage Sanger à 33% pour le NGS). De nombreuses équipes cherchent également à mieux caractériser les cellules souches leucémiques afin de pouvoir spécifiquement les éliminer.^{236,239,240,320} La découverte de nouveaux marqueurs spécifiques de la cellule souche leucémique tels que CD33, CD52 ou encore CD93, pourrait aider à mieux caractériser ces cellules. Ces protéines pourraient même devenir la cible de nouveaux agents thérapeutiques pour spécifiquement bloquer la prolifération de la cellule souche leucémique.²⁴¹

C'est pour cela qu'en 2016, nous avons organisé un colloque européen sur la thématique de résistance au traitement dans le cancer et dans la leucémie myéloïde chronique. Suite à cette journée, nous avons publié un article de type « perspective » dans le journal *Hematological Oncology* où nous nous sommes posé la question : Quels sont les défis en 2016 par rapport à la résistance au traitement dans la leucémie myéloïde chronique et dans le cancer ?²⁴¹ Nous avons abordé les différents types de résistance et les moyens employés pour les diagnostiquer et les caractériser grâce au séquençage nouvelle génération ou à la cytométrie en flux. Nous avons également décrit les travaux qui étaient actuellement en cours afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cellules souches, telles que *CITED2* et *HIF2 α* et dans les cellules différenciées, en effectuant un criblage génétique par technologie CRISPR-Cas9.

PERSPECTIVE

What are the challenges in 2016 regarding resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and cancer?

Matthieu Lewis¹ | Mhairi Copland² | Simona Soverini³ | Irina Sadovnik⁴ | Aurélie Bedel⁵ | Stéphane Prost⁷ | Antoine Italiano⁶ | François-Xavier Mahon^{1*}

¹Laboratory of Mammary and Leukemic Oncogenesis: Genetic Diversity and Resistance to Treatment, ACTION, INSERM U1218, University of Bordeaux, Bordeaux, Gironde, France

²Institute of Cancer Sciences, University of Glasgow, Glasgow, Glasgow City Council, UK

³Department of Experimental, Diagnostic and Specialty Medicine, Haematology/Oncology "L. and A. Seràgnoli", University of Bologna, Bologna, Emilia-Romagna, Italy

⁴Department of Internal Medicine I, Division of Hematology & Hemostaseology, Medical University of Vienna, Vienna, Vienna, Austria

⁵Biothérapie de Maladies Génétiques et Cancer, INSERM U1035, Université de Bordeaux, Bordeaux, Gironde, France

⁶Department of Medical Oncology, Bergonié Institute, Bordeaux, Gironde, France

⁷CEA, Institute of Emerging Diseases and Innovative Therapies (IMETI), F-92265 Fontenay-aux-Roses, Île de France, France

Correspondence

François-Xavier Mahon, Laboratory of Mammary and Leukemic Oncogenesis: Genetic Diversity and Resistance to Treatment, ACTION INSERM U1218 University of Bergonie institute, Bordeaux, Bordeaux, France.
Email: francois-xavier.mahon@u-bordeaux.fr

Abstract

In the past decade, the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) has undergone a drastic evolution. The discovery and success of imatinib and second-generation tyrosine kinase inhibitors have substantially increased the outcome for CML patients. The next step in medical and scientific research is to better understand the malignancy so as to eventually find a cure to eliminate all leukemic cells from patients. One of the key issues is about the resistance of the leukemic stem cells to tyrosine kinase inhibitors. Here, we briefly describe our current studies on CML resistance, and leukemic stem cell modeling and characterization.

KEYWORDS

chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, resistance to treatment, leukemic stem cells

1 | INTRODUCTION

The 5-year survival rate of chronic myeloid leukemia (CML) patients doubled after the introduction of imatinib in 1998. Since then, it has been the preferred first-line therapy for patients with newly diagnosed CML. For the majority of cases, imatinib can increase overall survival quite significantly, but approximately a fifth of patients fail imatinib treatment.^{1,2} Subsequently, the rationally designed second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKIs) nilotinib³ and dasatinib⁴ can induce complete cytogenetic responses and major molecular remission, respectively, in 50% and 20% to 30% of imatinib-resistant patients.³ Unfortunately, none of these TKIs successfully inhibit clones with the

aggressive T315I mutation. Laboratories are working to further characterize this mutation to synthesize an efficient drug, and more recently, the third-generation TKI ponatinib has been shown to treat patients with T315I⁺ CML.⁵ Regrettably, this drug seems to cause serious adverse effects, such as vascular occlusion, heart failure, and hepatotoxicity.⁶ In fact, no compound is completely innocuous: when evaluating drug toxicity, both nilotinib and dasatinib also seem to have more harmful side effects compared with imatinib.^{7,8} In general, the more TKI efficiently blocks BCR-ABL1 in its many forms, the more it is toxic for the host patient.⁹ When choosing which TKI to administer to a patient, clinicians need to carefully decide if the benefits of such a drug outweigh the possible significant side effects.

Once patients are treated with TKIs, clinicians can evaluate the effectiveness of the drug by determining whether or not the patient has been “cured.” Many doctors around the world are stopping TKI treatment in responder patients with sustained deep molecular response to evaluate the percentage of patients that relapse. Encouragingly, a French trial entitled “STIM” (STop IMatinib) enrolling 100 patients showed that 40% of the patients that were taken off imatinib treatment seemed to be cured: no signs of BCR-ABL1 transcripts were found in their blood for a duration of at least 60 months.^{10,11} As hoped, the remaining 60% of patients remained responsive to retreatment of imatinib. Similar simultaneous studies in Australia and Japan showed comparable results and additionally showed that no molecular relapses occurred beyond 27 months of imatinib cessation.^{12,13} Further studies need to be performed to characterize the subset of patients that do relapse. The principle hypothesis explaining this phenomenon is that TKI-resistant leukemic stem cells (LSCs) persist and give rise to the eventual relapse.¹⁴ Understanding why patients relapse after treatment or fail initial TKI treatment is primordial so as to win the battle against CML. This article will discuss mechanisms of resistance to TKIs along with a review of our current ongoing works in our laboratories. Our research is focused on not only TKI resistance but also LSC characterization, modeling, and targeting.

2 | BETTER UNDERSTANDING OF TKI RESISTANCE IN CML

The relatively new paradigm of targeted cancer drug therapies has dramatically affected the practice of medical oncology. Recently, the development of many kinase inhibitors that target oncogenic forms of multiple proteins (EGFR, HER2, BCR-ABL1, ALK, JAK2, and BRAF) shows clinical activity against these mutated alleles in a subset of patients. While the enthusiasm for personalized targeted cancer therapy is rapidly growing, there is also the sobering realization that the clinical benefit of these “smart” therapies may be limited by relatively rapid acquisition of drug resistance.^{15–19}

The first reports of imatinib-resistant patients date back to 2001.²⁰ Imatinib was still undergoing phase I-II trials when C. Sawyers' group reported that BCR-ABL1 could escape from inhibition by changing the shape of imatinib binding pocket.²⁰ It was the very first time we heard about the T315I mutation, and many more mutations had yet to be uncovered. Today, we know that the acquisition of point mutations in the BCR-ABL1 gene is observed (with conventional Sanger sequencing, the current gold standard for diagnostic mutation screening) in 24% and 10% of patients with failure and warning to first-line TKI therapy, and in 37% and 15% of patients with failure and warning to second-line TKI therapy, respectively.

The recent application of next-generation sequencing technologies to the diagnostic setting has contributed additional knowledge on the role of BCR-ABL1 mutations in TKI resistance. Next-generation sequencing may increase sensitivity of mutation detection to 1%, and patients positive for mutations have been recently shown to increase to 33% and 14% in first-line failures and warnings and to 51% and 31% in second-line failures and warnings, respectively. In addition, next-generation sequencing enables straightforward identification of

compound mutants (harboring 2 or more mutations in the same BCR-ABL1 molecule). Such mutants, which are most often the result of failure of multiple lines of therapy, are particularly difficult to defeat—and whether ponatinib may be able to overcome all of them or not is still a matter of debate.²¹

Furthermore, other mechanisms have been found, or hypothesized, to play a role in resistance. The discovery and study of these additional genes can be accomplished by performing genetic screens on CML cell lines. Genome-wide loss-of-function screens have produced a myriad of information concerning various model systems. Previous studies using short hairpin RNA banks have uncovered key effectors of TKI resistance *in vitro* and *in vivo*. These works show the importance of nucleocytoplasmic transporters (RAN and XPO1) and cell signaling pathways (MEK/ERK) in TKI resistance.^{22,23} However, the use of short hairpin RNA banks for genetic screens is becoming obsolete because of suboptimal protein depletion and nonreliable off-target effects. Finding new, more efficient methods to perform genetic screens in mammalian cells has been the goal for certain teams around the world, and in 2014, the Genome-scale CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short \(\backslash\)Palindromic Repeats) Knock-Out (GeCKO) bank was released.²⁴ The CRISPR system is made up of 2 components: a Cas9 nuclease and a single guide (sg)RNA.²⁵ The sgRNA hybridizes to a complementary genomic DNA sequence, allowing the Cas9 to perform a double-stranded DNA break at a specific genetic locus. When the sgRNA targets coding regions of genes, loss-of-function alleles can be created because of frame shift indel mutations, which occur as a result of imprecise nonhomologous end joining (NHEJ).²⁶ As sgRNAs are the source of Cas9 targeting specificity, an oligonucleotide library was synthesized to target most coding genes in the human genome. The GeCKO bank carries over 100 000 different sgRNA sequences that target approximately 20 000 genes. Thanks to this novel screening technique, we will attempt to discover numerous novel genes that are responsible for BCR-ABL1 independent resistance in CML cells.

Finally, it is important to mention the pathways contributing to stem cell persistence. Stem cells are not dependent on BCR-ABL TK activity for their survival and, hence, are (generally) not eliminated by TKIs. As such, they represent a dangerous reservoir from which relapse may originate as well as a hurdle on the way to successful treatment discontinuation.

3 | CHARACTERIZING AND MODELING LSCS

The introduction of BCR-ABL TKIs has revolutionized the treatment of CML. However, although the majority of patients with CML obtain durable complete cytogenetic and major molecular responses, there is low-level disease persistence postulated to be due to a population of TKI-insensitive LSC. The current research is seeking novel targets and more effective antileukemic and anti-LSC drugs. Leukemic stem cells are believed to reside within a CD34⁺/CD38⁻ fraction of the clone but can also be found in other fractions such as CD34⁺/CD38⁺ or even CD34⁻. Because of their disease-initiating properties, LSCs have been recognized as a major target of therapy. Therefore, it is crucial to better characterize these cells to further

define expression profiles and markers that are specifically expressed on LSCs.

Work has been accomplished to establish a more comprehensive phenotype of LSC in CML by applying gene array, quantitative polymerase chain reaction, and protein quantification. In parallel, 2 teams characterized CML LSC expression profiles to better target these TKI-resistant cells using specific antibodies. First, CML LSCs are characterized by the expression of an almost invariable aberration profile: CD25⁺/CD26⁺/IL-1RAP⁺. Additional markers and targets were equally detected on these cells such as CD33 or CD52. Both of these surface antigens are overexpressed in LSC compared with normal hematopoietic stem cells; therefore, targeting these markers with Mylotarg (anti-CD33 antibody) and Alemtuzumab (anti-CD52 antibody) may be an interesting therapeutic approach.²⁷

Other CML LSC markers are interesting to study as they may also provide a useful basis for the development of LSC-eradicating drugs in the future. A second study found 1217 genes to be significantly deregulated between normal hematopoietic stem cells and CP-CML LSCs. Of particular interest, CD93 gene expression is highly upregulated in CP-CML LSCs. CD93 is a C-type lectin-like domain containing glycoprotein with roles in cell adhesion and leukocyte migration and has previously been shown to be upregulated in a proportion of AML patients.²⁸ Protein expression of CD93 was equally shown to be upregulated in CP-CML patient peripheral blood, and 100% of these lin-CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD93⁺ CML cells were BCR-ABL positive. Subsequently, we identified CD93 as a potential novel biomarker of CML LSC, which may also be helpful in assessing minimal residual disease at the stem cell level. Further studies are ongoing to assess the therapeutic potential of inhibiting CD93 in CML LSC.

The next step in successfully studying CML LSCs would be to establish an *in vitro* cell model to study the disorder, without having the extract CD34⁺/CD38⁻ cells from patients before each manipulation. Understanding the mechanisms leading to TKI resistance of the LSCs in CML is a critical issue to eradicate them but is limited by availability of cells from affected patients. We generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from CD34⁺ blood cells isolated from CML patients (CML-iPSCs) as a model for studying LSCs survival in the presence of TKI and the mechanisms supporting TKI resistance. Interestingly, CML-iPSCs resist TKI treatment and are not oncogene addicted, and after hematopoietic differentiation of CML-iPSC clones, cells partially recovered their TKI sensitivity. This result confirms that stemness level is a crucial parameter for TKI sensitivity. Notably, different CML-iPSCs obtained from the same CML patient were highly heterogeneous, in terms of BCR-ABL1 level, proliferation, and hematopoietic differentiation. There are now solid arguments to think that CD34⁺ cells derived from CML-iPSC mimic CML LSCs in terms of proliferation, ability to grow without cytokines, adhesion, and TKI sensitivity. Thus, clones of CML-iPSCs are powerful models to decipher all the mechanisms leading to LSC survival following TKI therapy and are a promising tool for testing new therapeutic agents. Currently, we are analyzing TKI effect on CML-iPSC, our model of non-oncogene-addicted LSC. Signaling pathway implicated are secondarily confirmed in primary CML LSCs. Induced pluripotent stem cells

offer an opportunity to develop disease-specific models by reprogramming malignant cells.

4 | FUTURE POSSIBLE TREATMENTS FOR CML

In general, cancer is maintained by proliferating cells and a small fraction of quiescent stem cells that resist most anticancer drugs. Relapse after treatment occurs as the eradication of cancer stem cells is ineffective for the majority of neoplasms. As previously discussed, imatinib and other TKIs effectively improve patient survival, but complete molecular remission (CMR) is reached only by a fraction CML patients. Relapse after TKI treatment is mainly caused by the survival of resistant CD34⁺CD38⁻ immature progenitors. These cells become a quasi-infinite source for newly differentiated Ph⁺CD34⁺CD38⁺ leukemic myeloid cells. Finding drugs that target and/or eradicate LSCs would greatly increase the probability of curing CML completely.

Discovering new compounds that can inhibit LSCs is crucial to curing the disease. We have equally shown that the combination of 2 drugs, imatinib with peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) agonists, glitazones, can have an effect on LSC persistence by decreasing the expression of STAT5 and its downstream targets HIF2 α and CITED2 in CML LSCs. In this study, the authors suggested that LSCs are dependent on a PPAR γ -STAT5-HIF2 α -CITED2 pathway by being addicted to the expression of STAT5.²⁹ STAT5 expression is essential for the activation of HIF2 α and CITED2, key genes in hematopoietic stem cell "stemness." Thus, inhibiting STAT5 phosphorylation by TKIs and STAT5 transcription by PPAR γ agonists may prove to be a major step in curing CML by targeting LSCs.

Clinical trials were performed on 3 patients in chronic residual disease despite continuous imatinib treatment. All 3 patients were temporarily given pioglitazone (along with imatinib), and all achieved sustained CMR up to 4.7 years after pioglitazone withdrawal. One patient equally decided to stop imatinib for the last 6 months of the previously mentioned observation period and has remained in CMR without any further treatment. The combination of these 2 drugs may prove to be a major step in the discovery of an eventual cure for CML. For other types of cancer, the eradication of all proliferating tumor cells and tumor stem cells may one day be a possibility by using the same approach by combining multiple drugs to target and eradicate each cell subpopulation.

5 | CONCLUSION

Chronic myeloid leukemia is the archetype model of targeted therapy, and since the discovery of the Philadelphia chromosome, this disease has always served as a reference for other leukemias and solid tumors. The key to further progress in the eradication of the cancer stem cells will now depend on the understanding of both the oncogenic addiction and the differentiation state of the cells. That is the challenge for the future if we want to optimize the use of TKIs and combine them with other drugs to obtain complete eradication of LSC in CML for instance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interest.

REFERENCES

- Druker BJ *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006;355:2408–2417.
- Cortes J, Hochhaus A, Hughes T, Kantarjian H. Front-line and salvage therapies with tyrosine kinase inhibitors and other treatments in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011;29:524–531.
- Hochhaus A *et al.* Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood.* 2007;109:2303–2309.
- Cai J *et al.* Design and synthesis of novel 4-benzothiazole amino quinazolines Dasatinib derivatives as potential anti-tumor agents. *Eur J Med Chem.* 2013;63:702–712.
- Hoy SM. Ponatinib: a review of its use in adults with chronic myeloid leukaemia or Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs.* 2014;74:793–806.
- Sanford DS *et al.* The role of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;15:365–373.
- Miura M. Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biol Pharm Bull.* 2015;38:645–654.
- Yilmaz M *et al.* Estimated glomerular filtration rate changes in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Cancer.* 2015;121:3894–3904.
- Wei G, Rafiyath S, Liu D. First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 2010;3:47.
- Mahon F-X *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:1029–1035.
- Mahon F-X. Discontinuation of tyrosine kinase therapy in CML. *Ann Hematol.* 2015;94(Suppl 2):S187–S193.
- Ross DM *et al.* Patients with chronic myeloid leukemia who maintain a complete molecular response after stopping imatinib treatment have evidence of persistent leukemia by DNA PCR. *Leukemia.* 2010;24:1719–1724.
- Ross DM *et al.* Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood.* 2013;122:515–522.
- Chomel J-C, Turhan AG. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Oncogene.* 2011;2:713–727.
- Cheng H, Nair SK, Murray BW. Recent progress on third generation covalent EGFR inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26:1861–1868.
- Martin V, Cappuzzo F, Mazzucchelli L, Frattini M. HER2 in solid tumors: more than 10 years under the microscope; where are we now? *Future Oncol Lond Engl.* 2014;10:1469–1486.
- Yau NKM *et al.* A Pan-Cancer review of ALK mutations: implications for carcinogenesis and therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2015;15:327–336.
- Silvennoinen O, Hubbard SR. Molecular insights into regulation of JAK2 in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2015;125:3388–3392.
- Kim SY *et al.* Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72:1036–46, e2.
- Gorre ME *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293:876–880.
- Parker WT *et al.* The impact of multiple low-level BCR-ABL1 mutations on response to ponatinib. *Blood.* 2016;127:1870–1880.
- Khorashad JS *et al.* shRNA library screening identifies nucleocytoplasmic transport as a mediator of BCR-ABL1 kinase-independent resistance. *Blood.* 2015;125:1772–1781.
- Ma L *et al.* A therapeutically targetable mechanism of BCR-ABL-independent imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Sci Transl Med.* 2014;6:252–121, ra.
- Shalem O *et al.* Genome-Scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014;343:84–87.
- Knight SC *et al.* Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science.* 2015;350:823–826.
- Yang L, Mali P, Kim-Kiselak C, Church G. CRISPR-Cas-mediated targeted genome editing in human cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2014;1114:245–267.
- Sadovnik I *et al.* Identification of CD25 as STAT5-dependent growth regulator of leukemic stem cells in Ph + CML. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2016;22:2051–2061.
- Saito Y *et al.* Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med.* 2010;2:17–19, ra.
- Prost S *et al.* Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature.* 2015;525:380–383.

How to cite this article: Lewis, M., Copland, M., Soverini, S., Sadovnik, I., Bedel, A., Prost, S., Italiano, A., and Mahon, F.-X. (2016), What are the challenges in 2016 regarding resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and cancer?, *Hematol Oncol*, doi: 10.1002/hon.2329

B) Article scientifique envoyé pour publication dans *Leukemia*, 2019

Nous avons utilisé la banque de gRNA (GeCKO) pour effectuer un criblage génome entier dans la lignée cellulaire K562 afin de découvrir des gènes et des voies de signalisation qui sont impliqués dans la résistance au traitement par imatinib. Les travaux effectués au cours de cette étude ont démontré l'importance *in vitro* d'un certain nombre de gènes vis-à-vis de la réponse au traitement. En effet, grâce à la technologie CRISPR-Cas9, nous avons pu spécifiquement cibler des gènes pour générer les lignées cellulaires knock-out (KO) résistantes à l'imatinib. Des lignées cellulaires KO pour les 8 gènes les mieux classés (*KLF1*, *BAP1*, *BAX*, *UBE2M*, *MED24*, *EIF2AK1*, *BCL2L11* (*BIM*) et *SPRED2*) ont été générées et nous avons étudié leur réponse au traitement. En effet, ces lignées résistent à l'imatinib, ce qui renforce la technique de criblage CRISPR-Cas9. De plus, certains de ces gènes ont déjà été associés à la résistance au traitement ou à la progression de la LMC *in vitro* ou *in vivo*.^{72,231,321,322} Des analyses *in silico* ont également montré l'importance de plusieurs autres mécanismes cellulaires vis-à-vis de la réponse au traitement par imatinib. Particulièrement, des gRNA ciblant certaines sous-unités du complexe Mediator étaient fortement enrichis dans le crible, ce qui suggère un rôle capital de ce complexe dans la réponse au traitement. De plus, ce criblage a établi un rôle potentiel de plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la maturation d'ARNm ou dans l'ubiquitinylation de protéines. Ces mécanismes pourraient aussi être fortement liés à la réponse au traitement.

En deuxième partie de l'article, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'apoptose et à l'activation de la voie des MAPK. En effet, deux facteurs pro-apoptotiques (*BAX* et *BIM*) ainsi qu'un répresseur de la voie des MAPK, *SPRED2*, figuraient parmi les 8 meilleurs gènes du criblage. À partir de lignées KO pour ces gènes, nous avons cherché à instaurer de nouveau une sensibilité au traitement. Pour ce faire, nous avons effectué des combinaisons d'agents thérapeutiques pour spécifiquement activer l'apoptose, grâce à l'utilisation de BH3-mimétiques, ou pour inhiber la voie des MAPK, avec des inhibiteurs de MEK1/2. De manière intéressante, la combinaison d'imatinib avec le BH3-mimétique dans la lignée *BIM* KO restaure une sensibilité au traitement qui est identique à celle d'une lignée contrôle. Par contre, cette même combinaison n'a aucun effet sur les cellules *BAX* KO. Ce gène semble être essentiel pour l'induction de l'apoptose intrinsèque suite au choc oncogénique par imatinib. De la même façon, la combinaison d'imatinib avec l'inhibiteur de MEK1/2 dans les lignées *SPRED2* KO restaure également la sensibilité au traitement.

Grâce à un criblage génome entier par CRISPR-Cas9, nous avons découvert certains gènes qui semblent être importants pour sensibiliser les cellules BCR-ABL1 positives à l'imatinib. En effet, nous avons démontré l'efficacité d'une thérapie combinatoire en ciblant ces facteurs de manière concomitante avec l'inhibition de BCR-ABL1 par l'imatinib. Nous pouvons également imaginer d'autres types de combinaison de traitements efficaces contre la cellule de LMC en ciblant d'autres facteurs enrichis dans ce crible. Une inhibition de mTOR, par exemple, pourrait également augmenter la sensibilité des cellules au traitement car deux répresseurs puissants de cette protéine, TSC1 et TSC2, étaient également hautement classés dans le criblage.

Le traitement du cancer évolue dans le temps, de la simple chirurgie aux programmes d'intelligence artificielle de prédiction pour trouver les meilleurs traitements combinatoires. Des études comme celle-ci, pourraient aider à découvrir des gènes de sensibilisation aux traitements anticancéreux pour ensuite ouvrir la porte à la médecine personnalisée et à l'oncologie de précision.

A Genome-Scale CRISPR Knock-out Screen in Chronic Myeloid Leukemia Identifies Novel Drug Resistance Mechanisms along with Intrinsic Apoptosis and MAPK Signalling.

Matthieu Lewis¹, Valérie Prouzet-Mauléon¹, Florence Lichou¹, Elodie Richard¹, Bruno Cardinaud¹, Richard Iggo¹, Béatrice Turcq¹, François-Xavier Mahon¹

¹ Laboratory of Mammary and Leukemic Oncogenesis : Genetic Diversity and Resistance to Treatment, ACTION Inserm U1218, University of Bordeaux, Bergonié Institute, Cancer Research Centre Bordeaux, France.

Running title: CRISPR screen identifies imatinib resistance genes *in vitro*

We utilized a genome-scale CRISPR library to discover genes and pathways that could potentially be the target of novel therapeutic strategies for overcoming resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia *in vitro*.

The authors declare no potential conflicts of interest.

Abstract

Understanding resistance mechanisms in cancer cells is of utmost importance for the discovery of novel “druggable” targets. Efficient genetic screening, now even more possible with the convergence of CRISPR-Cas9 gene editing technology, next-generation sequencing and bioinformatics, is an important tool for deciphering novel cellular processes, such as resistance to treatment in cancer. Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterised by the t(9;22) genetic abnormality, which encodes the driver of CML, the BCR-ABL1 fusion protein. Imatinib mesylate, a tyrosine kinase inhibitor, specifically eliminates CML cells by targeting and blocking the kinase activity of this protein, yet, as for all targeted therapies in cancer, resistance to treatment exists. In order to discover alternative BCR-ABL1 independent mechanisms of imatinib resistance, we utilized the genome-scale CRISPR knock-out library GeCKO v2 to screen for imatinib sensitising genes *in vitro* on K562 cells. We revealed genes that seem essential for imatinib induced cell death, such as pro-apoptotic genes (*BIM*, *BAX*) or MAPK inhibitor *SPRED2*. Specifically re-establishing apoptotic capabilities in *BIM* knock-out (KO) cells with BH3-mimetics, or inhibiting MAP-kinase signalling in *SPRED2* KO cells with MEK inhibitors restores sensitivity to imatinib, overcoming resistance phenotypes. In this work, we discovered previously identified pathways (apoptosis, MAP-kinase signalling) and novel pathways that modulate response to imatinib in CML cell lines, such as the implication of the Mediator complex, mRNA processing and protein ubiquitylation. Targeting these specific genetic lesions with combinational therapy can overcome resistance phenotypes and paves the road for the use of precision oncology.

Introduction

Efficient genetic engineering in living mammalian cells has become increasingly accessible with the discovery and the improved understanding of the CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9 system (1). This system includes two components, an endonuclease (Cas9) that performs double stranded breaks in DNA if bound to a single guide (sg)RNA molecule that guides the Cas9 protein to specific 20-nucleotide stretches. These sgRNAs can be designed in silico to target DNA sequences upstream of a protospacer adjacent motif (PAM) – nucleotides “NGG”, for *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9). CRISPR complexes can efficiently perform irreversible gene knock-outs, which have revolutionised the study of multiple pathologies and cellular processes in living mammalian cells (2).

The flexibility of this highly effective tool has been harnessed by laboratories worldwide to design libraries of sgRNAs that can target different elements of the genome, such as protein coding genes, miRNAs or promoter regions (3). As a consequence of the decreasing cost of next-generation sequencing, the availability of numerous different CRISPR libraries and free-to-use bioinformatic programs, CRISPR screening is becoming more and more prevalent (4). Multiple teams have already used such genome-scale CRISPR screening approaches to discover, for example, essential genes in cancer cell lines, regulatory pathways involved in a multitude of cellular processes and genes involved in drug resistance (3,5–8). We focused our work on better understanding the response to treatment in chronic myeloid leukemia (CML).

CML is a myeloproliferative disorder which is identified by the increased and uncontrolled

proliferation of granulocytes (neutrophils, basophils and eosinophils) and myeloid precursors in the bone marrow and blood (9). This type of neoplasm is most commonly characterised by the presence of a Philadelphia chromosome, caused by the genetic translocation t(9;22)(q34;q11). This genetic abnormality juxtaposes two genes (BCR and ABL1), whose fusion codes for the constitutively active tyrosine kinase BCR-ABL1 (10). Targeting this protein with tyrosine kinase inhibitors (TKI) such as imatinib mesylate revolutionised the treatment of this disorder (11). Most patients under treatment have a comparably normal life span (12), however, like for all types of targeted therapies in cancer, resistance to treatment can occur (13). Indeed, approximately 20% of CML patients present resistance or experience relapse to imatinib treatment. Mutations in the kinase domain, overexpression or amplification of the BCR-ABL1 gene account for half of all imatinib resistant types (14,15). These patients can be, for the most part, treated with increased doses of imatinib or second generation TKI such as dasatinib or nilotinib (14).

We focused our work on further understanding the alternative form of imatinib resistance, BCR ABL1 independent resistance, which accounts for the other half of all resistance types (16). For such patients, unknown alternative mutations elsewhere in the genome are hypothesised to be responsible for the non-optimal response to imatinib treatment. Equally, the accumulation of alternative mutations in CML cells may cause the progression of the pathology from a chronic phase to an accelerated phase and eventually a fatal blast crisis (17). Therefore, discovering alternative “druggable” targets is crucial in attempting to propose efficient drug combinations for patients with poor prognosis.

In this study, we used the genome-scale CRISPR knock-out (GeCKO v2) library (3), containing 121 413 unique sgRNAs targeting 20 914 protein coding genes and miRNAs (combination of GeCKO v2 sub-banks A and B), to screen for imatinib resistance in vitro on K562 cells, a BCR-ABL1+ imatinib sensitive cell line for studying CML. We utilised bioinformatic tools (18) to unveil actors in imatinib induced cell death and validated the top hits by individual knock-out and in vitro characterisation. We then targeted two of the identified resistance pathways, intrinsic apoptosis and MAPK signalling, to test for effective drug combinations on imatinib resistant cells. We prove that CRISPR screens can be used to discover novel pathways involved in drug resistance and enhance current knowledge concerning cancer cell pathophysiology and susceptibility of response to targeted treatment.

Materials and Methods

Reagents:

Imatinib mesylate (imatinib, Euromedex), ABT-263 (navitoclax, Abbot) and MEK inhibitor (pimasertib, Merck Serono) were purchased from Selleck Chemicals LLC. Puromycin and doxycycline were purchased from Sigma Aldrich. Annexin V-APC and Propidium Iodide were purchased from BioLegend (Ozyme).

Cell culture:

CML model cell lines K562 (ATCC[®] CCL-243) and LAMA-84 (ATCC[®] CRL-3347) were acquired from DSMZ and used at a low passage. Cells were cultivated in RPMI 1640 medium (ThermoFisher), 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Eurobio), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL

streptomycin in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were passaged every 2-3 days in order to maintain logarithmic growth between 2.10⁵ and 1.10⁶ cells/mL.

Doxycycline-inducible spCas9 clonal cell lines:

A vector containing SpCas9 (3xFLAG) under the Tet-On promoter (pCW-Cas9) was obtained from Addgene (#50661) (5) and engineered in order to replace puromycin resistance with blasticidin resistance. Amplification and lentiviral production was accomplished and cells were transduced at a multiplicity of infection (MOI) = 1. Cells were treated at 10 mg/mL blasticidin for 7 days. Cells were subsequently plated in methylcellulose (Stemcell) at a density of 200 cells/mL. Individual clones were hand-picked after 10 days and plated in 96 well plates with supplemented RPMI medium. After 7 more days, amplified cells were transferred into individual flasks and a subset of each clone underwent doxycycline induction for 72h. Cas9 expression was detected by western blot and Cas9 activity was observed using a GFP/sgRNA-antiGFP cleavage assay (3). Briefly, doxycycline-inducible Cas9 clonal cell populations were transduced by lenti-GFP and selected with G418 (750 µg/mL) for 5 days. GFP+ cells were subsequently transduced by lenti-sgRNA-antiGFP (protospacer for sgRNA antiGFP: GGCCACAAGTTCAGCGTGTC) and GFP expression was monitored by flow-cytometry on a FACS Canto II (Becton Dickinson). Cells that showed correct Cas9 expression and activity were frozen and used for the GeCKO screens.

Genome-scale CRISPR Knock-Out (GeCKO) library:

The Human GeCKO v2 two-plasmid system library was purchased from Addgene (#52962) (3). This two plasmid system contains a lentiCas9-blast plasmid, which we did not use,

and 122 417 different lentiGuide-puro plasmids, each containing a sgRNA. The amplification of these plasmids and lentiviral production was performed following the protocol described by Shalem et al (3).

CRISPR-Cas9 screening procedure:

We then transduced the previously selected K562 Cas9+ cell line with the GeCKO v2 library. The MOI used for the CRISPR library transduction was of 0.3 to limit multiple lentiviral integrations, thus sgRNAs, into the same cell. At the time of infection, each sgRNA was represented $\approx 250X$, which is the minimum recommended coverage. Cells were maintained for ten days in medium containing puromycin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), to select for sgRNA containing cells, and doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), to induce Cas9 expression. This timeframe allows for the knock-out of all of the genes targeted by the GeCKO v2 library sgRNAs. At this time point, 3.107 cells were collected (Pre-IM) and 12.107 cells were incubated with 1 μM imatinib for 4 days. After imatinib challenge, surviving cells were isolated by density gradient centrifugation on FICOLL[®], washed thoroughly, plated without imatinib at 2.105 cells/mL for 3 days and finally collected (Post-IM).

sgRNA amplification and Next Generation Sequencing (NGS):

DNA from both pre- and post-IM populations were extracted using Genomic 500/G tips (Qiagen). In order to amplify all sgRNAs, 12 PCR reactions were performed for each sample using 12 x 10 μg of extracted DNA. Primers used for sgRNA amplification are the same as those from Shalem et al (3). Amplicons were gel extracted, purified and sequenced on a MiSeq (Illumina). Fastq files generated from NGS were trimmed using CutAdapt (19) and enriched sgRNAs in the resistant population (Post-IM) were ranked using the MAGeCK script (18). Briefly,

MAGeCK ranks each sgRNA based on p-values calculated from a negative binomial model, then uses a modified robust ranking aggregation algorithm to identify positively selected genes. These genes are equally classified according to their false discovery rate (FDR), which gives a method of conceptualizing the rate of type I errors in null hypothesis testing when conducting multiple comparisons.

Individual sgRNA cloning:

Individual gene knock-out validation was performed by cloning the top sgRNA from the 8 top genes of the GeCKO screening procedure into lentiGuide-Puro backbones from Addgene (#52963) (3). For the dual CRISPR SPRED2 knock-out, sgRNAs were designed using ChopChopV2 software (20). Briefly, forward and reverse single stranded sgRNA primers (Supplementary Table 1) were purchased from Eurogentec, annealed and phosphorylated on their 5' ends by T4 Polynucleotide Kinase (New England Biolabs). The double stranded product possesses 5' overhangs that permit the correct ligation into BsmBI (New England Biolabs) digested lentiGuide-Puro vectors. Ligation was performed using Quick Ligase (New England Biolabs). Plasmids were subsequently amplified into TOP10[®] Escherichia coli and protospacer integration was verified by PCR using the reverse single stranded sgRNA primer and a universal U6 promoter primer. Positive colonies were transferred into 50 mL of lysogeny broth (LB) and incubated at 37°C overnight. Plasmids were extracted using Nucleobond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel) columns and packaged into lentiviruses.

K562 Cas9+ cells or LAMA-84 Cas9+ cells were transduced by lenti-sgRNA viruses. MOI of the top hit verification was of 0.3 (same MOI as screening procedure). MOI of the efficient knock-outs for BIM, BAX and SPRED2 was of 1. Cells were incubated for 72h at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

puromycin and 1 µg/mL doxycycline, then solely with doxycycline for ten additional days.

CRISPR cut validation:

A lysate of CRISPR modified cells was obtained using Phire Tissue Direct PCR Master Mix kit (ThermoFisher) and directly used for subsequent PCR reaction. CRISPR cut sites were amplified using primers that flank each cut site. Amplicons were Sanger sequenced (GATC) and analyzed using FinchTV software. CRISPR cut efficiency was calculated using TIDE: Tracking of Indels by Decomposition software (Desktop Genetics) (21).

Gene set enrichment and functional protein network analyses:

Gene set enrichment analysis was performed on the GenePattern platform from the Broad Institute, using the GSEAPreranked module (22). The user-supplied ranked list of genes was the MAGeCK rank generated by the imatinib resistance screen. Functional protein network analysis was performed on STRING-db from the Swiss Institute of Bioinformatics (<https://string-db.org/>). The input was the list of the top 158 genes and disconnected nodes were hidden from the network.

Cell proliferation assay:

Cells were plated into 96 well plates at 1.104 cells per well (100 µL). Cells were incubated in fresh medium or medium containing 0.5 µM imatinib for 96h. At each time point, 20 µL of CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) was added to the cell culture and incubated at 37°C for 3h. Absorbance was recorded at 490nm with an iMark Microplate reader (BioRad).

Characterization of apoptosis:

Cells were incubated in 24 well plates with different drug combinations, either in medium only, or medium containing 0.5 µM imatinib, 1 µM navitoclax, 10 µM pimasertib

or combinations. LAMA-84 cells were incubated for 24h and K562 cells were incubated for 48h. Cells were spun-down and medium was replaced by annexin binding buffer (HEPES 0.01 M, NaCl 0.14 M, pH 7.4) containing Annexin V-APC (BioLegend) at 5 µL/mL and propidium iodide (Biolegend) at 50 µg/mL. Cells were incubated for 15 minutes at room temperature and analyzed on a Accuri C6 plus cytometer (BD Biosciences). Induced apoptosis was calculated utilizing the following formula:

$$\text{Induced apoptosis (\%)} = \left(\frac{(\% \text{ apoptosis treated cells} - \% \text{ apoptosis untreated cells}) \times 100}{(100 - \% \text{ apoptosis untreated cells})} \right)$$

Western blot:

After SDS-PAGE electrophoresis, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Biorad). Membranes were saturated with 5% (w/v) fat-free dry milk, then probed with primary antibodies: mouse anti-Cas9 (EpiGentek), rabbit anti-HSP60 (Santa Cruz), rabbit anti-BIM (Sigma Aldrich). All antibodies were used at a 1/1000 dilution. After secondary antibody labeling, peroxidase activity was revealed using Western Lightning Plus-ECL kit (Perkin Elmer).

Analysis of mRNA transcript levels:

RNA was extracted from cells using Nucleospin RNA Plus columns (Macherey-Nagel) and cDNA was generated using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). RT qPCR was performed using Brilliant III SYBR Green Mastermix (Agilent) on a CFX Connect (Biorad) and analyzed on CFX Maestro (Biorad). mRNA transcript levels were normalized to housekeeping GUSB mRNA expression. Primers used for qPCR reactions are on (Supplementary Table 1).

Statistical analysis:

All results are the average of three independent manipulations, performed in

duplicate. Graphics and statistical analyses were produced and performed on GraphPad Prism 5.

Results

CRISPR-Cas9 screening procedure:

We performed a genome wide CRISPR-Cas9 screen to select for genes involved in imatinib resistance in K562 cell lines. We created a clonal K562 cell line possessing a doxycycline inducible Cas9 (Figure 1a) and verified for Cas9 nuclease activity by performing a GFP cleavage assay (Figure 1b). GFP fluorescence was virtually extinguished after seven days of Cas9 activity. We then transduced this K562 Cas9+ cell line with the GeCKO v2 library, as explained in materials and methods. Cells were then challenged to imatinib selection at 1 μ M for four days until \approx 90% mortality was observed. This treatment protocol seems shorter and more drastic in comparison to other screening procedures that typically treat cells for a minimum of two weeks at lower drug concentrations (3). The goal was to prevent acquired CRISPR-independent resistance to imatinib, as previously described (23), by treating the cells at a high imatinib concentration (1 μ M). DNA extraction of both pre- and post- imatinib populations, sgRNAs amplification by PCR and next-generation sequencing experiments were performed following the protocols in materials and methods (Figure 1c). We performed the screening process twice. After normalisation, the coverage was similar in all samples (Supplementary Figure S1). The enrichment of sgRNAs in both resistant populations compared to control populations was analysed by MAGeCK (Supplementary Table 2). Among all genes tested, 158 were enriched at an FDR (False Discovery Rate) <0.5 and

these top ranked genes had an enrichment of 73.7% \pm 18.6% of the library's sgRNAs (4 for miRNAs, or 6 for protein coding genes) (Figure 1d, Supplementary Table 2).

Validation of the screening process through individual gene knock-out in K562 cells:

In order to confirm the efficacy of the screening process, the top eight genes with an FDR <0.01 of the screen (KLF1, BAP1, BAX, UBE2M, MED24, BIM, EIF2AK1 and SPRED2) were targeted for individual CRISPR-Cas9 gene knock-out (Figure 2a). The most enriched sgRNA from the GeCKO library for each gene was individually cloned into lentiGuide Puro backbones. Ten days after transducing these vectors into K562 Cas9+ cells, the targeted loci were sequenced using Sanger sequencing and the CRISPR cut efficiencies were evaluated by TIDE analysis (Figure 2b). This software estimates the efficiency of CRISPR induced knock-outs by determining the proportion of cells with frameshift mutations. All of the eight genes were knocked-out at varying efficiencies (33.9% - 66.4%). These modified cell lines were then incubated in medium containing imatinib (0.5 μ M) and cell proliferation was tracked. All eight CRISPR modified cell lines showed decreased sensitivity to imatinib treatment over 4 days and had higher overall survival levels compared to the control cell line (transduced by a non-targeting control sgRNA (NTC)) (Figure 2c). This validates the screening process in vitro on K562 cells as individual gene knock-out of the top hits does indeed affect sensitivity to imatinib.

Analysis of the function of enriched sgRNAs and gene sets in resistant cells:

First, we focused our analysis on the top 158 hits. STRING DB functional protein association network analysis of these top genes unveiled multiple enriched biological processes that seem important for imatinib induced cell

death (Figure 3), such as pro-apoptotic signalling, hematopoietic differentiation, tumour suppressor signalling, DNA damage repair, mRNA polyadenylation, protein ubiquitinylation, TGF β signalling and the mediator complex.

Second, we performed a more global analysis. Gene set enrichment analysis was used to further determine which cellular processes or components seem important for imatinib induced cell death by inputting the complete ranked list of genes. Additionally, we analysed the enrichment score (ES) of control sgRNAs (NTC) in the ranked list and discovered that NTCs had a $ES_{low} = 2827$, meaning that all genes ranked above 2827th in our screening process seem to be, to some degree, enriched (MAGeCK p-value < 0.054) (Supplementary Figure S2a). GSEA analysis also revealed similar enriched processes (Supplementary Figure S2b-h) such as the mediator complex, intrinsic apoptosis, mRNA polyadenylation, calcium activated channels, protein ubiquitinylation, cell growth and G protein coupled receptors.

The importance of intrinsic apoptosis in response to TKI treatment:

Intrinsic apoptosis is a fine-tuned mechanism that takes into account the balance of multiple different pro- and anti-apoptotic proteins. Pro-apoptotic proteins are divided into three categories: activators, sensitizers and effectors. Activators (BIM and BID) induce the dimerization of effectors (BAX and BAK) to form the MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) and prime the mitochondria for cytochrome c release. This mechanism is also controlled positively by sensitizers (BAD, NOXA, PUMA), whose role is to target and inhibit anti-apoptotic proteins such as BCL-2 and MCL-1 (Supplementary Figure S3). These anti-apoptotic proteins act by sequestering pro-apoptotic proteins by binding to their BH3 domain. GSEA and

STRING DB analyses of the MAGeCK rank shows that the intrinsic apoptosis pathway is highly important for imatinib induced cell death in K562 cells (Supplementary Figure S2c). In fact, the activator BIM (BCL2L11) (rank: 6th), the effector BAX (rank: 2nd), the sensitizers PUMA (rank: 71st) and NOXA (rank: 22nd), and other downstream pro-apoptotic proteins (APAF1 (rank: 13th) and CASP3 (rank: 47th)) are all highly ranked in the imatinib resistance screen, further demonstrating the crucial role of this cellular process in regards to response to treatment. BID, BAK and BAD were not significantly enriched in the screening process (10 532nd, 1 910th and 15 095th respectively), perhaps suggesting a slightly lesser role of these genes in regards to imatinib resistance in CML.

The role of BIM and BAX in regards to BCL-2 antagonism with BH3-mimetics:

Mutations and polymorphisms in pro-apoptotic genes BIM and BAX have been correlated to resistance to treatment in many cancer types, including CML (24,25). To study these genes, we performed more efficient knock-outs (68.4%, $r^2=0.83$ and 89.9%, $r^2=0.95$ for LAMA-84 and K562 cells respectively) of BIM with the previously utilized sgRNA for BIM KO (Figure 2b, 2c), which targets the exon 2C of the gene (Figure 4a). This targeted mutagenesis resulted in a depletion of the active isoforms, BIM-EL and BIM-L in the two cell lines, without affecting the less active BIM-S (26) (Figure 4b). We noticed that the BIM-S isoform was significantly increased in cells lacking BIM-EL and BIM-L, suggesting a potential activation feedback loop between the isoforms. The levels of BIM isoforms are not significantly increased in BAX KO cells, demonstrating no compensatory role between the two apoptotic genes. Additionally, the residual levels of BIM-EL that can be observed in

LAMA-84 BIM KO cells are due to the knock-out efficiency being only at 68.4%.

To study BAX depletion, we equally performed more efficient knock-outs (69.6%, $r^2=0.96$ and 65.3%, $r^2=0.92$ for K562 and LAMA-84 cells respectively) of BAX by utilizing the same sgRNA as the previous BAX KO analysis (Figure 2b, 2c), which targets the exon 3 of the gene, exon which contains the BH3 domain.

As expected, both BIM KO and BAX KO cell lines show increased resistance to imatinib treatment, observed by annexin V / propidium iodide labelling (Figure 4c). We then challenged the cells to BH3-mimetic treatment (ABT-263 or navitoclax) in an attempt to induce apoptosis and reverse resistance phenotypes. Briefly, ABT 263 binds to two anti-apoptotic proteins of the BCL-2 family (both BCL-2 and BCL-xL), resulting in an efficient blockade of the inhibition of intrinsic apoptosis, thus releasing the pro-apoptotic BH3-domain containing proteins (such as BIM and BAX), and finally inducing apoptosis (27). Alone, ABT-263 treatment shows low amounts of apoptotic induction (<20%), whatever the cell line. However, treating the cells with a combination of imatinib and ABT-263 could only overcome the resistance phenotypes in the BIM KO cells, as previously observed (28), without affecting sensitivity to treatment in BAX KO cells (Figure 4c). These results were observed in two different cell lines, K562 and LAMA-84. BAX expression seems essential for the activation of apoptosis by ABT 263. This drug releases effectors BAX and BAK, which form mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) channels and induce cytochrome c release and apoptosis. In our study, BAK alone is not sufficient for the induction of apoptosis in BAX KO cells. Additionally, no transcriptional compensation between these effectors was observed after RT-qPCR analysis of BAK mRNA in the knock-out cell lines (Figure 4d). We even

observed a slight decrease of BAK transcription in K562 BAX KO cells.

A combination of imatinib and a BH3-mimetic may prove to be beneficial for resistant CML cells bearing mutations in BIM, but would seem ineffective on patients with lower levels of BAX, as BAK does not seem to compensate for the lack of BAX. Combining ABT-263 to imatinib treatment would seem to have no effect for such resistance cells.

Targeting the MAPK pathway:

Among the top hits in our CRISPR screen, SPRED2 (rank:8th) stood out as a potential inhibitor of MAPK signalling (29). We equally sought to investigate the importance of the MAPK pathway in regards to imatinib resistance. Recently, it has been demonstrated that the inhibitory role of SPRED2 on cell proliferation has been tightly correlated to the expression of the well-known tumour suppressor NF1 (30), equally highly ranked in the screen (rank: 12th). To further study the effects of MAPK activation and imatinib resistance, we generated K562 SPRED2 KO and SPRED2 overexpression cell lines (respectively SPRED2 KO and SPRED2+) to investigate the potential therapeutic benefit of targeting MAPK signalling in CML. SPRED2 KO was obtained through dual sgRNA cleavage and efficient at 88.9%, whereas SPRED2 overexpression was obtained through lentiviral transduction.

Firstly, SPRED2 overexpression has a negative effect on cell proliferation (Figure 5a) without the presence of imatinib and RT-qPCR shows a decrease in MAPK signalling transcriptional targets (31) (ETV4, ETV5, PHDLA1) in SPRED2 overexpressing cells (Figure 5c). SPRED2 knock-out does not affect cell proliferation in absence of imatinib treatment, even if MAPK signalling is increased in these cells (Figure 5a, 5c). As previously demonstrated, SPRED2 KO cells show an increase in resistance to imatinib

(0.5 μ M) which is observed by annexin V / propidium iodide labelling (Figure 5d) and cell proliferation (Figure 5b). Furthermore, combining imatinib treatment with MAPK inhibition, through MEK1/2 blockade with the antineoplastic compound pimasertib (MEKi) (32), overcomes resistance phenotypes observed in SPRED2 KO cells (Figure 5d). Interestingly, these SPRED2 KO cells seem to be more sensitive to MAPK inhibition alone than control cells. This may be due to a form of dependence to MAPK signalling in these cells, and blocking this major pathway may be the cause of increased apoptosis.

Discussion

Technological advances in the last decade, such as NGS and CRISPR-Cas9 gene-editing, have permitted laboratories around the world to decipher many novel physiological processes through efficient genome wide screening. The utilisation of CRISPR-Cas9 to perform genetic screens gives scientists more insight into physiological processes compared to previous shRNA screening techniques. Additionally, easy-to-use bioinformatic tools such as MAGeCK has democratised the analysis of complex NGS data, giving power to scientists with limited bioinformatic background. Furthermore, data resulting from CRISPR knock-out screens differs from those provided by shRNA knock-down screens (33), even though efficiencies between both technologies are similar (34).

We utilized the GeCKO v2 library to screen for genes involved in imatinib resistance in CML. Our screening procedure was robust as a subset of the highly ranked genes (BAX, BIM, BAP1 and SPRED2) had previously been correlated to either CML progression, imatinib resistance or resistance to alternative

therapies in different cancer types (25,35–38). Gene set enrichment and STRING DB analyses unveiled cellular processes that seem crucial for optimal imatinib induced cell death, such as genes involved in intrinsic apoptosis.

Targeting this form of programmed cell death has proved to be a powerful novel form of therapy for cancer (39). Clinical trials that utilize BCL-2 inhibitors are becoming more and more prevalent and could potentially show exciting results as an efficient treatment for many different forms of blood cancer, such as chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia and Non-Hodgkin's lymphoma (39).

We showed that BH3-mimetics could potentially be utilized to treat certain forms of primary resistance to imatinib in CML, as co-treating BIM KO cells lines with imatinib and ABT 263 (navitoclax) overcame resistance phenotypes. This treatment could show increased efficacy for patients bearing BIM polymorphisms. The most common polymorphism in BIM is present in \approx 21% of the East Asian population and results in an alternatively spliced mRNA, lacking the BH3 pro-apoptotic domain (25,40). This mutation seems to cause resistance to treatment in different types of lung cancer (40), but its effect of imatinib resistance in the clinic is still questioned (25). For such resistant patients, navitoclax and imatinib combined could have more beneficial effects. A certain polymorphism in the promoter of the BAX gene G(-248)A, has equally been correlated to increased resistance to treatment (24). However, our work suggests that BAX, a crucial protein involved in MOMP formation, is essential for BH3-mimetic function and such therapies could possibly turn out to be ineffective for patients with decreased BAX function.

Along with targeting intrinsic apoptosis, we equally investigated the role of MAPK

activation in regards to imatinib resistance. We decided to study the SPRED2 tumour suppressor to discover its role in regards to MAPK inhibition. SPRED2, a member of the Sprouty-related family, had previously been associated as a potential negative prognostic marker in multiple malignancies such as CML (35), prostate cancer (41) and hepatocellular carcinoma (42). Its role as an inhibitor of MAPK signalling was further demonstrated in our work and specifically inhibiting this pathway with MEK inhibitor pimasertib overcame imatinib resistance phenotypes. Targeting this pathway may be beneficial as the MAPK pathway is a major survival and proliferation activator. We have already reported a synergistic inhibitory effect between navitoclax and pimasertib in acute myeloid leukemia (43). Furthermore, an ongoing clinical trial is underway to treat acute myeloid leukemia with pimasertib (ClinicalTrials.gov #NCT00957580).

The regulation of additional BCR-ABL1 related pathways such as PI3K/AKT/mTOR or Jak/STAT5 signalling may also play an important role in imatinib resistance. Among the top ranked genes, tumour suppressor PTEN knock-out was highly associated to imatinib resistance (rank: 40th). Also, mTOR negative regulators TSC1 and TSC2 were equally highly ranked (237th and 26th, respectively) in the screening process. Targeting the PI3K signalling pathway with FDA approved compounds such as idelalisib (PI3K inhibitor) or everolimus (mTOR inhibitor) may also seem beneficial for imatinib resistant patients that show overactivation of the PI3K signalling pathway (44,45).

As previously indicated, a subset of the top ranking genes had already been correlated to imatinib resistance and CML progression. However, additional genes or cellular processes caught our interest. Another

intriguing result that came from the CRISPR screening procedure was the enrichment of many Mediator complex subunits. The Mediator is a highly conserved eukaryotic multiprotein transcriptional coactivator complex (46). It is composed of around 26 different subunits, of which 10 (Supplementary Figure S4) with p-values < 0.05, are in the top 852 genes of our ranking (852nd ranked gene (MED18) has an enrichment p-value = 0.035). Half of these enriched MED subunits are located in the tail of the Mediator complex, the regulatory subunit of the complex. Interestingly, MED16, MED23 and MED24 form a tight-knit submodule in the tail of the mediator complex and becomes unstable and subject to degradation if one of the three subunits is deficient (46,47). All three genes are highly ranked in our screen, meaning that this submodule could play an important role in imatinib induced cell death. Interestingly, four (MED12, MED16, MED19 and MED23) out of six of the mediator complex subunits found to be significantly enriched in our study were also enriched in the GeCKO screen performed by Shalem et al, who screened for vemurafenib resistance (BRAF V600E inhibitor) in melanoma (3). This complex transcriptional regulator may be important for the induction of cell death after cancer cell inhibition through targeted therapy. Moreover, the MED16/MED23/MED24 submodule may potentially have a role in the transcriptional activation of apoptotic genes in response to cellular stress (48). It has been shown that MED23 knock-down promotes tumorigenicity and inhibits apoptosis through a decrease of BAX expression, yet conversely, MED24 knock-down in breast carcinoma cells lead to diminished cell proliferation and DNA synthesis (47). These contradictory results represent the complexity and diverse functionalities of the dynamic multiprotein Mediator complex.

Other cellular processes seem important for imatinib induced cell death in our model. However, their potential roles concerning resistance to treatment are currently not understood. Genes involved in protein ubiquitinylation and mRNA polyadenylation, for example, are significantly knocked-out in imatinib resisting cells. Protein turnover through the regulation of gene transcription and protein degradation may be an important process for imatinib induced cell death (49,50). In particular, UBE2M, was highly ranked in both imatinib resistance (rank: 8th) and verumafenib resistance screens (rank: 45th and 95th). This E3-ubiquitinyating protein may have an important role in regards to protein turnover and drug resistance.

Understanding the genetics behind certain neoplasms or resistance phenotypes brings us one step closer to truly personalised medicine. Combining multiple FDA approved compounds for optimal response to treatment is becoming more and more favoured in oncology. Patient's mutational burden and genotypes can vary drastically for all cancer types which may decrease prognostic values and increase the probability of drug resistance. Personalising treatment according to patient's mutations may resolve issues regarding cancer persistence and resistance to treatment. In this study, we show that two possible combinations, imatinib and apoptotic inhibitor navitoclax or imatinib and MAPK inhibitor pimasertib, can overcome resistance to imatinib in specific cases in vitro. We also discussed many additional possibilities for targeting specific cancer pathways or drivers. Additional research needs to be performed to fully understanding oncogenic transformation. However, advances in tumour sequencing, big data analysis and machine learning will give future oncologists the best tools to find the most effective treatment combinations according to their patient's mutations and

help advance the domain of precision oncology.

References

1. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816–21.
2. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819–23.
3. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*. 2014 Jan 3;343(6166):84–7.
4. Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc*. 2017 Mar 23;12(4):828–63.
5. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*. 2014 Jan 3;343(6166):80–4.
6. Zhou Y, Zhu S, Cai C, Yuan P, Li C, Huang Y, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*. 2014 May 22;509(7501):487–91.
7. Parnas O, Jovanovic M, Eisenhaure TM, Herbst RH, Dixit A, Ye CJ, et al. A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. *Cell*. 2015 Jul 30;162(3):675–86.
8. Slipek NJ, Varshney J, Largaespada DA. CRISPR/Cas9-Based Positive Screens for Cancer-Related Traits. In: Starr TK, editor. *Cancer Driver Genes* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cited 2019 Jan 8]. p. 137–44. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8967-6_11
9. Frazer R, Irvine AE, McMullin MF. Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J*. 2007 Jan;76(1):8–17.
10. Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL in Chronic Myelogenous Leukemia – How Does It Work? *Acta Haematol*. 2008;119(4):212–7.
11. Deininger M. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2640–53.
12. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2408–17.
13. Deininger M. Resistance to imatinib: mechanisms and management. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2005 Nov;3(6):757–68.
14. Soverini S, De Benedittis C, Polakova KM, Linhartova J, Castagnetti F, Gugliotta G, et al. Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. *Oncotarget*. 2016 Apr 19;7(16):21982–90.
15. Lewis M, Copland M, Soverini S, Sadovnik I, Bedel A, Prost S, et al. What are the challenges in 2016 regarding resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and cancer?: Resistance to TKI in CML and cancer. *Hematol Oncol* [Internet]. 2016 [cited 2017 May 16]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hon.2329>
16. Nestal de Moraes G, Souza PS, Costas FC de F, Vasconcelos FC, Reis FRS, Maia RC. The Interface between BCR-ABL-Dependent and -Independent Resistance Signaling Pathways in Chronic Myeloid Leukemia. *Leuk Res Treat*. 2012;2012:1–19.
17. Sauße S, Silver RT. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann Hematol*. 2015 Apr;94 Suppl 2:S159-165.
18. Li W, Xu H, Xiao T, Cong L, Love MI, Zhang F, et al. MAGECK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol*. 2014;15(12):554.
19. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011 May 2;17(1):10.
20. Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res*. 2016 Jul 8;44(W1):W272–6.
21. Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*. 2014 Dec 16;42(22):e168–e168.
22. Reich M, Liefeld T, Gould J, Lerner J, Tamayo P, Mesirov JP. GenePattern 2.0. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):500–1.
23. Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1070–9.
24. Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S, Sheridan DP. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-

UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett.* 2002 Dec 10;187(1-2):199-205.

25. Ng KP, Hillmer AM, Chuah CTH, Juan WC, Ko TK, Teo ASM, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med.* 2012 Apr;18(4):521-8.

26. Clybouw C, Merino D, Nebl T, Masson F, Robati M, O'Reilly L, et al. Alternative splicing of Bim and Erk-mediated BimEL phosphorylation are dispensable for hematopoietic homeostasis in vivo. *Cell Death Differ.* 2012 Jun;19(6):1060-8.

27. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3421-8.

28. Kuroda J, Puthalakath H, Cragg MS, Kelly PN, Bouillet P, Huang DCS, et al. Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Oct 3;103(40):14907-12.

29. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, et al. Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature.* 2001 Aug 9;412(6847):647-51.

30. Boettcher M, Tian R, Blau JA, Markegard E, Wagner RT, Wu D, et al. Dual gene activation and knockout screen reveals directional dependencies in genetic networks. *Nat Biotechnol.* 2018 Jan 15;36(2):170-8.

31. Brant R, Sharpe A, Liptrot T, Dry JR, Harrington EA, Barrett JC, et al. Clinically Viable Gene Expression Assays with Potential for Predicting Benefit from MEK Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2017 Mar 15;23(6):1471-80.

32. Srinivas NR. Pharmacology of Pimasertib, A Selective MEK1/2 Inhibitor. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 Aug;43(4):373-82.

33. Khorashad JS, Eiring AM, Mason CC, Gantz KC, Bowler AD, Redwine HM, et al. shRNA library screening identifies nucleocytoplasmic transport as a mediator of BCR-ABL1 kinase-independent resistance. *Blood.* 2015 Mar 12;125(11):1772-81.

34. Morgens DW, Deans RM, Li A, Bassik MC. Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat Biotechnol.* 2016 Jun;34(6):634-6.

35. Liu X-Y, Yang Y-F, Wu C-T, Xiao F-J, Zhang Q-W, Ma X-N, et al. Spred2 is involved in imatinib-induced

cytotoxicity in chronic myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 19;393(4):637-42.

36. Li X, Wang S, Li B, Wang Z, Shang S, Shao Y, et al. BIM Deletion Polymorphism Confers Resistance to Osimertinib in EGFR T790M Lung Cancer: a Case Report and Literature Review. *Target Oncol.* 2018 Aug;13(4):517-23.

37. Peng Y, Wang L, Qing Y, Li C, Ren T, Li Q, et al. Polymorphisms of BCL2 and BAX Genes Associate with Outcomes in Advanced Non-small cell lung cancer Patients treated with platinum-based Chemotherapy. *Sci Rep [Internet].* 2015 Dec [cited 2018 Dec 20];5(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep17766>

38. Dkhissi F, Aggoune D, Pontis J, Sorel N, Piccirilli N, LeCorf A, et al. The downregulation of BAP1 expression by BCR-ABL reduces the stability of BRCA1 in chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 2015 Sep;43(9):775-80.

39. Gibson CJ, Davids MS. BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5021-9.

40. Ko TK, Chin HS, Chuah CTH, Huang JWJ, Ng K-P, Khaw SL, et al. The BIM deletion polymorphism: A paradigm of a permissive interaction between germline and acquired TKI resistance factors in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2016 Jan 19;7(3):2721-33.

41. Kachroo N, Valencia T, Warren AY, Gnanapragasam VJ. Evidence for downregulation of the negative regulator SPRED2 in clinical prostate cancer. *Br J Cancer.* 2013 Feb;108(3):597-601.

42. Ma X-N, Liu X-Y, Yang Y-F, Xiao F-J, Li Q-F, Yan J, et al. Regulation of human hepatocellular carcinoma cells by Spred2 and correlative studies on its mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 15;410(4):803-8.

43. Airiau K, Prouzet-Mauléon V, Rousseau B, Pigneux A, Jeanneteau M, Giraudon M, et al. Synergistic cooperation between ABT-263 and MEK1/2 inhibitor: effect on apoptosis and proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* 2016 Jan 5;7(1):845-59.

44. Mitchell R, Hopcroft LEM, Baquero P, Allan EK, Hewit K, James D, et al. Targeting BCR-ABL-Independent TKI Resistance in Chronic Myeloid Leukemia by mTOR and Autophagy Inhibition. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2018 May 1;110(5):467-78.

45. Papadimitrakopoulou VA, Soria J-C, Jappe A, Jehl V, Klimovsky J, Johnson BE. Everolimus and Erlotinib as Second- or Third-Line Therapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2012 Oct;7(10):1594-601.

46. Allen BL, Taatjes DJ. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Mar;16(3):155–66.
47. Hasegawa N, Sumitomo A, Fujita A, Aritome N, Mizuta S, Matsui K, et al. Mediator Subunits MED1 and MED24 Cooperatively Contribute to Pubertal Mammary Gland Development and Growth of Breast Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol.* 2012 Apr 15;32(8):1483–95.
48. Shi J, Han Q, Zhao H, Zhong C, Yao F. Downregulation of MED23 promoted the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma: THE SUPPRESSIVE ROLE OF MED23 IN ESCC. *Mol Carcinog.* 2014 Oct;53(10):833–40.
49. Curinha A, Oliveira Braz S, Pereira-Castro I, Cruz A, Moreira A. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus.* 2014 Nov 2;5(6):508–19.
50. Yang L, Chen J, Huang X, Zhang E, He J, Cai Z. Novel Insights Into E3 Ubiquitin Ligase in Cancer Chemoresistance. *Am J Med Sci.* 2018 Apr;355(4):368–7

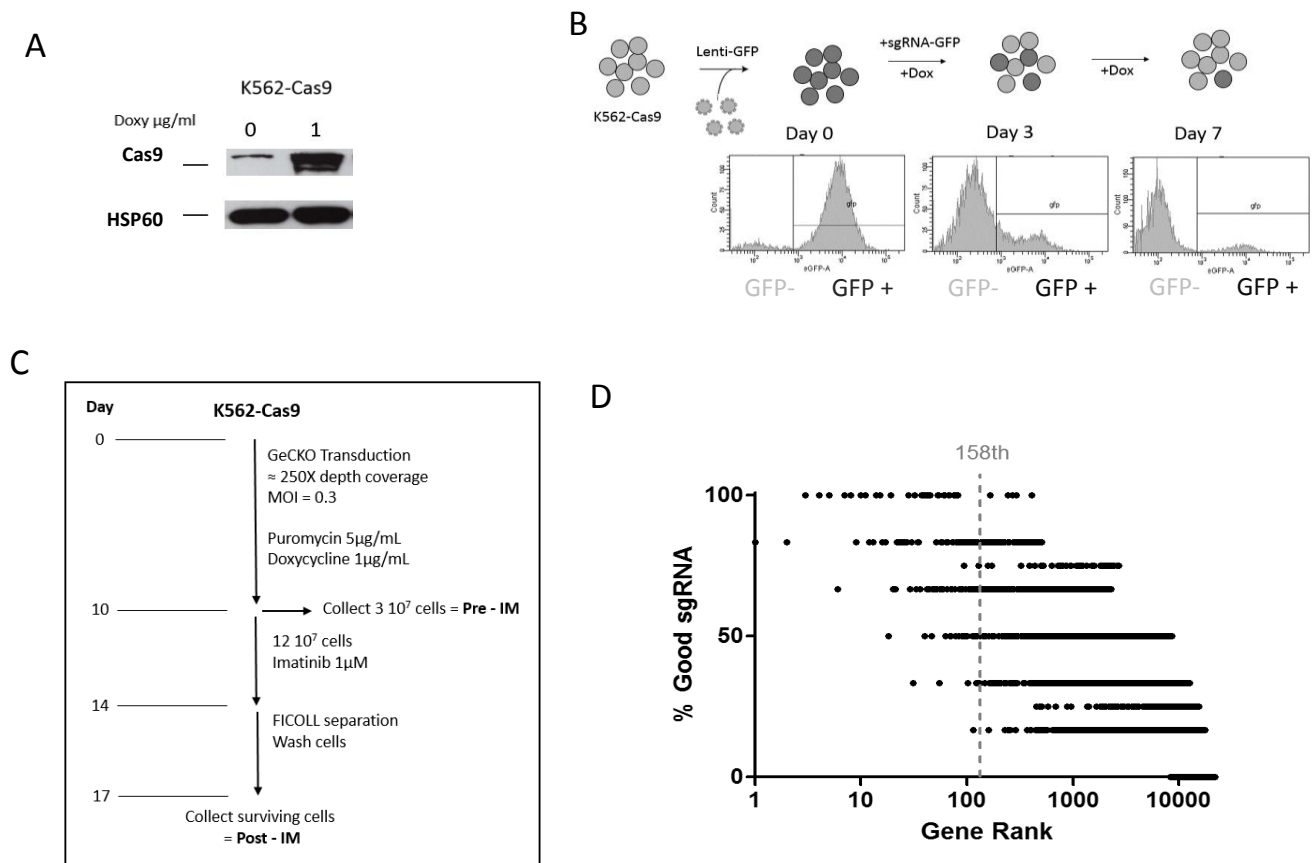


Figure 1: Generation of Cas9⁺ cell line and screening procedure

(A) Western blot analysis shows that K562-Cas9 positive cell lines express increased amounts of Cas9 endonuclease in the presence of 1 µg/mL doxycycline. (B) K562-Cas9⁺ cells were transduced with a GFP containing lentivirus. Cells were subsequently transduced with an sgRNA targeting the GFP gene. After 3 days of doxycycline induction, Flow cytometry analysis showed that GFP levels were decreased in these cells, demonstrating efficient GFP knock-out through CRISPR-Cas9 activity. (C) K562-Cas9 cells were transduced with the GeCKO bank at an average coverage of approximately 250X and at an MOI = 0.3 to limit multiple sgRNA integrations in the same cell. sgRNA expressing cells were selected with puromycin and Cas9 expression was enabled with doxycycline. After 10 days, $3 \cdot 10^7$ cells were collected as the control population, pre-imatinib treatment. $12 \cdot 10^7$ cells were subsequently treated to imatinib at 1 µM for four days. Surviving cells were separated using FICOLL®, then cultured in fresh medium for 72 hours then collected as the imatinib treated population. (D) List of the percentage of good sgRNAs per gene in our generated rank. In the GeCKO library, protein targeting genes have 6 independent sgRNAs whereas miRNA have 4 independent sgRNAs.

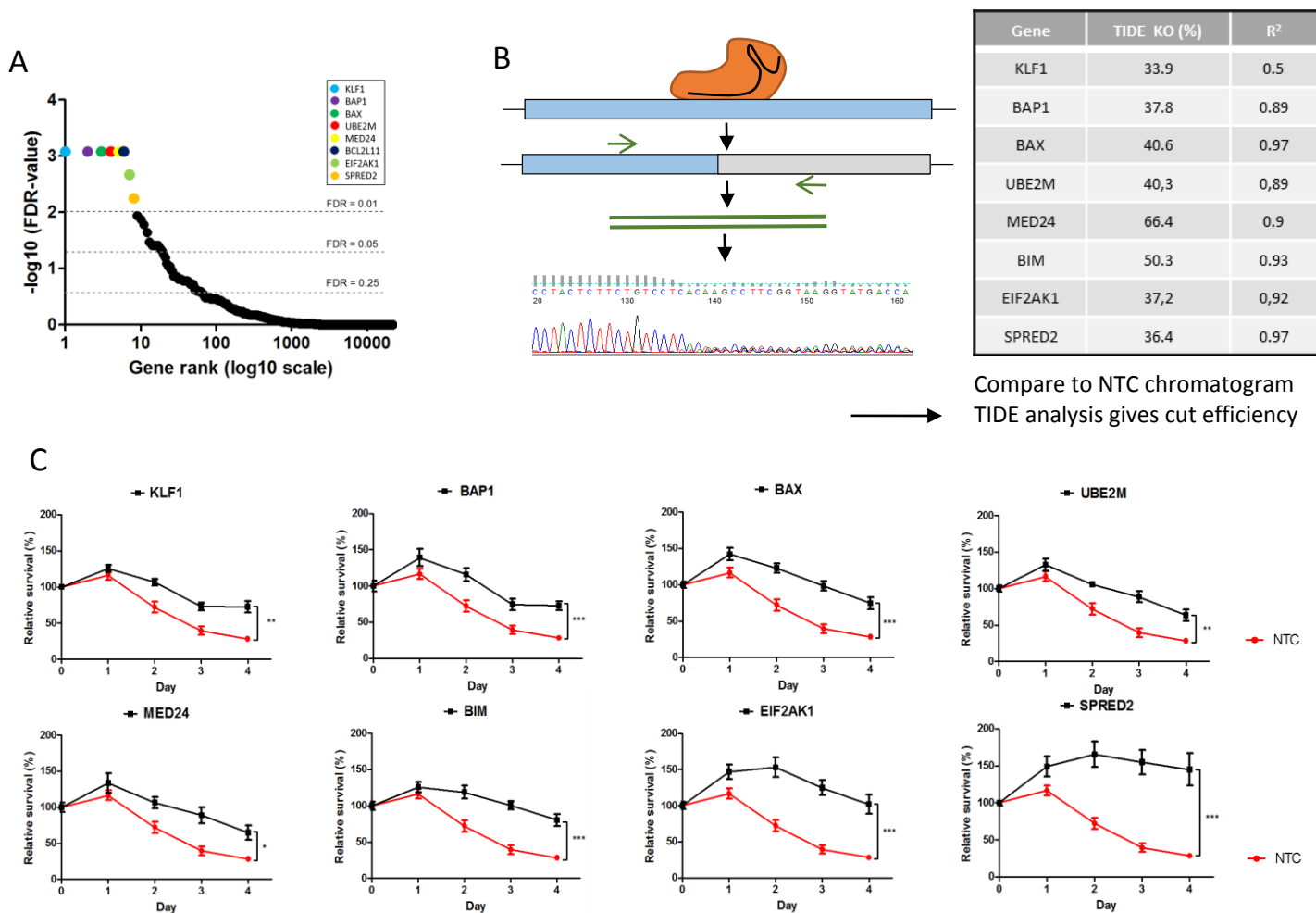


Figure 2: CRISPR screen validation

(A) Gene rank of all genes screened (20 914 different genes and miRNAs) according to their FDR-value. Cut-offs at FDR = 0.25, FDR 0.05 and FDR 0.01. (B) Individual gene knock-out protocol: specific sgRNAs are cloned into lentiviral vectors and transduced into Cas9 expressing cells. Targeted loci were subsequently Sanger sequenced. Indel efficiency is generated using TIDE analysis. (C) Proliferation of CRISPR modified cell lines and NTC cell line at 0.5 μ M during four days was analyzed by MTS and survival was calculated relative to day 0, n = 3.

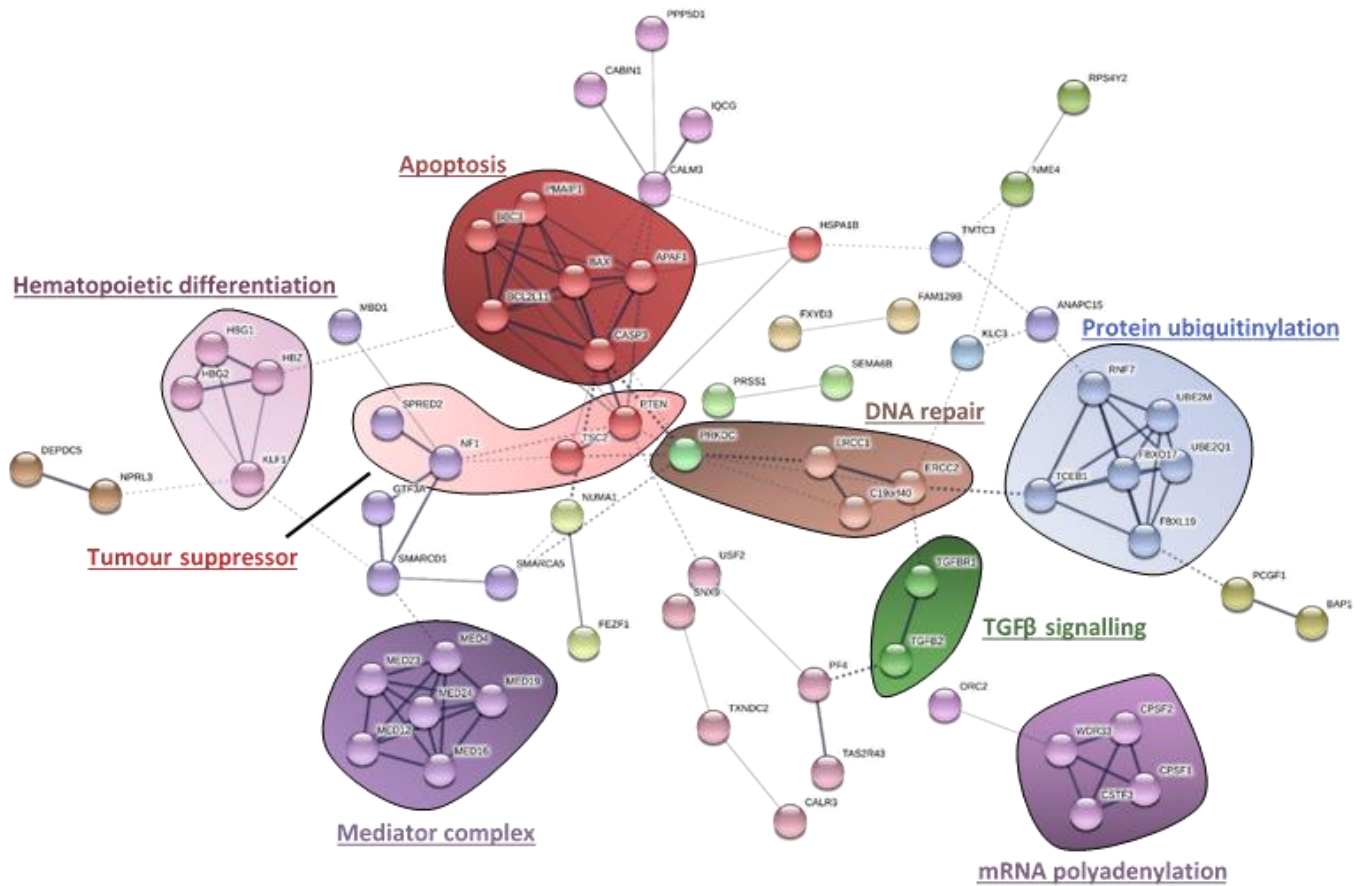


Figure 3: Functional protein association network analysis using STRING DB

The list of the top 158 genes identified through the CRISPR screen was inputted into STRING DB v10.5, unconnected nodes were excluded from the network. Multiple different cellular processes were identified using this approach.

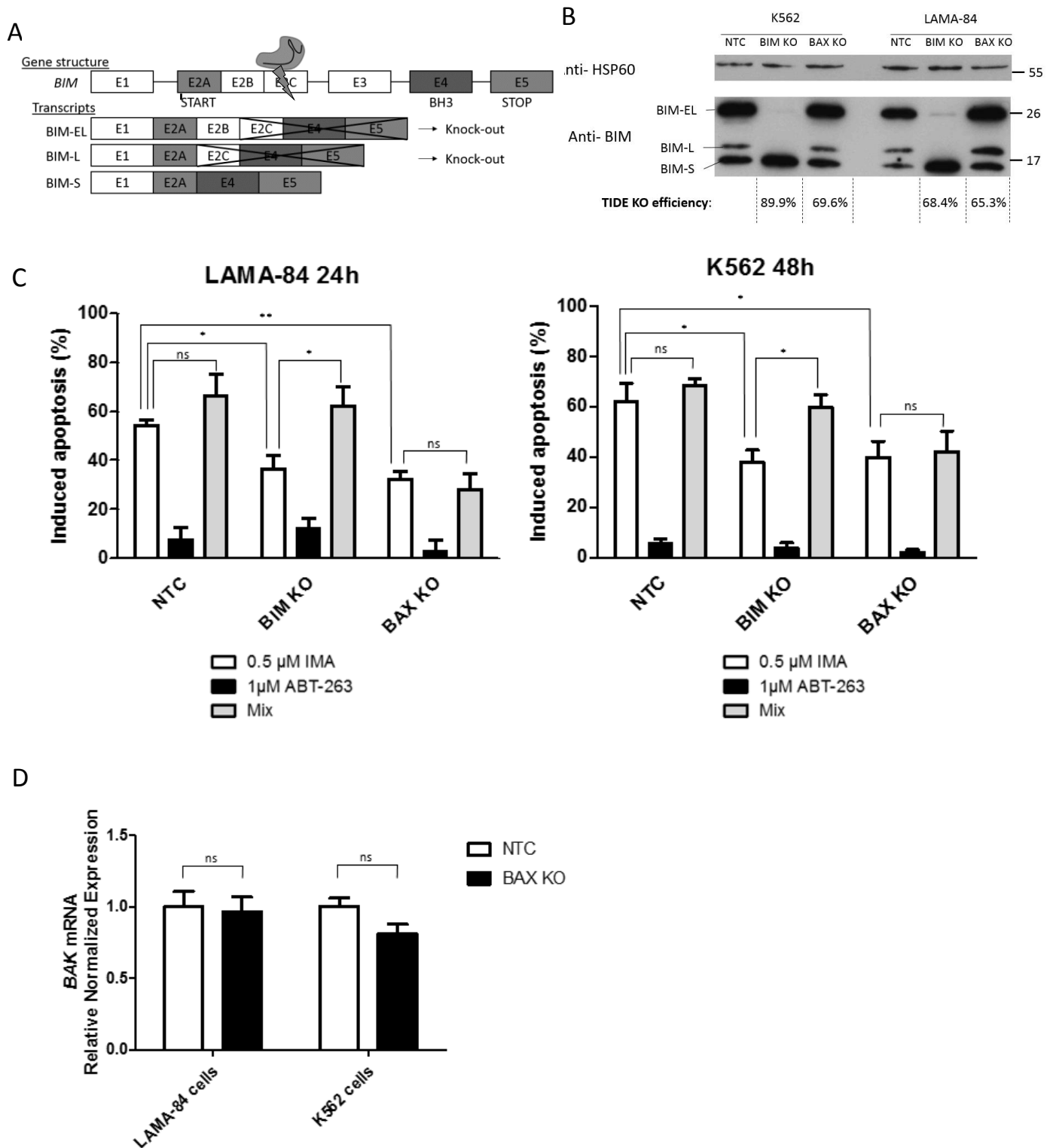


Figure 4: The importance of intrinsic apoptosis in response to TKI treatment

(A) Gene structure of *BIM*, CRISPR targeted exon 2C, knocking out BIM-EL and BIM-L isoforms. (B) Western blot analysis of HSP60 and BIM, knock-out efficiency calculated with TIDE analysis software. (C) Induced apoptosis was calculated for all cell lines after either 24h (LAMA-84) or 48h (K562) treatment with 0.5μM imatinib (IMA), 1 μM navitoclax (ABT-263) or both (Mix). (D) *BAK* transcript levels were determined by RT-qPCR. Expression is normalized to housekeeping gene *GUSB*. Statistical analysis performed on GraphPad, student unpaired t-tests were performed. * p -value < 0.5, ** p -value < 0.1, ns = non-significant, $n = 3$

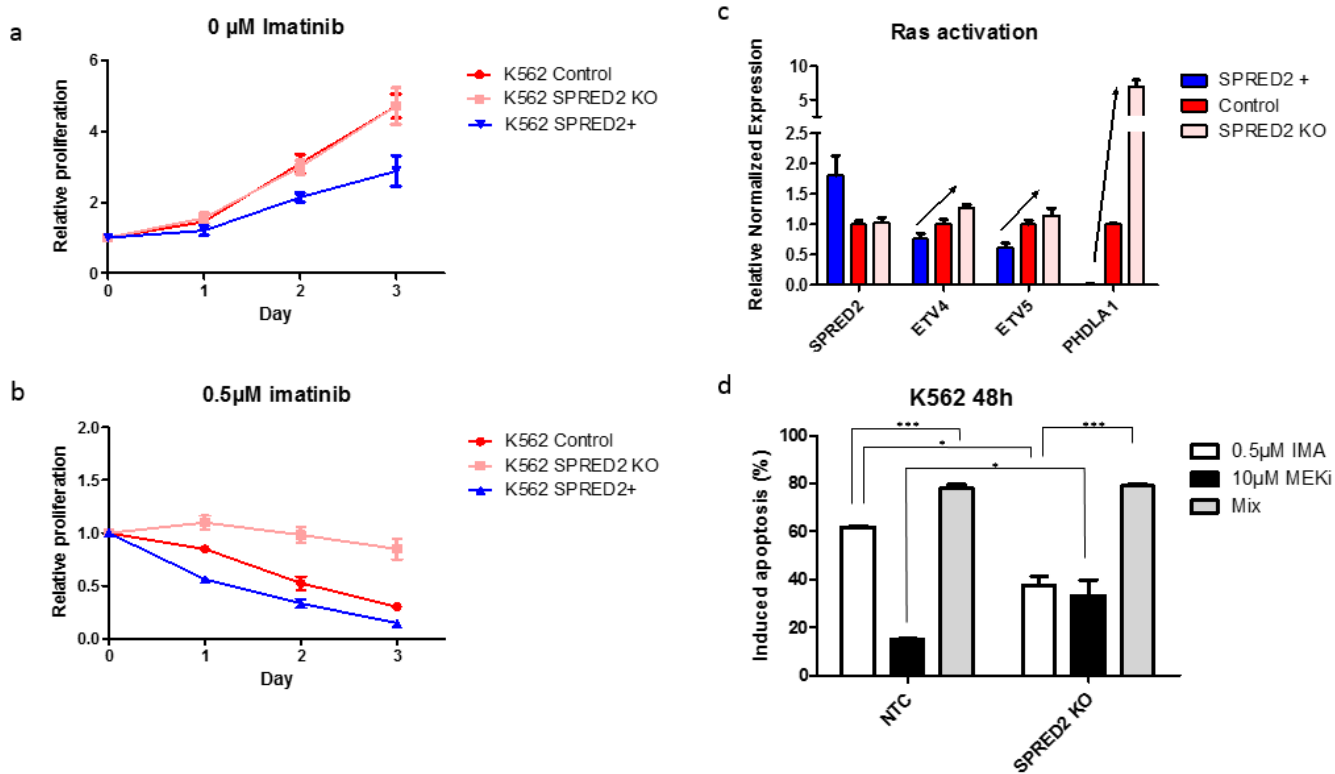
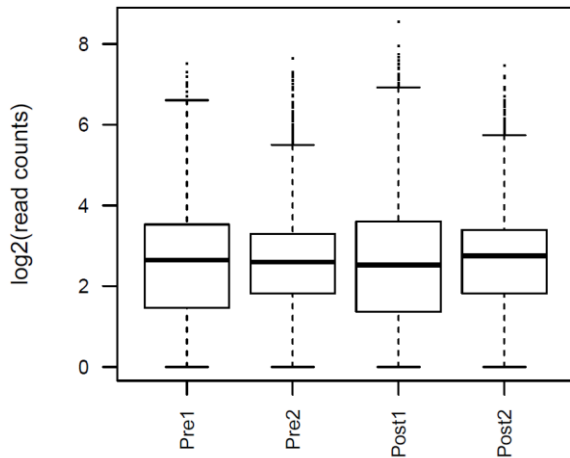


Figure 5: Targeting the MAPK pathway

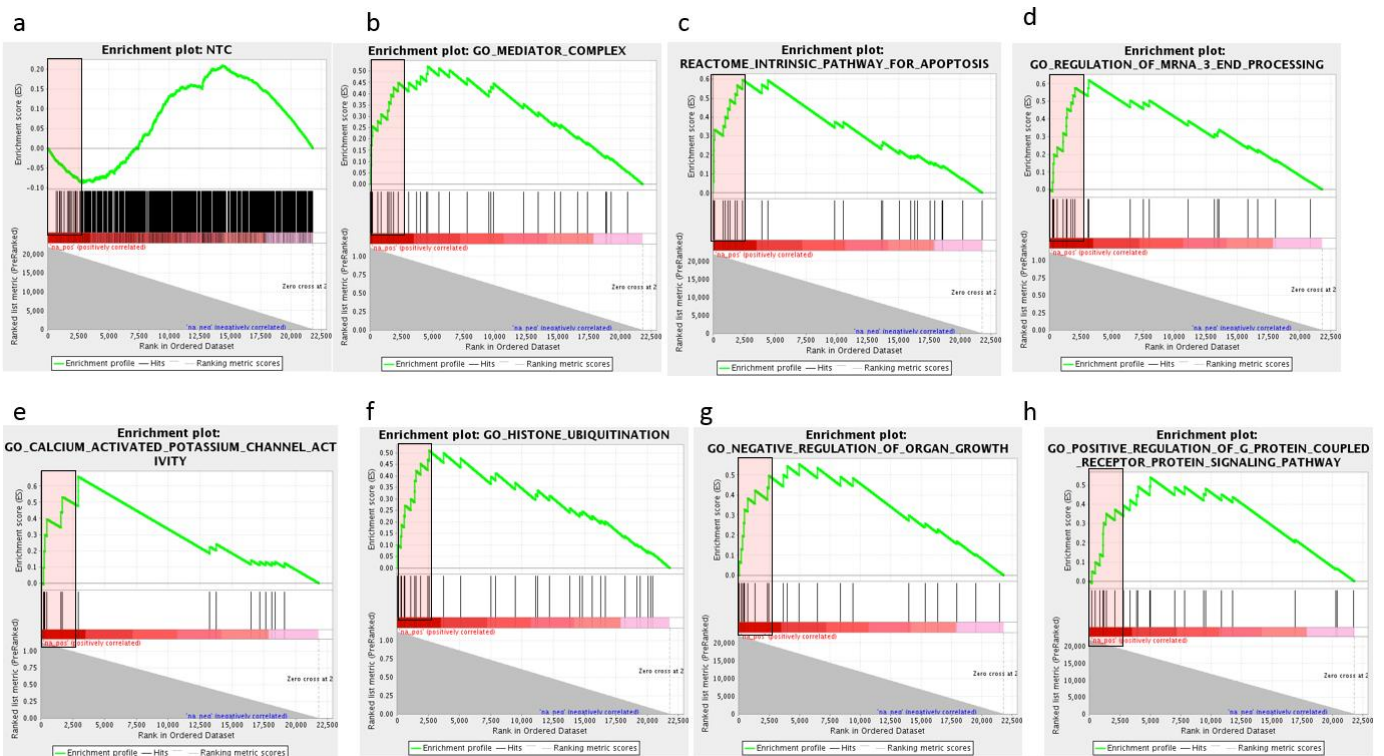
Proliferation of K562 control, SPRED2 knock-out (SPRED2 KO) and SPRED2 overexpressed (SPRED2+) was analyzed in medium with 0 μM imatinib (A) or 0.5 μM imatinib (B) over 3 days, n = 3. (C) Ras activation was analyzed by RT-qPCR analysis of MAPK transcriptional targets, n = 3. Expression was normalized to housekeeping gene *GUSB*. (D) Induced apoptosis was calculated for K562 NTC (control) and K562 SPRED2 KO cell lines after 48h treatment with either 0.5 μM imatinib (IMA), 10 μM pimasertib (MEKi) or both (Mix). Statistical analysis performed on GraphPad, student unpaired t-tests were performed. * *p*-value < 0.05, ** *p*-value < 0.01, *** *p*-value < 0.001, n = 3

Supplementary Data :



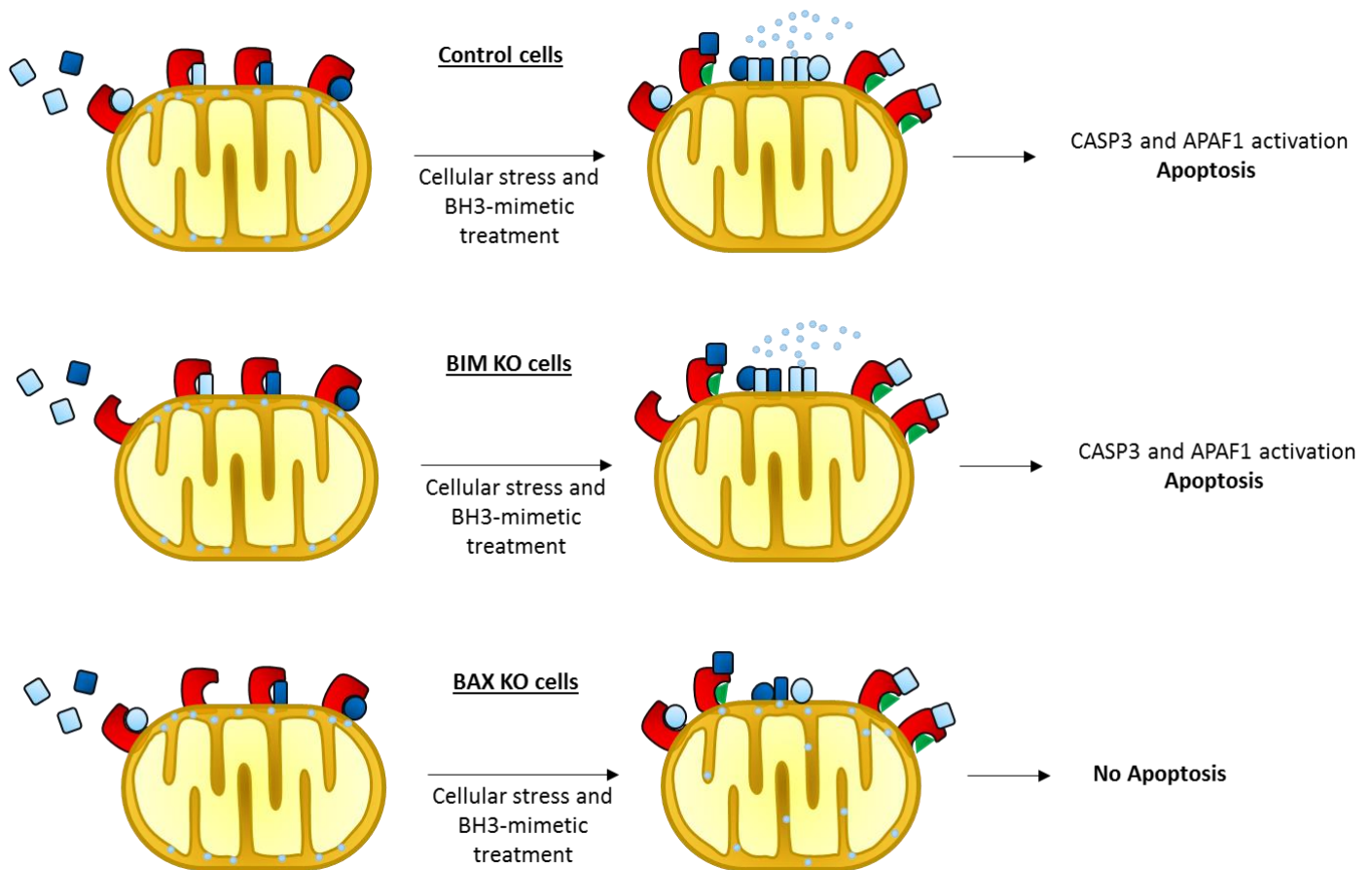
Supplementary Figure S1: Normalized read counts

Log2 of normalized read counts after next generation sequencing of both pre-imatinib (Pre1, Pre2) and post-imatinib (Post1, Post2) populations.



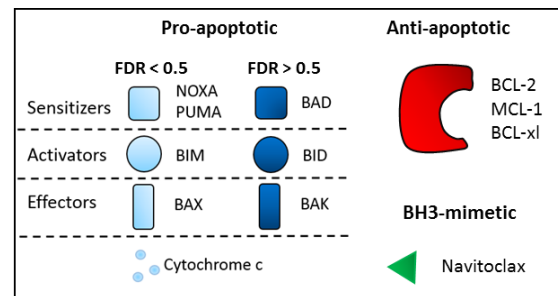
Supplementary Figure S2: Gene set enrichment analysis of entire gene rank

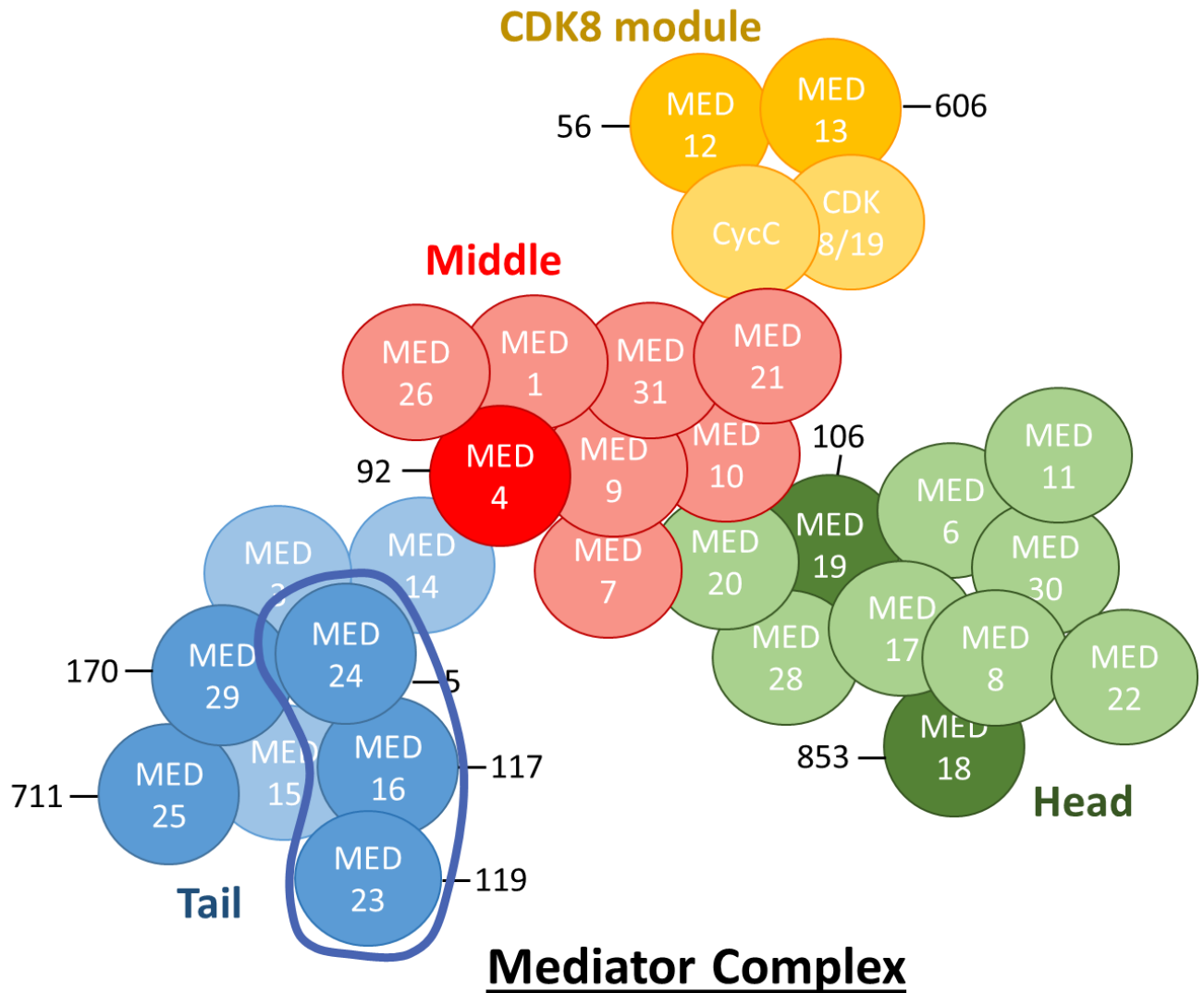
GSEA was performed using the GSEA Preranked module as described in materials and methods.



Supplementary Figure S3: Intrinsic apoptosis and genes enriched in CRISPR screen

Proapoptotic proteins are classified into two subclasses, those that are enriched in the imatinib resistance screen (light blue, FDR < 0.5) and those that are not (dark blue, FDR > 0.5). In control cells, cellular stress or BH3-mimetic treatment dislodges anti-apoptotic proteins from proapoptotic proteins, allowing cytochrome release and apoptosis. Similar phenotypes are observed in BIM KO cells. However, less apoptosis is observed in response to cellular stress or BH3-mimetic treatment in BAX KO cells. BAX seems essential for MOMP formation and cytochrome c release.





Supplementary Figure S4: The Mediator complex

Blue subunits are part of the tail, red subunits are part of the middle, green subunits are part of the head and yellow subunits are part of the CDK8 module. Subunits in the darker shade of the color are enriched in the imatinib resistance screen. The CRISPR screen rank beside the subunit. MED24, MED16 and MED23 compose a tight-knit submodule in the tail of the mediator complex.

Supplementary table 1: Primers used for sgRNA cloning, PCR, Sanger and qPCR reactions

				sgRNA cloning primers	CRISPR-targeted loci PCR primers and SANGER seq primers	
		Gene target	Primer ID	Sequence 5' - 3'	PCR cut check F	PCR cut check R
Top 8 Check	BAX study	KLF1	sgRNA F KLF1	caccgTCAGAGCGCGAAAAAGCACG	TCAGTACCAAGGGCACTTCC	GAGTCCAGGAGAGGGTCCAT
			sfRNA R KLF1	aaacCGTGCTTTTTTCGCGCTCTGAc		
		BAX	sgRNA F BAX	caccgCCATTGCGCCTGCTCGATCC	TCAGGGGTGAGTTTGAGGTC	GCTGGACTTCTGGGTCCTC
			sfRNA R BAX	aaacGGATCGAGCAGGGCGAATGGc		
		BAP1	sgRNA F BAP1	caccgCCAAGGTAGAGACCTTTCGC	CATCACCCCTCCTCTTGT	CCTGTCTTCTCCATTTCCA
			sfRNA R BAP1	aaacGCGAAAGGTCTCTACCTTGGc		
	UBE2M	sgRNA F UBE2M	caccgTCACCAAGAAGAGATACTGC	CAGGCACCTACCCATCTCTC	TCCTTGTTCACTGGGTCCTC	
		sfRNA R UBE2M	aaacGCAGTATCTCTTCTTGGTGAc			
	BIM study	BIM	sgRNA F BIM	caccgCAACCACTATCTCAGTGCAA	CAACACAAACCCCAAGTCT	CACATCTCCATTTCCATCT
		sfRNA R BIM	aaacTTGCACTGAGATAGTGGTTGc			
	MED24	sgRNA F MED24	caccgATACCTTACTGATGCTGTG	TCCTTGCTGGGTTGAAGAG	GCAATGCTTATGGGAGAAA	
		sfRNA R MED24	aaacCACAGCCATCAGTAAGGTATc			
	EIF2AK1	sgRNA F EIF2AK1	caccgAAACCCACTTCTGTTCAAGAC	TTGCAAACCAACTCTTGTG	ACCCGGCTAATTTCCATATTT	
		sfRNA R EIF2AK1	aaacGTCTTGAACGAAGTGGGTTTc			
	SPRED2	sgRNA F SPRED2	caccgCTGATGCCCGAGCCTTTGAC	GCCTGTGTGTTCCATCCTT	TACTGACCTGGTCCCAAACC	
		sfRNA R SPRED2	aaacGTCAAAGGCTCGGGCATCAGc			
	NTC	sgRNA F NTC	caccgATATTTTCGGCAGTTGCAGCA			
			sfRNA R NTC	aaacTGCTGCAACTGCCGAAATATc		
SPRED2 study	SPRED2 A	sgRNA F SPRED2 A	caccgATGACCAGAGATGACTCCAG	TGGTCATCTGCATTTTGAAC	CACGAGTTGTATGTCTGCCATT	
		sfRNA R SPRED2 A	aaacCTGGAGTCATCTCTGGTCATc			
	SPRED2 B	sgRNA F SPRED2 B	caccgGCCGCTTCGTCCATTGCCTT			
		sfRNA R SPRED2 B	aaacAAGGCAATGGACGAAGCGGGc			
	U6 promoter	U6 F	CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA			
qPCR	GUSB	GUSB F	GTCTGCGCATTTTGTCCG			
		GUSB R	CACACGATGGCATAGGAATGG			
	SPRED2	SPRED2 F	CTCATCCATGGTGAACGACAGAA			
		SPRED2 R	TGTCAAAGGCTCGGGCATC			
	ETV4	ETV4 F	CAGTGCCTTTACTCCAGTGCC			
		ETV4 R	CTCAGGAAATCCGTTGCTCT			
	ETV5	ETV5 F	CAGTCAACTTCAAGAGGCTTGG			
		ETV5 R	TGTCATGGCTACAAGACGAC			
	PHDLA1	PHDLA1 F	GAAGATGGCCATTCAAAGCG			
		PHDLA1 R	GAGGAGGCTAACACGCAGG			
SPRY2	SPRY2 F	CCTACTGTCGTCCAAGACCT				
	SPRY2 R	GGGGCTCGTGCAGAAGAAT				
BAK	BAK F	ATGGTCACCTTACCTCTGCAA				
	BAK R	GAGTCATAGCGTTCGGTTGATG				

Supplementary table 3: Function of top 158 genes (FDR<0.5) according to STRING DB		
input rank	mapped gene	annotation
1	KLF1	Kruppel-like factor 1 (erythroid); Transcription regulator of erythrocyte development that probably serves as a general switch factor during erythropoiesis. Is a dual regulator of fetal-to-adult [...]
2	BAX	BCL2-associated X protein; Accelerates programmed cell death by binding to, and antagonizing the apoptosis repressor BCL2 or its adenovirus homolog E1B 19k protein. Under stress conditions, under [...]
3	BAP1	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase); Deubiquitinating enzyme that plays a key role in chromatin by mediating deubiquitination of histone H2A and HCFC1. Catalytic com [...]
4	EIF2AK1	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1; Inhibits protein synthesis at the translation initiation level, in response to various stress conditions, including oxidative stress, he [...]
5	MED24	Mediator complex subunit 24; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a brid [...]
6	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator); Induces apoptosis and anoikis. Isoform BimL is more potent than isoform BimEL. Isoform Bim-alpha1, isoform Bim-alpha2 and isoform Bim-alpha3 induce apoptosis [...]
7	SPRED2	Sprouty-related, EVH1 domain containing 2; Tyrosine kinase substrate that inhibits growth-factor- mediated activation of MAP kinase
8	UBE2M	Ubiquitin-conjugating enzyme E2M; Accepts the ubiquitin-like protein NEDD8 from the UBA3- NAE1 E1 complex and catalyzes its covalent attachment to other proteins. The specific interaction with th [...]
9	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5; Helicase that possesses intrinsic ATP-dependent nucleosome-remodeling activity. Complexes conta [...]
10	DMRTC2	DMRT-like family C2; May be involved in sexual development
11	TGFBR1	Transforming growth factor, beta receptor 1; Transmembrane serine/threonine kinase forming with the TGF-beta type II serine/threonine kinase receptor, TGFBR2, the non-promiscuous receptor for the [...]
12	NF1	Neurofibromin 1; Stimulates the GTPase activity of Ras. NF1 shows greater affinity for Ras GAP, but lower specific activity. May be a regulator of Ras activity
13	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1; Oligomeric Apaf-1 mediates the cytochrome c-dependent autocatalytic activation of pro-caspase-9 (Apaf-3), leading to the activation of caspase-3 and apopt [...]
14	SLC30A1	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1; May be involved in zinc transport out of the cell
15	miRNA 142	miRNA molecule
16	TMEM163	Transmembrane protein 163; May bind zinc and other divalent cations and recruit them to vesicular organelles
17	FBXO17	F-box protein 17; Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F- box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex. Able to recognize and bind denatured glycoproteins, which are modified wi [...]
18	TARBP2	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2; Required for formation of the RNA induced silencing complex (RISC). Component of the RISC loading complex (RLC), also known as the micro-RNA (miRNA) loading com [...]
19	BLVRB	Biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)); Broad specificity oxidoreductase that catalyzes the NADPH-dependent reduction of a variety of flavins, such as riboflavin, FAD or FMN, biliverdi [...]
20	WDR87	WD repeat domain 87
21	SNX9	Sorting nexin 9; Involved in endocytosis and intracellular vesicle trafficking, both during interphase and at the end of mitosis. Required for efficient progress through mitosis and cytokinesis. [...]
22	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1; Promotes activation of caspases and apoptosis. Promotes mitochondrial membrane changes and efflux of apoptogenic proteins from the mitochondria. [...]
23	KPTN	Kaptn (actin binding protein); Necessary for normal neuromorphogenesis. May be involved in actin dynamics. May play a role in producing the sensory apparatus in hair cells. May play a role in ac [...]
24	RREB1	Ras responsive element binding protein 1
25	HBZ	Hemoglobin, zeta; The zeta chain is an alpha-type chain of mammalian embryonic hemoglobin
26	TSC2	Tuberous sclerosis 2; In complex with TSC1, this tumor suppressor inhibits the nutrient-mediated or growth factor-stimulated phosphorylation of S6K1 and EIF4EBP1 by negatively regulating mTORC1 s [...]
27	NPRL3	Nitrogen permease regulator-like 3 (S. cerevisiae); As a component of the GATOR1 complex, inhibitor of the amino acid-sensing branch of the TORC1 pathway. The GATOR1 complex strongly increases GT [...]
28	DEPDC5	DEP domain containing 5; As a component of the GATOR1 complex, inhibitor of the amino acid-sensing branch of the TORC1 pathway. The GATOR1 complex strongly increases GTP hydrolysis by RRAGA and R [...]
29	SMARCD1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1; Involved in chromatin remodeling. Belongs to the neural progenitors-specific chromatin remodelin [...]

30	ORC2	Origin recognition complex, subunit 2; Component of the origin recognition complex (ORC) that binds origins of replication. DNA-binding is ATP-dependent. The specific DNA sequences that define or [...]
31	ZNF341	Zinc finger protein 341; May be involved in transcriptional regulation
32	CXCL17	Chemokine (C-X-C motif) ligand 17; Plays a role in angiogenesis and possibly in the development of tumors. May be a housekeeping chemokine regulating recruitment of nonactivated blood monocytes a [...]
33	PCGF1	Polycomb group ring finger 1; Component of the Polycomb group (PcG) multiprotein BCOR complex, a complex required to maintain the transcriptionally repressive state of some genes, such as BCL6 an [...]
34	RALGAPA2	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 2 (catalytic); Catalytic subunit of the heterodimeric RalGAP2 complex which acts as a GTPase activator for the Ras-like small GTPases RALA and RALB
35	ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2; ATP-dependent 5'-3' DNA helicase, component of the core- TFIIH basal transcription factor. Involved in nucle [...]
36	YIF1B	Yip1 interacting factor homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
37	WDR33	WD repeat domain 33; Essential for both cleavage and polyadenylation of pre- mRNA 3' ends
38	USP22	Ubiquitin specific peptidase 22; Histone deubiquitinating component of the transcription regulatory histone acetylation (HAT) complex SAGA. Catalyzes the deubiquitination of both histones H2A and [...]
39	miRNA 6888	miRNA molecule
40	PTEN	Phosphatase and tensin homolog; Tumor suppressor. Acts as a dual-specificity protein phosphatase, dephosphorylating tyrosine-, serine- and threonine- phosphorylated proteins. Also acts as a lipid [...]
41	TXNDC2	Thioredoxin domain containing 2 (spermatozoa); Probably plays a regulatory role in sperm development. May participate in regulation of fibrous sheath (FS) assembly by supporting the formation of [...]
42	PPP5D1	PPP5 tetratricopeptide repeat domain containing 1
43	RGS11	Regulator of G-protein signaling 11; Inhibits signal transduction by increasing the GTPase activity of G protein alpha subunits thereby driving them into their inactive GDP-bound form
44	MDN1	MDN1, midasin homolog (yeast); Nuclear chaperone required for maturation and nuclear export of pre-60S ribosome subunits
45	CPSF1	Cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa; Component of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex that plays a key role in pre- mRNA 3'-end formation, recogn [...]
46	TAS2R43	Taste receptor, type 2, member 43; Gustducin-coupled receptor implicated in the perception of bitter compounds in the oral cavity and the gastrointestinal tract. Signals through PLCB2 and the ca [...]
47	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase; Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution. At the onset of apoptosis it proteolytically cleaves poly(ADP- [...]
48	PLGLB2	Plasminogen-like B2; May bind noncovalently to lysine binding sites present in the kringle structures of plasminogen. This may interfere with the binding of fibrin or alpha-2-antiplasmin to plasm [...]
49	FEZF1	FEZ family zinc finger 1; Transcription repressor. Involved in the axonal projection and proper termination of olfactory sensory neurons (OSN). Plays a role in rostro-caudal patterning of the die [...]
50	SSX7	Synovial sarcoma, X breakpoint 7; Could act as a modulator of transcription
51	UBE2Q1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 1; Catalyzes the covalent attachment of ubiquitin to other proteins (Potential). May be involved in hormonal homeostasis in females. Involved in reg [...]
52	RPS4Y2	Ribosomal protein S4, Y-linked 2
53	LRRCC1	Leucine rich repeat and coiled-coil centrosomal protein 1; Required for the organization of the mitotic spindle. Maintains the structural integrity of centrosomes during mitosis
54	ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence); Isoform 1: Non-catalytic component of a structure- specific DNA re [...]
55	LRRK1	Leucine-rich repeat kinase 1
56	MED12	Mediator complex subunit 12; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a brid [...]
57	CDCA7	Cell division cycle associated 7; Participates in MYC-mediated cell transformation and apoptosis; induces anchorage-independent growth and clonogenicity in lymphoblastoid cells. Insufficient to i [...]
58	CCZ1B	CCZ1 vacuolar protein trafficking and biogenesis associated homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
59	PSG5	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5
60	ESM1	Endothelial cell-specific molecule 1; Involved in angiogenesis; promotes angiogenic sprouting. May have potent implications in lung endothelial cell-leukocyte interactions

61	IRX4	Iroquois homeobox 4; Likely to be an important mediator of ventricular differentiation during cardiac development
62	USF2	Upstream transcription factor 2, c-fos interacting; Transcription factor that binds to a symmetrical DNA sequence (E-boxes) (5'-CACGTG-3') that is found in a variety of viral and cellular promote [...]
63	PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide; Serine/threonine-protein kinase that acts as a molecular sensor for DNA damage. Involved in DNA non-homologous end joining (NHEJ) required fo [...]
64	GSTCD	Glutathione S-transferase, C-terminal domain containing
65	TCEB1	Transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C); SIII, also known as elongin, is a general transcription elongation factor that increases the RNA polymerase II transcri [...]
66	ZNF235	Zinc finger protein 235; May be involved in transcriptional regulation
67	ZNF382	Zinc finger protein 382; Functions as a sequence-specific transcriptional repressor
68	CYP2A13	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 13; Exhibits a coumarin 7-hydroxylase activity. Active in the metabolic activation of hexamethylphosphoramide, N,N- dimethylaniline, 2'-methoxy [...]
69	FAM159A	Family with sequence similarity 159, member A
70	DPY19L3	Dpy-19-like 3 (C. elegans); Probable C-mannosyltransferase that mediates C- mannosylation of tryptophan residues on target proteins
71	BBC3	BCL2 binding component 3; Essential mediator of p53/TP53-dependent and p53/TP53- independent apoptosis. Isoform 3 fails to show any growth- inhibitory or apoptotic activity
72	RBM44	RNA binding motif protein 44; Component of intercellular bridges during meiosis. Intercellular bridges are evolutionarily conserved structures that connect differentiating germ cells. Not require [...]
73	NME4	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 4; Major role in the synthesis of nucleoside triphosphates other than ATP. The ATP gamma phosphate is transferred to the NDP beta phosphate via a ping-pong [...]
74	FAM59A	Family with sequence similarity 59, member A; Isoform 1: Acts as an adapter protein that plays a role in intracellular signaling cascades triggered either by the cell surface activated epidermal [...]
75	TACO1	Translational activator of mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I; Acts as a translational activator of mitochondrially- encoded cytochrome c oxidase 1
76	LIPG	Lipase, endothelial; Has phospholipase and triglyceride lipase activities. Hydrolyzes high density lipoproteins (HDL) more efficiently than other lipoproteins. Binds heparin
77	C11orf35	Chromosome 11 open reading frame 35
78	CC2D1A	Coiled-coil and C2 domain containing 1A; Transcription factor that binds specifically to the DRE (dual repressor element) and represses HTR1A gene transcription in neuronal cells. The combination [...]
79	C1QTNF3	C1q and tumor necrosis factor related protein 3
80	PF4	Platelet factor 4; Released during platelet aggregation. Neutralizes the anticoagulant effect of heparin because it binds more strongly to heparin than to the chondroitin-4-sulfate chains of the [...]
81	KCTD5	Potassium channel tetramerisation domain containing 5; Its interaction with CUL3 suggests that it may act as a substrate adapter in some E3 ligase complex. Does not affect the function of Kv chan [...]
82	HSPA1B	Heat shock 70kDa protein 1B
83	RBAK	RB-associated KRAB zinc finger; May repress E2F-dependent transcription. May promote AR- dependent transcription
84	FSTL3	Follistatin-like 3 (secreted glycoprotein); Isoform 1 or the secreted form is a binding and antagonizing protein for members of the TGF-beta family, such us activin, BMP2 and MSTN. Inhibits activ [...]
85	FXYD3	FXYD domain containing ion transport regulator 3; Induces a hyperpolarization-activated chloride current when expressed in Xenopus oocytes. May be a modulator capable of activating endogenous ooc [...]
86	MSMO1	Methylsterol monooxygenase 1; Catalyzes the first step in the removal of the two C-4 methyl groups of 4,4-dimethylzymosterol
87	SMCHD1	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1; Required for maintenance of X inactivation in females and hypermethylation of CpG islands associated with inactive X. Inv [...]
88	ZNF155	Zinc finger protein 155; May be involved in transcriptional regulation
89	CYP27A1	Cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1; Catalyzes the first step in the oxidation of the side chain of sterol intermediates; the 27-hydroxylation of 5-beta- cholestane-3-alpha,7-a [...]
90	PRSS1	Protease, serine, 1 (trypsin 1); Has activity against the synthetic substrates Boc-Phe- Ser-Arg-Mec, Boc-Leu-Thr-Arg-Mec, Boc-Gln-Ala-Arg-Mec and Boc-Val- Pro-Arg-Mec. The single-chain form is mo [...]
91	MED4	Mediator complex subunit 4; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a bridg [...]

92	LZTR1	Leucine-zipper-like transcription regulator 1; Probable transcriptional regulator that may play a crucial role in embryogenesis
93	miRNA 6088	miRNA molecule
94	SAMD4B	Sterile alpha motif domain containing 4B; Has transcriptional repressor activity. Overexpression inhibits the transcriptional activities of AP-1, p53/TP53 and CDKN1A
95	ADIPO2	Adiponectin receptor 2; Receptor for ADIPOQ, an essential hormone secreted by adipocytes that regulates glucose and lipid metabolism (PubMed:12802337, PubMed:25855295). Required for normal body f [...]
96	KLC3	Kinesin light chain 3; Kinesin is a microtubule-associated force-producing protein that may play a role in organelle transport
97	TMEM67	Transmembrane protein 67; Required for ciliary structure and function. Part of the tectonic-like complex which is required for tissue-specific ciliogenesis and may regulate ciliary membrane compo [...]
98	RUNX1T1	Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related); Transcriptional corepressor which facilitates transcriptional repression via its association with DNA-binding transcrip [...]
99	ZNF585A	Zinc finger protein 585A; May be involved in transcriptional regulation
100	MAOA	Monoamine oxidase A; Catalyzes the oxidative deamination of biogenic and xenobiotic amines and has important functions in the metabolism of neuroactive and vasoactive amines in the central nervou [...]
101	DYSF	Dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive); Key calcium ion sensor involved in the Ca(2+)-triggered synaptic vesicle-plasma membrane fusion. Plays a role in the sarcolemma [...]
102	HKR1	HKR1, GLI-Kruppel zinc finger family member; May be involved in transcriptional regulation
103	DOK4	Docking protein 4; DOK proteins are enzymatically inert adaptor or scaffolding proteins. They provide a docking platform for the assembly of multimolecular signaling complexes. DOK4 functions in [...]
104	CNIH4	Cornichon homolog 4 (Drosophila); Involved in G protein-coupled receptors (GPCRs) trafficking from the endoplasmic reticulum to the cell surface; it promotes the exit of GPCRs from the early secr [...]
105	MED19	Mediator complex subunit 19; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a brid [...]
106	NEK9	NIMA-related kinase 9; Pleiotropic regulator of mitotic progression, participating in the control of spindle dynamics and chromosome separation. Phosphorylates different histones, myelin basic pr [...]
107	ADAM30	ADAM metallopeptidase domain 30; May be involved in spermatogenesis and fertilization
108	TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
109	HBG1	Hemoglobin, gamma A
110	MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1; Transcriptional repressor that binds CpG islands in promoters where the DNA is methylated at position 5 of cytosine within CpG dinucleotides. Binding is aboli [...]
111	FAM129B	Family with sequence similarity 129, member B; May play a role in apoptosis suppression. May promote melanoma cell invasion in vitro
112	FAM217B	Family with sequence similarity 217, member B
113	DHX29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29; ATP-binding RNA helicase involved in translation initiation. Part of the 43S preinitiation complex that is required for efficient initiation on mammalia [...]
114	FOXR1	Forkhead box R1
115	VPS13C	Vacuolar protein sorting 13 homolog C (S. cerevisiae)
116	HBG2	Hemoglobin, gamma G; Gamma chains make up the fetal hemoglobin F, in combination with alpha chains
117	MED16	Mediator complex subunit 16; Component of the Mediator complex, a coactivator involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. Mediator functions as a brid [...]
118	CPSF2	Cleavage and polyadenylation specific factor 2, 100kDa; Component of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex that play a key role in pre-mRNA 3'-end formation, recogniz [...]
119	MED23	Mediator complex subunit 23; Required for transcriptional activation subsequent to the assembly of the pre-initiation complex (By similarity). Component of the Mediator complex, a coactivator inv [...]
120	MLF2	Myeloid leukemia factor 2
121	FBXL19	F-box and leucine-rich repeat protein 19; Substrate-recognition component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein)-type E3 ubiquitin ligase complex
122	UNC119B	Unc-119 homolog B (C. elegans); Myristoyl-binding protein that acts as a cargo adapter: specifically binds the myristoyl moiety of a subset of N-terminally myristoylated proteins and is required [...]

123	AIDA	Axin interactor, dorsalization associated; Acts as a ventralizing factor during embryogenesis. Inhibits axin-mediated JNK activation by binding axin and disrupting axin homodimerization. This in [...]
124	VPS13D	Vacuolar protein sorting 13 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)
125	NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1; Highly abundant component of the nuclear matrix where it may serve a non-mitotic structural role, occupies the majority if the nuclear volume (PubMed:10075938 [...])
126	DHRS9	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9; 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase that converts 3-alpha-tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) to dihydroxyprogesterone and 3-alpha-androstan [...]
127	SEMA6B	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B; May play a role in both peripheral and central nervous system development
128	CABIN1	Calcineurin binding protein 1; May be required for replication-independent chromatin assembly. May serve as a negative regulator of T-cell receptor (TCR) signaling via inhibition of calcineurin. [...]
129	miRNA 4742	miRNA molecule
130	CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D
131	CSTF3	Cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa; One of the multiple factors required for polyadenylation and 3'-end cleavage of mammalian pre-mRNAs
132	ARHGAP35	Rho GTPase activating protein 35; Represses transcription of the glucocorticoid receptor by binding to the cis-acting regulatory sequence 5'- GAGAAAAGAAACTGGAGAACTC-3'. May participate in the re [...]
133	FAM108B1	Family with sequence similarity 108, member B1
134	SORCS2	Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 2
135	TTC9B	Tetratricopeptide repeat domain 9B
136	CRYBB3	Crystallin, beta B3; Crystallins are the dominant structural components of the vertebrate eye lens
137	RCE1	RCE1 homolog, prenyl protein protease (<i>S. cerevisiae</i>); Proteolytically removes the C-terminal three residues of farnesylated and geranylated proteins. Seems to be able to process K-Ras, N-Ras, H- [...]
138	CD2	CD2 molecule; CD2 interacts with lymphocyte function-associated antigen (LFA-3) and CD48/BCM1 to mediate adhesion between T-cells and other cell types. CD2 is implicated in the triggering of T- c [...]
139	C19orf40	Chromosome 19 open reading frame 40; Plays a role in DNA repair through recruitment of the FA core complex to damaged DNA. Regulates FANCD2 monoubiquitination upon DNA damage. Induces chromosomal [...]
140	ZC3HC1	Zinc finger, C3HC-type containing 1; Essential component of an SCF-type E3 ligase complex, SCF(NIPA), a complex that controls mitotic entry by mediating ubiquitination and subsequent degradation [...]
141	RNF7	Ring finger protein 7; Probable component of the SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) E3 ubiquitin ligase complex which mediates the ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of target prote [...]
142	GTF3A	General transcription factor IIIA; Interacts with the internal control region (ICR) of approximately 50 bases within the 5S RNA genes, is required for correct transcription of these genes by RNA [...]
143	MFSD9	Major facilitator superfamily domain containing 9
144	ZNF99	Zinc finger protein 99
145	BIN2	Bridging integrator 2; Promotes cell motility and migration, probably via its interaction with the cell membrane and with podosome proteins that mediate interaction with the cytoskeleton. Modulat [...]
146	CMTM8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8
147	CALR3	Calreticulin 3; During spermatogenesis, may act as a lectin-independent chaperone for specific client proteins such as ADAM3. Required for sperm fertility (By similarity). CALR3 capacity for calc [...]
148	TMTC3	Transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3
149	IQCG	IQ motif containing G
150	miRNA 4799	miRNA molecule
151	GABPB2	GA binding protein transcription factor, beta subunit 2; May function as transcription factor capable of interacting with purine rich repeats (GA repeats)
152	LPPR1	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1
153	CALM3	Calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)

154	CILP	Cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase; Probably plays a role in cartilage scaffolding. May act by antagonizing TGF-beta1 (TGFB1) and IGF1 functions. Has the abilit [...]
155	ANAPC15	Anaphase promoting complex subunit 15; Component of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a cell cycle-regulated E3 ubiquitin ligase that controls progression through mitosis and the [...]
156	IAH1	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (S. cerevisiae); Probable lipase
157	miRNA 548f-3	miRNA molecule
158	SHPK	Sedoheptulokinase; Acts as a modulator of macrophage activation through control of glucose metab

C) Les travaux non-publiés sur *SPRED2*

Certains polymorphismes génétiques ont déjà été associés au développement de la LMC ou à la résistance au traitement, tels que l'épissage alternatif au sein du gène pro-apoptotique *BIM*, par exemple.²³¹ Afin de mieux comprendre le rôle individuel de *SPRED2* dans la résistance au traitement dans la LMC, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'état d'activation de *SPRED2* chez certains patients résistants. Une équipe a montré que *SPRED2* était nécessaire à la toxicité cellulaire induite par l'imatinib, et jouait un rôle dans la différenciation érythroïde de cellules immatures de LMC.^{322,323} Par ce fait, et du fait que *SPRED2* était fortement classé dans notre criblage et induisait une diminution importante de la sensibilité à l'imatinib, nous nous sommes intéressés à l'état du gène *SPRED2* et à son niveau d'expression dans les cellules de patients LMC.

Nous avons utilisé huit échantillons de patients sensibles à l'imatinib, et sept échantillons de patients résistants au traitement. Ces derniers ne présentaient pas de mutations dans le gène *BCR-ABL1* pouvant expliquer une résistance. Ces patients résistants présentent une forme de résistance indépendante de *BCR-ABL1*.

Il n'y a pas de différences d'expression des transcrits *SPRED2* entre ces deux populations au diagnostic. Chez ces patients sensibles ou résistants, les cellules leucémiques expriment globalement le suppresseur de tumeur *SPRED2* de manière similaire (**Figure 35**).

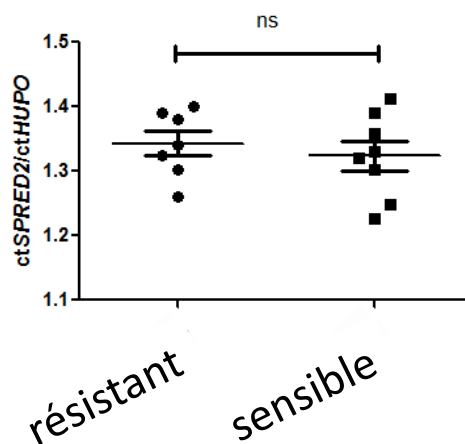


Figure 35 : Niveaux d'expression de l'ARNm *SPRED2* dans des patients sensibles vs résistants

En parallèle des analyses de niveaux de transcrit de *SPRED2*, nous avons séquencé l'ADNc de ce gène afin de vérifier si certains patients résistants possédaient des polymorphismes au sein de ce gène. Après séquençage par Sanger, aucun polymorphisme n'a été détecté au sein de la population résistante ou au sein de la population sensible.

Finalement, nous nous sommes intéressés au niveau d'expression de ce gène au cours de la différenciation hématopoïétique afin de rechercher si *SPRED2* pouvait être exprimé de manière différentielle dans les cellules progénitrices de LMC qui sont moins sensibles au traitement. Les cellules leucémiques ont été isolées à partir de cytophérèse de quatre patients résistants au traitement, puis triées en cytométrie en flux par rapport à l'expression du marqueur CD38. En effet, les cellules leucémiques différenciées CD38⁺ expriment ce marqueur, alors que les cellules immatures, résistantes à l'imatinib, l'expriment peu. D'après cette étude préliminaire, l'expression de *SPRED2* semble être différente entre ces deux populations (**Figure 36**). En effet, son expression semble plus élevée dans les cellules immatures pourrait expliquer le phénotype de quiescence des cellules progénitrices, et lorsque la cellule se différencie, elle perd l'expression de ce gène car la voie RAS devient de plus en plus active et la cellule prolifère davantage. De manière évidente, ces travaux ont été effectués sur un nombre restreint de patients et avant d'en tirer des conclusions plus élaborées, nous devons répéter l'expérience sur un plus grand nombre de sujets.

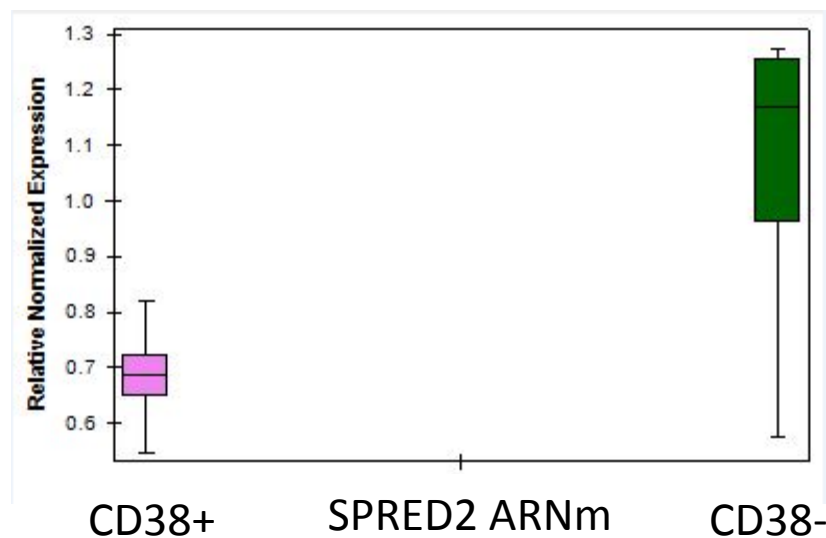


Figure 36 : Niveaux d'expression de l'ARNm *SPRED2* dans les populations cellulaires CD38⁺ vs CD38⁻.

Discussion

Les avancées technologiques des dernières années, telles que le séquençage nouvelle génération, la technique CRISPR-Cas9 et la bio-informatique, nous ont permis d'effectuer un criblage génétique efficace afin de découvrir une variété de mécanismes cellulaires différents impliqués dans la résistance au traitement par imatinib dans la leucémie myéloïde chronique. Parmi les gènes enrichis dans notre criblage, nous avons identifiés certains gènes qui avaient déjà été impliqués dans la résistance à l'imatinib ou la progression de la LMC (*BAX*³²⁴, *BIM*²³¹, *SPRED2*³²², *BAP1*³²¹...), mais nous avons également trouvé certains nouveaux gènes qui pourraient moduler la réponse au traitement. De plus, nous avons découvert des mécanismes cellulaires qui sembleraient jouer un rôle sur cette réponse au traitement tel que la régulation de la transcription par le complexe Mediator, l'ubiquitinylation de protéines ou la maturation d'ARNm. Certaines des protéines ou des mécanismes cellulaires, codés par ces gènes, peuvent être ciblées par des agents thérapeutiques.

La combinaison de traitements anticancéreux a aussi été employée afin de contourner la résistance au traitement et de trouver des associations d'agents thérapeutiques efficaces contre la LMC. Nous avons spécifiquement ciblé BCR-ABL1, l'apoptose et la voie des MAPK mais nous aurions pu choisir d'autres combinaisons pour étudier l'implication de différentes voies de signalisation dans le cancer. Nous allons aborder les autres types de combinaisons possibles qui pourraient avoir un effet bénéfique ou synergique contre la progression de la LMC. Ces combinaisons pourraient également être utilisées pour le traitement d'autres types de cancer car les mêmes voies de signalisation ou mécanismes cellulaires sont dérégulés dans un grand nombre de cellules tumorales (les « caractéristiques du cancer »).

La différence entre la résistance acquise au traitement et la progression pathologique vers un stade plus développé n'est pas forcément très marquée. En effet, certaines mutations génétiques ou changement d'expression de gènes peuvent agir sur la résistance au traitement, sans néanmoins « aggraver » le phénotype cancéreux. A l'inverse, certaines mutations peuvent de manière concomitante causer la résistance et rendre le cancer plus agressif, en contournant l'effet du traitement par l'activation d'une seconde voie de prolifération, par exemple. Si ces mutations touchent des gènes impliqués dans les « caractéristiques du cancer », il y a de fortes chances que la résistance créée aggrave la pathologie et accélère le passage de la phase chronique vers les phases plus avancées (accélérée ou blastique).

Au cours de cette discussion, nous allons aborder le rôle potentiel que d'autres gènes identifiés lors du criblage pourraient avoir vis-à-vis de la résistance au traitement. Ensuite, nous

discuterons de la façon dont ces défauts génétiques pourraient être ciblés, et terminerons avec une discussion générale sur le travail effectué au cours de ma thèse. Finalement, nous resumerons de manière schématique les gènes, les voies de signalisation et les potentiels agents thérapeutiques qui pourraient affecter la résistance au traitement dans la LMC (**Figure 37**).

A) Le rôle potentiel des gènes en haut du classement (FDR < 0,01) dans la résistance au traitement contre la LMC

1) KLF1 (Krüppel-like Factor 1)

KLF1 ou *EKLF* pour « Erythroid Krüppel-like factor » est un gène situé sur le chromosome 19 qui code un facteur de transcription impliqué dans la maturation correcte des cellules érythroïdes.³²⁵ Ce facteur de transcription fait partie d'une famille de 17 facteurs de transcription KLFs, qui sont impliqués dans un grand nombre de mécanismes cellulaires comme par exemple, la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la migration.³²⁶

KLF1 semble avoir un rôle dans plusieurs mécanismes cellulaires différents. À l'origine, *KLF1* a été découvert dans une lignée érythroleucémique murine³²⁷. L'expression de ce gène est primordiale lors de la morphogenèse embryonnaire murine car la perte de fonction homozygote de *KLF1* aboutit dans le développement fatal de la β -thalassémie³²⁸, une anémie sévère des globules rouges. Depuis, le rôle potentiel de ce gène dans la régulation du cycle cellulaire a été élucidé. En effet, la réintroduction rétrovirale de *KLF1* dans une lignée cellulaire érythroïde murine *KLF1*^{-/-} diminuait significativement la prolifération de ces cellules et induisait de nouveau une différenciation érythroïde et une production d'hémoglobine via une augmentation de l'expression de β -globuline.³²⁹ De plus, une autre étude a démontré que *KLF1* interagit directement avec E2f2, un régulateur du cycle cellulaire lors de l'érythropoïèse, et contrôle l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire.³³⁰

Ce gène pourrait en effet avoir un rôle dans le développement leucémique car les cellules LMC de phase blastique ou les cellules de leucémie aiguë myéloïde (LAM) sont caractérisées par un blocage dans la différenciation cellulaire et une invasion de cellules immatures dans le sang et dans la moelle osseuse.³³¹ Une étude sur des patients atteints de LAM a démontré une diminution significative de l'expression de certains facteurs KLF (KLF2, KLF3, KLF5 et KLF6) dans les cellules leucémiques par rapport aux cellules normales.³³² Malheureusement, les auteurs ont exclu *KLF1* de leur étude à cause de son rôle essentiel dans l'érythropoïèse.

Dans notre modèle cellulaire, *KLF1* pourrait jouer un rôle sur la différenciation érythroïde de la lignée K562 ou sur la prolifération cellulaire de cette dernière. Un blocage dans la différenciation ou une augmentation de la prolifération pourrait causer le phénotype de résistance à l'imatinib que nous avons observé lors du criblage GeCKO. Par contre, il faut savoir que la lignée cellulaire K562

est une lignée érythroleucémique BCR-ABL1-positif, donc l'effet de l'extinction de *KLF1* dans cette lignée est peut-être exacerbé.³³³

2) BAX (BCL-2-associated X protein)

Le gène *BAX* situé sur le chromosome 19 a été le premier membre pro-apoptotique de la famille BCL-2 à être identifié.³² De manière physiologique, la protéine BAX codée par ce gène se situe dans le cytoplasme mais se concentre sur la membrane extérieure mitochondriale lors de l'initiation de l'apoptose.^{334,335} Une fois ancrée sur la mitochondrie, elle peut former des oligomères seule ou avec une protéine de fonction similaire, BAK, pour activer le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme et l'activation de l'apoptose intrinsèque.²⁵

L'expression de BAX est étroitement liée à l'état d'activation du gardien du génome TP53, qui peut induire sa transcription en réponse à des dommages à l'ADN pour induire l'apoptose.^{336,337} Par contre, cet effet peut être neutralisé par une diminution de l'expression de BAX, causée par le polymorphisme G(-248)A dans son promoteur. Une diminution de cette protéine pro-apoptotique a été corrélée à des niveaux faibles d'apoptose dans différents types de cancers (ex : poumon³³⁸, Leucémie Lymphoblastique Chronique^{339,340}) et pathologies (ex : ostéomyélite³⁴¹). Ce défaut dans l'apoptose peut, dans certains cas, générer des formes de résistance aux traitements anticancéreux. A l'inverse, l'activation de BAX par des BH3-mimétique, tels que le navitoclax, entraîne la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses et représente une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement de tumeurs dans le futur.

Dans notre étude, nous avons démontré que les lignées K562 BAX KO et LAMA-84 BAX KO présentent une diminution de sensibilité au traitement par l'imatinib. De manière intéressante, le traitement de ces cellules résistantes par des BH3-mimétiques ne permet pas de retrouver une sensibilité normale au traitement. Dans ces lignées cellulaires, BAX semblerait être essentielle pour l'activation de l'apoptose intrinsèque dépendante du relargage du cytochrome c. De plus, une extinction du gène *BAX in vitro* n'affecte en aucun cas les niveaux de transcrits de son partenaire, *BAK*.

3) BAP1 (BRCA1 associated protein 1)

« BRCA1 associated protein » – 1 (BAP1) est une enzyme de déubiquitylation codée par le gène BAP1 localisé sur le chromosome 3. Différentes études caractérisent cette protéine en tant que suppresseur de tumeurs, car des mutations perte-de-fonction dans ce gène augmentent la

prédisposition à plusieurs pathologies néoplasiques, comme le mésothéliome et le cancer de la peau mélanocytaire.^{342,343} De plus, des mutations dans *BAP1* ont été identifiées dans un grand nombre de cancers différents, tels que le cancer du poumon, du sein, de la peau et rénal.^{344–346} De ce fait, une condition pathologique nommée « the BAP1 cancer syndrome » a été décrite. En effet, une centaine de familles ayant une mutation hétérozygote dans *BAP1* a été décrite et chaque porteur de la mutation a développé une ou plusieurs tumeurs malignes au cours de sa vie.^{347,348}

La fonction de déubiquitinylation et la localisation de cette protéine semblent être cruciales afin de maintenir son activité antiproliférative *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de souris.^{349,350} De ce fait, les effets suppresseurs de tumeurs de *BAP1* peuvent passer par une régulation de la transcription dépendante d'ASXL1 ou ASXL2³⁵¹, ou par une régulation de la mort cellulaire en contrôlant le flux de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie.³⁵⁰ Grâce à son activité de déubiquitinylation, *BAP1* stabilise une pompe à calcium sur le réticulum endoplasmique, nommée « IP3R3 », qui permet d'expulser cet ion vers la mitochondrie et induire une apoptose dépendante du relargage de cytochrome c.³⁵² Les cellules *BAP1* mutées vont donc pouvoir accumuler des dommages à l'ADN sans effectuer une activation de l'apoptose.

La diminution d'expression de *BAP1* dans des pathologies myéloïdes a précédemment été décrite. Des patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), LMC et LAM possèdent tous en moyenne des niveaux d'expression de *BAP1* inférieurs aux sujets sains. Ce niveau bas de *BAP1* dans la LMC réduit la stabilité de *BCRA1*, un réparateur majeur des dommages à l'ADN.³²¹

L'ensemble de ces données montrent que *BAP1* joue un rôle extrêmement important dans la cancérogenèse en agissant de manière concomitante sur la réparation des dommages à l'ADN, la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs dépendantes de *ASXL1* et *ASXL2*, et l'activation de l'apoptose dépendante du Ca^{2+} . Ces mécanismes pourraient tous être impliqués dans la résistance au traitement par imatinib dans la lignée K562.

4) EIF2AK1 (Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1)

Le gène *EIF2AK1* codant la kinase HRI (Heme Regulated Inhibitor) est localisé sur le chromosome 7. Cette protéine agit en inhibant la traduction protéique au niveau de l'initiation de la traduction en phosphorylant le facteur eIF2 α .^{353,354} Il a été montré que l'inhibition de la phosphorylation de ce dernier causait la transformation tumorale *in vitro* sur des cellules NIH 3T3,

car une suractivation de la traduction permettait la création de nouvelles protéines nécessaires lors de la prolifération cancéreuse.³⁵⁵ C'est pour cela qu'une équipe à Harvard aux États-Unis a développé une molécule, le BTdCPU, capable de stabiliser la forme active de HRI, ce qui permet de maintenir eIF2 α sous forme phosphorylé et inactive.³⁵⁶⁻³⁵⁸ L'inhibition de l'initiation de la traduction peut efficacement bloquer la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses (poumon, prostate, mélanome) *in vitro*³⁵⁹ et de cellules primaires de myélome multiple³⁶⁰.

L'activation de cette kinase pourrait agir également sur la sensibilité au traitement par l'imatinib dans les cellules BCR-ABL-positives. Lorsque cette protéine est éteinte par technologie CRISPR-Cas9, les cellules deviennent résistantes à l'inhibition de la protéine de fusion, donc l'activation de HRI pourrait, à l'inverse, aider à détruire les cellules différenciées résistantes au traitement ou même les cellules souches insensibles aux inhibiteurs de tyrosine kinase.

5) MED24 (Mediator of RNA Polymerase II transcription subunit 24)

La protéine MED24, qui est codée par le gène de même nom situé sur le chromosome 17, fait partie d'un ensemble de protéines différentes qui peuvent se rassembler pour former le complexe Mediator.³⁶¹ Ce complexe d'environ 21 à 26 sous-unités selon son état d'activation, est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de gènes. Au sein de ce complexe multimérique, MED24 se situe au niveau de la queue du complexe, région régulatrice de reconnaissance de séquences nucléotidiques dans l'ADN, avec d'autres sous-unités notamment MED16 et MED23.³⁶² Ces trois sous-unités semblent agir de manières connectées et synergiques au sein du complexe Mediator et agissent sur l'amplification du signal de transcription, notamment autour de la voie de prolifération Ras/MAPK en réponse à l'activation de la voie du récepteur œstrogène dans des cellules épithéliales mammaires.³⁶³

Le complexe Mediator, notamment les sous-unités qui composent la queue de ce complexe comme MED24, pourraient jouer un rôle important dans la transduction des signaux de prolifération et de survie de la cellule cancéreuse.³⁶¹ L'inhibition de cette sous-unité pourrait agir sur la réponse au traitement en modulant la réponse transcriptionnelle de la cellule suite au choc oncogénique par thérapie ciblée. De plus, certaines sous-unités du complexe Mediator peuvent agir seules dans le cytoplasme pour avoir une activité particulière, comme MED12 par exemple.³⁶⁴ MED24 pourrait possiblement agir de cette manière pour influencer la progression cancéreuse et la réponse au traitement.

6) BCL2L11 (BCL-2-like protein 11 ou BIM)

Le gène qui code la protéine pro-apoptotique BCL2L11 ou BIM, localisé sur le chromosome 2, est souvent associé à la progression cancéreuse et la résistance au traitement. En effet, cette protéine joue un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose intrinsèque et un polymorphisme au sein de son gène est souvent associé à une diminution de la mort cellulaire programmée et à une résistance aux thérapies ciblées contre certains type de cancer (leucémie myéloïde chronique, cancer du poumon non-à-petites cellules et l'adénocarcinome pulmonaire).³⁶⁵⁻³⁶⁸ Le polymorphisme le plus répandu dans ce gène entraîne un épissage alternatif et le saut d'un exon qui possède le domaine BH3, essentiel pour la transduction du signal apoptotique dans la cellule.³⁶⁵

Tout comme pour BAX, l'utilisation de BH3-mimétiques pour libérer les protéines pro-apoptotiques telles que BIM, induit l'apoptose intrinsèque dans les cellules cancéreuses en activant ce mécanisme si important pour la réponse correcte au traitement et pour le développement tumoral.³⁴ Dans notre étude nous avons démontré que les lignées K562 BIM KO et LAMA-84 BIM KO possèdent une diminution de sensibilité au traitement par l'imatinib, mais sont sensibles à la combinaison de l'imatinib avec le navitoclax (BH3-mimétique). Actuellement, il existe un essai clinique pour les patients atteints de LMC pour vérifier l'efficacité d'une combinaison similaire (dasatinib et venetoclax : ClinicalTrials.gov #NCT02689440).

7) SPRED2 (Sprouty Related EVH1 Domain Containing 2)

Le suppresseur de tumeur SPRED2 est codé par le gène *SPRED2* situé sur le chromosome 2. Il fait partie de la famille de gènes Sprouty, qui régulent négativement l'activation de voies de prolifération.³⁶⁹ SPRED2 agit en tant qu'homodimère ou hétérodimère avec SPRED1, et induit une diminution de l'activation de la voie des MAPK.³⁷⁰ L'analyse transcriptomique de l'ARNm de *SPRED2* montre une corrélation entre la diminution de l'expression de ce gène avec la survenue de cancer de la prostate.³⁷¹ Des études *in vitro* ont également montré que SPRED2 jouait un rôle important dans la prolifération de l'hépatocarcinome cellulaire³⁷² ainsi que dans la réponse au traitement par l'imatinib de la LMC³²².

Nous avons également montré *in vitro* que la lignée cellulaire K562 SPRED2 KO survivait mieux en présence d'imatinib grâce à une suractivation de la voie des MAPK. Une inhibition combinée de BCR-ABL1 par l'imatinib et de MEK1/2, un facteur en aval de RAS dans la voie des MAPK, par le pimasertib, permettait de retrouver une sensibilité au traitement et de contourner la

résistance initiale à l'imatinib. Nous nous sommes également intéressés au gène *SPRED2* que nous avons séquencé chez 7 patients résistants au traitement (*BCR-ABL1* non-muté). Nous n'avons pas trouvé de mutation dans ce gène, ni de différence d'expression de l'ARNm chez ces patients. Une suractivation de la voie des MAPK pourrait toujours avoir lieu chez ces patients, mais de manière indépendante de *SPRED2*.

8) UBE2M (NEDD8-conjugating enzyme Ubc12)

La protéine codée par le gène *UBE2M* situé sur le chromosome 19 est impliquée dans un processus post-traductionnel similaire à l'ubiquitinylation, nommé la neddylation : un mécanisme de conjugaison covalente de la protéine NEDD8 sur des substrats protéiques.³⁷³ Les cibles de la neddylation sont principalement les protéines Cullin (*CUL1*, *CUL2*, *CUL3* et *CUL4*) qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire.³⁷⁴ En effet, ces protéines font partie du complexe d'ubiquitinylation SCF (*SKP1/CUL/F-box-protein*) qui joue un rôle primordial dans les transitions G1-S et G2-M dans le cycle cellulaire.³⁷⁵

De nos jours, il existe peu de travaux qui étudient la fonction propre de la protéine *UBE2M* dans le contexte cancéreux. Par contre, deux études intéressantes montrent que cette protéine peut être impliquée dans la régulation de l'apoptose via la régulation de la voie *UBE2F-CUL5/NOXA*³⁷⁶ et dans la réponse aux dommages à l'ADN³⁷⁷. Ces données pourraient expliquer un rôle potentiel de la protéine *UBE2M* dans la résistance au traitement par imatinib.

De manière intéressante, le knock-out par CRISPR-Cas9 d'*UBE2M* dans une lignée cellulaire de mélanome crée également une résistance au traitement ciblé par verumafenib.³⁰⁰ Ce gène pourrait en effet causer la résistance au traitement ciblé dans de multiples cancers grâce à des mécanismes protéiques peu étudiés, où la résistance pourrait être due à la cassure double brin du gène par CRISPR-Cas9. En effet, le gène *UBE2M* est localisé proche du télomère du chromosome 19. Une étude récente a démontré que les cassures doubles brins proches d'une région télomérique peuvent causer des grandes délétions chromosomiques et des pertes de télomères. Ces dommages considérables pourraient causer des remaniements chromosomiques à l'origine d'une éventuelle résistance au traitement.

B) Rôle potentiel de différents mécanismes dans la résistance au traitement dans la LMC

Les huit gènes figurants ci-dessus ont été étudiés pendant ma thèse et l'extinction de l'expression de ces derniers par CRISPR-Cas9 diminue la sensibilité des lignées cellulaires au traitement par l'imatinib. Nous avons étudié le rôle de *SPRED2*, *BIM* et *BAX* plus en détail vis-à-vis de la résistance au traitement. Les mécanismes de résistance causés par le knock-out de ces gènes ont été élucidés et nous avons proposé des thérapies combinatoires pour augmenter l'efficacité du traitement. D'autres gènes ou complexes protéiques, non-étudiés dans notre travail, pourraient également jouer un rôle primordial sur la sensibilité au traitement de la cellule différenciée ou sur la résistance de la cellule souche leucémique.

1) Le rôle essentiel de l'apoptose intrinsèque

L'activation de l'apoptose intrinsèque est un mécanisme crucial pour l'induction de la mort cellulaire programmée suite à une inhibition de l'addiction oncogénique dans le cancer.¹⁸⁸ En effet, dans la LMC, lorsque l'activité de BCR-ABL1 est bloquée par un inhibiteur de tyrosine kinase, les cellules basculent vers l'apoptose qui est d'ores-et-déjà amorcée grâce au niveau élevé de prolifération.^{172,189} Dans notre criblage nous avons découvert l'importance de plusieurs gènes pro-apoptotiques vis-à-vis de la réponse au traitement et l'induction de l'apoptose. En effet, *BAX* (rang : 2), *BIM* (rang : 6), *APAF1* (rang : 13), *PMAIP1/NOXA* (rang : 22), *CASP3* (rang 47) et *BBC3/PUMA* (rang : 71) sont tous significativement enrichis (FDR < 0,33 et p-value < 0,001).

L'induction de l'apoptose intrinsèque avec des molécules BH3-mimétiques a été effectuée lors de ce travail pour sensibiliser de nouveau les cellules résistantes à l'imatinib. D'autres travaux utilisent ce type de traitement pour induire la mort cellulaire programmée et actuellement il existe plusieurs essais cliniques qui emploient ce type de thérapie seule ou en combinaison.^{80,81,83,378} Par contre, nous avons démontré que la résistance *in vitro* de l'imatinib sur des lignées cellulaires LMC causée par extinction de *BAX*, ne pouvait pas être contournée par l'administration de BH3-mimétiques. Une stratégie thérapeutique potentielle serait d'activer la voie de l'apoptose extrinsèque indépendante de la mitochondrie par activation du récepteur TRAIL (« tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand »), par exemple.^{379,380} Cette stratégie a déjà été étudiée

dans le contexte de la LMC et l'activation de la voie TRAIL peut spécifiquement détruire certaines lignées K562 résistantes à l'imatinib.³⁸¹

2) L'inhibition des voies de prolifération RAS/MAPK et PI3K/mTOR

Le blocage de BCR-ABL1 par inhibiteur de tyrosine kinase induit une diminution brutale de l'activation des voies en aval de cette protéine de fusion, notamment RAS/MAPK, PI3K/mTOR et JAK2/STAT5. Ce dérèglement dans la signalisation cellulaire induit une activation de l'apoptose intrinsèque. Par contre, si les suppresseurs de tumeurs impliqués dans l'inhibition de ces voies ne sont pas fonctionnels, le « choc oncogénique » par inhibiteur de BCR-ABL1 est moins fort et la cellule peut continuer à survivre, devenant ainsi résistante au traitement. Notre travail a mis en évidence certains suppresseurs de tumeurs qui, une fois inactivés, pourraient diminuer la sensibilité de la cellule leucémique au traitement.

Parmi ces gènes, nous avons démontré l'importance de *SPRED2* (rang : 7) *in vitro* dans nos travaux et montré qu'une inhibition concomitante de MEK1/2 par le pimasertib et de BCR-ABL1 par l'imatinib pouvait de nouveau éliminer les cellules résistantes grâce à une suractivation de la voie MAPK. De plus, dans notre criblage, nous avons trouvé d'autres suppresseurs de RAS qui pourraient avoir un effet similaire à *SPRED2*, tels que *SPRED1* (rang : 562, ayant une p-value = 0,02 et un FDR = 0,8) et *NF1* (rang : 12). *NF1* (neurofibromine 1) est un suppresseur de tumeur puissant qui inhibe la voie RAS/MAPK en accélérant l'hydrolyse du GTP sur la protéine RAS, entraînant ainsi son inactivation.³⁸² Des mutations dans ce gène peuvent causer une pathologie nommée neurofibromatose de type 1, et peuvent dans certains cas augmenter la prolifération cellulaire dans certains types de cancer.^{383,384} Une extinction de ce gène, ainsi que d'autres gènes qui sont impliqués dans la suppression de l'activation de la voie des MAPK (*NF1*, *SPRED2*, *SPRED1*...), peuvent causer la résistance à l'imatinib dans les tumeurs gastro-intestinales stromales (GIST) due à une hyperactivation de cette voie de signalisation.³⁸⁵

De plus, d'autres gènes enrichis dans le criblage pourraient affecter la réponse au traitement par l'imatinib en modulant des voies qui sont associées à RAS. *RALGAPA2* (rang : 34) code une protéine qui inhibe RALA et RALB (« Ras-related protein » A ou B), qui sont également impliquées dans la prolifération cellulaire.³⁸⁶ *RGS11* (rang : 43) code une protéine à activité GTPase qui est aussi impliquée dans la cancérogenèse dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire.³⁸⁷

De façon similaire, une hyperactivation de la voie PI3K/mTOR semble causer *in vitro* la résistance à l'imatinib de la lignée cellulaire K562. Des gènes suppresseurs de tumeurs de cette voie,

NPRL3 (rang : 27), *DEPDC5* (rang : 26), *PTEN* (rang : 40), *TSC1* (rang : 237) et *TSC2* (rang : 26) sont tous bien classés dans notre criblage GeCKO. Des mutations au sein de *PTEN*, ou des pertes d'expression de ce gène sont fréquemment retrouvées dans plusieurs types de cancer et sont généralement signe d'un mauvais pronostic.^{388,389} De manière physiologique, *PTEN* est une phosphatase qui contrebalance l'activité de la kinase, *PI3K*.³⁹⁰ Lorsque *PTEN* est absente ou non fonctionnelle, *PI3K* phosphoryle *PIP2* qui, dans sa nouvelle forme active (*PIP3*), qui peut ainsi permettre l'activation et la phosphorylation d'*AKT*. Une fois activée, phospho-*AKT* peut augmenter la transcription de gènes du cycle cellulaire, bloquer l'apoptose et induire l'activation du complexe *mTOR*.³⁹¹ Deux gènes suppresseurs de tumeurs importants pour la régulation de l'activité de *mTOR* sont *TSC1* et *TSC2*. En effet, les protéines codées par ces gènes inhibent l'activité du complexe *mTOR* et bloquent la prolifération cellulaire.³⁹² Aussi, les protéines *NPRL3* et *DEPDC5* font parties d'un complexe, nommée *GATOR1*, qui agit aussi en inhibant *mTOR*.³⁹³ Ces informations aident à comprendre comment une inactivation de *PTEN*, *GATOR1*, *TSC1* ou *TSC2* peut affecter la prolifération cellulaire et la résistance au traitement par imatinib. Si la voie *PI3K/mTOR* n'est pas suffisamment contrôlée, les cellules pourraient échapper aux effets de l'inhibition de *BCR-ABL1*.

3) La régulation de la transcription de gènes

Au cours de l'analyse des gènes qui étaient enrichis dans le criblage GeCKO de résistance à l'imatinib, nous avons mis en évidence plusieurs facteurs impliqués dans la régulation de la transcription. De manière intéressante, certaines sous-unités du complexe Mediator sont significativement associées à la résistance au traitement. Nous avons déjà abordé *MED24* car il était classé parmi les meilleurs gènes avec un $FDR < 0,01$, mais neuf autres sous-unités de ce complexe sont également enrichies ($p\text{-value} < 0,05$) dans ce criblage (Figure Supplémentaire S4 de l'article 2). La moitié de ces sous-unités enrichies sont localisées, comme *MED24*, dans la partie régulatrice du complexe (la queue ou « tail »). De plus, toutes les sous-unités du sous-groupe *MED16*, *MED23* et *MED24* sont enrichies dans notre travail, montrant un possible rôle de ces protéines vis-à-vis de la résistance au traitement. Ces protéines jouent possiblement un rôle sur la reconnaissance et la transcription de facteurs suppresseurs de tumeurs ou pro-apoptotiques car lorsque ces sous-unités sont inactives, la cellule présente une diminution de la sensibilité au traitement par l'imatinib. L'étude de Shalem *et al.*, qui rapporte un criblage GeCKO afin de trouver des gènes impliqués dans la résistance au verumafenib dans le mélanome, a montré l'importance de certaines sous-unités du complexe Mediator ; quatre sous-unités sont classées parmi les 150 meilleurs gènes dans nos deux

études indépendantes (*MED12*, *MED16*, *MED19* et *MED23*).³⁰⁰ Il reste énormément de travail à effectuer sur ce complexe afin de bien comprendre par quel mécanisme il est impliqué dans la résistance au traitement, mais son rôle pourrait être similaire dans différents types de cancer.

D'autres protéines qui sont impliquées dans la régulation de la transcription sont aussi fortement enrichies dans notre crible (*FEZF1* (rang : 49), *ZNF235* (rang : 66), *ZNF282* (rang : 67) ...), mais leurs rôles concernant la résistance au traitement par l'imatinib restent inconnus.

4) La réparation des dommages à l'ADN

La réparation des dommages à l'ADN est cruciale pour le maintien de l'intégrité génomique de la cellule. Des défauts dans la détection de dommages à l'ADN peuvent participer au développement cancéreux. Deux gènes *ERCC1* et *ERCC2*, impliqués dans la réparation de dommages de l'ADN, via la voie de réparation de l'excision de nucléotides (NER), sont fortement enrichis dans le criblage GeCKO de résistance à l'imatinib (respectivement rang : 54 et 35). En effet, lorsque ces gènes sont inactivés par CRISPR-Cas9, il semblerait que la cellule leucémique puisse résister au traitement par l'imatinib. Dans l'introduction de cette thèse, nous avons parlé de ces gènes lors de la résistance au traitement par chimiothérapie en cis-platine.¹¹⁵ En effet, la surexpression d'*ERCC1* permet de réparer les erreurs fatales de l'ADN causées par ce type de traitement. L'instabilité génomique et l'accumulation de dommages à l'ADN participent au développement tumoral. Même si les mutations germinales dans ces gènes sont très rares, les conséquences de telles aberrations génomiques sont graves, avec des cas des vieillissements accélérés, une prédisposition élevée au cancer de la peau à un jeune âge, ou même des détériorations neurologiques rapides.³⁹⁴ *ERCC1* et *ERCC2* ont un rôle non-négligeable lors du développement de cellules cancéreuses et lors de la réponse au traitement.

PRKDC (rang : 63) code une autre protéine qui est impliquée dans la régulation de la réparation des dommages à l'ADN. Des mutations dans ce gène ont été corrélées à la progression aux cellules cancéreuses colorectales et pourraient être également associées à la résistance au traitement dans la LMC.³⁹⁵

5) L'ubiquitinylation de protéines

Un autre mécanisme cellulaire intéressant qui pourrait être impliqué dans la résistance au traitement est le mécanisme d'ubiquitinylation de protéines associées au cycle cellulaire. En effet, le criblage GeCKO a permis d'identifier certaines sous-unités du complexe d'ubiquitinylation SCF (« Skp, Cullin, F-box containing »). Comme précédemment indiqué, *UBE2M* (rang : 8) est fortement enrichi dans le criblage et peut avoir un rôle vis-à-vis de la résistance au traitement grâce à son activité régulatrice des protéines Cullin du complexe SCF. De plus, deux gènes codant des sous-unités de type « F-box » ont été trouvés fortement associés à la résistance au traitement, *FBXO17* (rang : 17) et *FBXL19* (rang : 121), ainsi que deux gènes codants des sous-unités supplémentaires essentielles à la formation de ce complexe, *RNF7* (rang : 141) et *ZC3HC1* (rang : 141).

L'association correcte du complexe SCF est essentielle pour la dégradation de certaines protéines associées dans la régulation de cycle cellulaire.³⁷⁵ *FBXO17* code une protéine qui est impliquée dans la dégradation de glycoprotéines associées non seulement dans la régulation du cycle cellulaire mais aussi dans la régulation d'expression de protéines du réticulum endoplasmique.³⁹⁶ Le rôle de cette protéine concernant la prolifération cellulaire est peu étudié. La protéine *FBXL19*, quant à elle, joue un rôle important dans la dégradation de RhoA³⁹⁷ (« Ras homolog gene family, member A »), une protéine qui est souvent surexprimée dans différents types de cancer et qui est associée à une prolifération et une capacité de migration cellulaire élevée^{398,399}. Lorsque *FBXL19* est sous-exprimée ou non fonctionnelle, l'accumulation de RhoA dans les cellules cancéreuses peut aider à la transformation néoplasique et à l'augmentation de la prolifération cellulaire. *ARHGAP35* (rang : 132), quant à elle, joue sur l'activation transcriptionnelle de RhoA et pourrait aussi participer à la prolifération cancéreuse.^{400,401}

Finalement, *RNF7* semble aussi jouer un rôle sur la prolifération cellulaire mais à l'inverse de ce que nous trouvons dans notre criblage. En effet, les données sur cette protéine indiquent que *RNF7* régule positivement la prolifération cellulaire. Un modèle cellulaire de cancer de la prostate knock-out pour ce gène possède une prolifération cellulaire diminuée par inactivation de la voie des MAPK.⁴⁰² Nous observons, de manière contradictoire, une résistance au traitement qui est associée à l'extinction de ce gène. Le rôle de *RNF7* dans la régulation de la prolifération dans les cellules K562 semble différent de celui de la lignée de cancer de la prostate. Certaines formes du complexe SCF semblent affecter la réponse au traitement par l'imatinib, et cibler cet ensemble multiprotéique pourrait être envisageable en tant que thérapie anticancéreuse.

6) La maturation et le clivage 3' des ARNm

Un dernier processus cellulaire qui semblait avoir un rôle intéressant dans la réponse au traitement par l'imatinib est le mécanisme de maturation et de clivage 3' des ARNm. En effet, au cours de ce travail, plusieurs gènes, codant des protéines ayant cette activité, semblent être associées à la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la LMC. *CPSF1* (rang : 45), *CPSF2* (rang : 118), *CSTF3* (rang : 131) et *WDR33* (rang : 37) sont tous enrichis dans notre criblage GeCKO et codent des protéines qui agissent sur la maturation et le clivage 3' des ARNm. Effectivement, des défauts dans ce mécanisme cellulaire peuvent être associés à un phénotype cancéreux.^{403,404} Par exemple, plusieurs travaux corrént une diminution de l'expression de *CPSF2* avec une augmentation de la prolifération et de la progression cancéreuse dans le cancer de la thyroïde.^{405,406} Cette protéine semble agir non seulement sur la maturation 3' des ARNm mais aussi sur l'épissage de certains gènes. De plus, ces gènes pourraient jouer un rôle dans un mécanisme nommé PAA (polyadenylation alternative) qui permet à certains oncogènes de contourner une régulation négative post-transcriptionnelle.⁴⁰⁴ Par exemple, *CSTF3* semble être impliqué dans la PAA pour les oncogènes *NRAS* et *c-JUN* dans certaines tumeurs du sein triples négatives.⁴⁰⁷ La protéine *WDR33*, quant à elle, semble être impliquée dans la régulation des facteurs *CSTF* et dans la reconnaissance du site de polyadenylation sur l'ARNm.⁴⁰⁸ Elle pourrait également être engagée dans la régulation de la maturation de certaines molécules d'ARNm cruciales pour le développement de la LMC et agir également sur la réponse au traitement.

C) Les stratégies thérapeutiques potentielles pour traiter les cellules résistantes

Les gènes et les mécanismes cités ci-dessus pourraient éventuellement devenir de nouvelles cibles thérapeutiques pour des patients de LMC résistants au traitement initial. En effet, d'après le travail effectué au cours de ma thèse, ces gènes semblent jouer sur la sensibilité de la cellule LMC au traitement par l'imatinib. Cibler les protéines ou les voies de signalisation qui sont associées à l'expression de ces gènes pourrait donner de nouvelles thérapies efficaces pour le traitement des cellules résistantes mais également pour le traitement des cellules souches leucémiques.

Au cours de ce travail, nous avons montré l'efficacité de la combinaison de traitement par l'imatinib et les BH3-mimétiques pour les lignées cellulaires *BIM* KO. De plus, nous avons démontré que l'inhibition de la voie des MAPK par le pimasertib en combinaison avec l'imatinib peut sensibiliser les cellules résistantes *SPRED2* KO au traitement. De ce fait, d'autres types de combinaisons potentielles pourraient être efficaces pour traiter d'autres formes de résistance initiale au traitement et peut-être même détruire les cellules souches BCR-ABL1-positives. Des combinaisons de l'imatinib avec d'autres inhibiteurs des voies de prolifération, avec des activateurs de l'apoptose ou avec des molécules agissant sur la transcription ou la traduction, pourraient être envisagées pour mieux traiter les cellules résistantes et éventuellement toucher les cellules souches.

1) Cibler les voies de prolifération cellulaire

Les voies majeures de prolifération cellulaire qui sont impactées dans la LMC sont les voies RAS/MAPK, PI3K/AKT/mTOR et JAK2/STAT5.¹⁵⁶ La régulation de ces voies semble être extrêmement importante pour la réponse optimale au traitement car nous avons montré que l'extinction de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans ces voies diminuait la sensibilité au traitement par l'imatinib. Nous avons trouvé qu'une suractivation particulière des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT/mTOR agissait de manière non-négligeable sur la réponse à la thérapie. De ce fait, utiliser des inhibiteurs ciblés de ces voies pourrait aider à mieux traiter les cellules résistantes ou les cellules souches leucémiques.

Afin de cibler et bloquer la voie des MAPK, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif de MEK1/2, le pimasertib, en combinaison avec l'imatinib pour réduire les effets d'une prolifération augmentée due à une suractivation de cette voie de signalisation. Ce type de combinaison

thérapeutique pourrait être efficace pour des formes de résistance liée à des mutations faux-sens dans certains suppresseurs de cette voie, tels que *SPRED2*, *SPRED1*, ou *NF1*, par exemple.

La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase pourrait également provenir d'une suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR. Il existe plusieurs agents thérapeutiques qui peuvent cibler cette voie, tels que l'idelalisib⁴⁰⁹, un inhibiteur de PI3K, ou l'everolimus⁴¹⁰, un inhibiteur de mTOR. Ces molécules pourraient être utilisées en combinaison avec l'imatinib pour augmenter l'efficacité du traitement. Une étude *in vitro* sur la lignée K562 montre que l'idelalisib peut induire un arrêt du cycle cellulaire et une induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire K562 en combinaison avec l'imatinib.⁴¹¹ La combinaison entre l'imatinib et l'everolimus est également étudiée dans différents types de cancer (leucémies, cancers gastriques, cancer rénaux) et permet de sensibiliser des cellules résistantes au traitement.^{92,412,413}

Une inhibition de la voie associée à Ras, médiée par RALA et RALB pourrait également avoir des effets bénéfiques dans le traitement de certaines formes de résistance à l'imatinib. Il a été montré qu'une molécule thérapeutique (RBC8) qui inhibe RALA et RALB peut diminuer la prolifération et la survie de cellules de cancer de la vessie.⁴¹⁴ Cet agent pourrait éventuellement être utilisé pour traiter des formes de LMC ayant la voie Ras-like surexprimée.⁴¹⁵

De plus, du fait de l'importance de certains facteurs d'ubiquitylation dans la résistance au traitement par l'imatinib, d'autres cibles thérapeutiques pourraient être utilisées pour mieux traiter les cellules résistantes. Par exemple, le facteur FBXL19 peut causer, d'après le criblage GeCKO, une résistance au traitement. Cette protéine de la famille des « F-box proteins » peut ubiquityler RhoA, une GTPase impliquée dans la prolifération cancéreuse. Une inhibition de cette enzyme par la Rhosin, par exemple, semblerait augmenter la sensibilité des cellules résistantes au traitement.⁴¹⁶ Parmi les autres facteurs d'ubiquitylation qui sont enrichis dans notre criblage, certaines sous-unités du complexe SCF ont été identifiées. Une inhibition de ce complexe par les inhibiteurs de Skp2 pourrait également agir de manière synergique avec l'imatinib pour traiter les cellules résistantes.^{166,417,418}

2) Augmenter l'activation de l'apoptose

La mort cellulaire programmée est excessivement importante afin d'avoir une thérapie anticancéreuse efficace. En effet, lorsque les cellules tumorales subissent un choc oncogénique par

l'inhibition de son oncogène principal ou « driver », la balance apoptotique tend vers une accumulation de facteurs pro-apoptotiques et une induction de l'apoptose.

Dans notre travail, nous avons montré que plusieurs facteurs impliqués dans l'apoptose intrinsèque étaient très importants pour la réponse optimale au traitement par l'imatinib. En effet, une activation de l'apoptose par administration de BH3-mimétiques sensibilisait certaines cellules résistantes au traitement. Une combinaison entre l'imatinib et le venetoclax ou le navitoclax semble induire une mort de cellules cancéreuses de manière significative. Cette combinaison pourrait également servir pour détruire les cellules leucémiques progénitrices.⁴¹⁹ L'activation de l'apoptose extrinsèque pourrait aider à traiter des formes de résistances qui sont liées à une diminution de l'expression de *BAX*. Nous avons montré que la combinaison de l'imatinib avec le navitoclax était inefficace sur des lignées cellulaires *BAX* KO car la protéine codée par ce gène semble être essentielle pour l'activation de l'apoptose intrinsèque. Les activateurs de TRAIL, par exemple, pourraient être utilisés en combinaison avec l'imatinib pour sensibiliser les cellules résistantes au traitement en activant la voie d'apoptose extrinsèque.^{381,420}

Une autre forme d'activation de l'apoptose qui pourrait être intéressante à étudier est liée au transfert d'ions Ca^{2+} du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie et le rôle potentiel de la protéine de déubiquitinylation BAP1.^{350,421} En effet, il existe des agents thérapeutiques qui peuvent cibler les protéines impliquées dans l'homéostasie calcique cellulaire et peuvent significativement induire l'apoptose dans des cellules cancéreuses en combinaison avec des agents thérapeutiques classiques. Par exemple, ML-9, un inhibiteur de STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), une protéine impliquée dans la régulation du flux calcique à travers la membrane du réticulum endoplasmique, peut induire la mort cellulaire dans les cellules de cancer de la prostate.⁴²²

3) Cibler la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle

Concernant la réponse à l'imatinib, d'autres mécanismes cellulaires, impliqués dans la régulation de la transcription, la maturation de molécules d'ARNm et la traduction, sembleraient être associés à la résistance au traitement. La transcription de gènes est souvent dérégulée dans la cellule cancéreuse et peut entraîner une expression anormale d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs.⁴²³

Des mutations dans le complexe Mediator ont également été identifiées dans plusieurs types de cancers, tels que le cancer de la prostate⁴²⁴, du colon⁴²⁵ ou de la peau⁴²⁶. Ce complexe

multiprotéique joue un rôle dans l'activation et la répression de gènes, ainsi que dans l'initiation et l'élongation d'ARNm. Plus d'études sur ce complexe doivent être effectuées afin de mieux comprendre sa participation dans le développement de cellules cancéreuses. L'inhibition de la transcription de certains gènes spécifiques peut se faire avec l'utilisation d'inhibiteurs de BRD4 (nommés iBET). Bhagwa *et al.*, ont montré que les sous-unités MED12, MED13, MED23 et MED24 agissent de manière similaire à BRD4 et sont importantes pour la transcription de gènes qui bloquent la maturation myéloïde.⁴²⁷

La régulation de la traduction peut aussi affecter la production de protéines impliquées dans le développement cancéreux. Nous avons discuté d'un rôle potentiel d'EIF2AK1 dans le développement tumoral et comment cette protéine peut affecter la prolifération cellulaire. Il existe un activateur spécifique d'EIF2AK1, le BTdCPU, qui permet de réduire la traduction protéique en activant la phosphorylation d'eIF2 α .³⁵⁶ Cet agent thérapeutique a une activité anticancéreuse pour plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses et sur des cellules primaires et pourrait s'avérer efficace pour le traitement de cellules leucémiques résistantes et de cellules souches leucémiques.^{359,360}

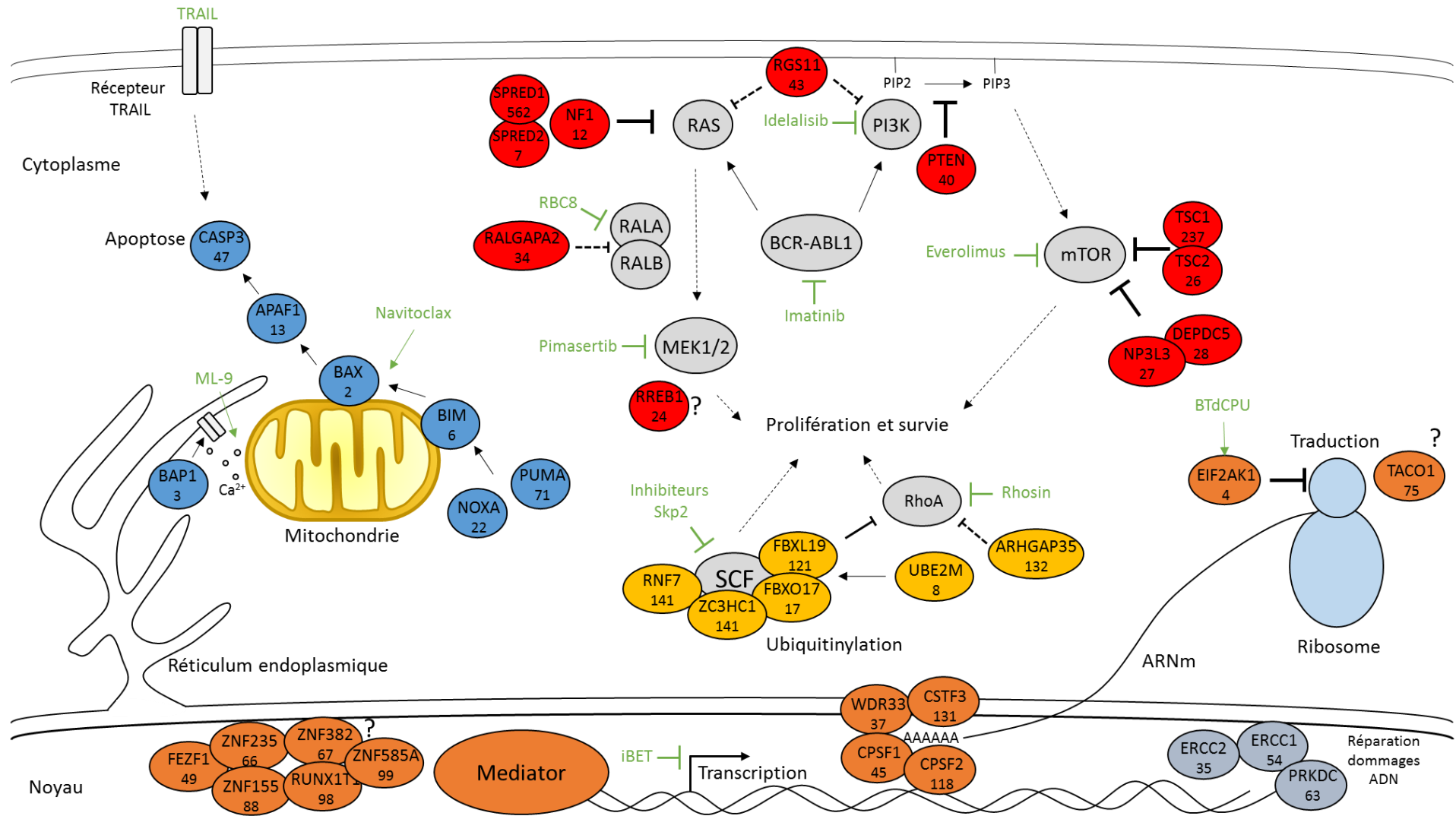


Figure 37 : Schéma récapitulatif des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib d'après notre criblage GeCKO et des possibles voies thérapeutiques

Les gènes qui sont enrichis dans le criblage GeCKO et qui participent aux mécanismes de résistances décrites dans la discussion, sont schématisés ci-dessus. Le classement de chaque gène figure en dessous de son nom. Les mécanismes cellulaires sont divisés en quatre couleurs, rouge : prolifération, bleu : apoptose, orange : transcription et traduction, jaune : le complexe d'ubiquitylation SCF. Les agents thérapeutiques qui ciblent ces mécanismes sont écrits en vert.

D) Remarques finales et perspectives

Le travail effectué au cours de ma thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de la résistance à l'imatinib sur la lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique K562. En effet, les travaux de type criblage génome entier, sans à priori antérieur sur les gènes à cibler, permettent de découvrir l'implication potentielle de nouveaux gènes peu ou pas étudiés dans la résistance au traitement. Par contre, comme tous types d'expérience de criblage, il peut y avoir des faux positifs ou des faux négatifs. La validation de résultats doit être effectuée de manière individuelle sur plusieurs lignées cellulaires avant de pouvoir imaginer des nouvelles stratégies thérapeutiques.

La lignée cellulaire K562 n'est pas un modèle parfait pour étudier les mécanismes de résistance au traitement dans la LMC pour plusieurs raisons. Par exemple, les gènes qui sont impliqués dans la différenciation érythroïde, comme *KLF1*, génère un phénotype dans notre étude. Comme discuté précédemment, ce phénotype observé est probablement exacerbé par l'origine érythromyéloïde de la lignée.³³³ *KLF1* n'a peut-être pas d'effet sur la résistance au traitement sur d'autres types de lignées cellulaires ni sur les cellules de patients. De plus, nous n'avons pas détecté *TP53* comme gène impliqué dans la résistance au traitement dans notre travail, contrairement à ce que nous aurions pu imaginer. Ceci s'explique par le fait que la lignée K562 possède déjà une mutation de décalage de cadre de lecture dans ce gène, codant ainsi une protéine P53 tronquée non fonctionnelle.⁴²⁸ L'effet du knock-out de ce gène par CRISPR-Cas9 ne modifie donc aucun phénotype. Pour étudier le rôle éventuel de *TP53* sur la résistance au traitement, la lignée cellulaire choisie pour effectuer le criblage aurait pu être la lignée LAMA-84, une autre lignée de LMC BCR-ABL1 positive.

L'efficacité de la transduction de la librairie GeCKO peut aussi jouer un rôle important dans l'interprétation des résultats. Afin de maintenir la représentativité de la librairie, il est important de transduire les lignées cellulaires avec une concentration de particules virales bien particulière. Techniquement, si les cellules utilisées se transduisent mal, cet étape critique peut causer un grand problème du fait d'une diminution de la représentativité de la librairie de gRNA. En parallèle des criblages GeCKO sur la lignée K562, nous avons essayé d'effectuer ce même travail sur la lignée LAMA-84, qui possède une efficacité de transduction nettement inférieure à celle de la lignée K562. Lors de l'analyse des données de séquençage, nous nous sommes rendu compte qu'il manquait un

grand nombre de gRNA du fait de cette efficacité de transduction lentivirale diminuée. Afin d'avoir des résultats interprétables, il fallait possiblement effectuer une nouvelle production lentivirale de la banque à une concentration plus élevée pour permettre de réaliser un criblage plus efficace de cette lignée cellulaire.

Un autre biais qui peut être généré au cours des travaux de criblage CRISPR-Cas9 est lors de l'amplification des gRNA par réaction de PCR. En effet, afin d'amplifier la totalité des gRNA présents dans la banque à une couverture suffisamment élevée (250X), nous devons effectuer douze réactions de PCR en parallèle avec 10 µg d'ADN matrice dans chaque tube réactionnel de 100 µl.³⁰⁰ Ces conditions inhabituelles demandent un travail conséquent afin d'optimiser la réaction d'amplification des gRNA pour le séquençage nouvelle génération. En effet, nous avons rencontré plusieurs problèmes au cours de cette étape dont un qui avait des conséquences sur l'efficacité de l'étape suivante, le séquençage nouvelle génération. Lors de l'amplification des gRNA avec les amorces figurant en matériel et méthodes, nous amplifions notre fragment voulu, mais accompagné d'un fragment de taille légèrement supérieure indétectable sur gel d'agarose. Ce deuxième fragment, qui se voit uniquement lors d'une analyse par électrophorèse capillaire sur une puce à haute sensibilité, biaise de manière significative le calcul de la concentration d'ADN nécessaire pour le séquençage nouvelle génération. En effet, lors de cette étape cruciale de séquençage des fragments, nous avons perdu environ 70% de la profondeur de lecture de chaque gRNA. Cette diminution dans le nombre de « reads » de chaque gRNA influe par la suite sur le calcul de FDR lors de l'analyse par le logiciel MAGeCK. Même si cette analyse peut être effectuée de manière juste, les valeurs de FDR attribuées pour chaque gène sont malheureusement diminuées.³¹⁴ C'est pour cela que, pour certains gènes qui n'étaient pas à un FDR suffisamment significatif, nous nous sommes reportés à la p-value d'enrichissement de ce gène. Au final, nous avons réussi à optimiser la réaction de PCR afin de ne pas avoir ce deuxième fragment non-voulu, mais les résultats présentés au cours de ma thèse proviennent des réactions de séquençage nouvelle génération avec des taux de lecture relativement faibles.

Malgré ces problèmes techniques liés au criblage CRISPR-Cas9 et à la génération de données après le séquençage nouvelle génération, nous avons réussi à identifier de potentielles cibles thérapeutiques pour la LMC. Les molécules thérapeutiques citées au cours du travail et dans la partie discussion pourraient être utilisées en combinaison avec les inhibiteurs de BCR-ABL1 pour spécifiquement éliminer les cellules résistantes. En tant que perspective, nous souhaitons essayer certaines nouvelles combinaisons thérapeutiques sur les lignées cellulaires de LMC ainsi que sur des

cellules primaires de patients répondeurs et résistants à l'imatinib. La prochaine étape serait d'essayer ces combinaisons thérapeutiques sur des cellules souches leucémiques *in vitro*, puis éventuellement sur des modèles de souris afin de découvrir des mélanges d'agents thérapeutiques efficaces pour l'élimination de ces cellules immatures résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase.

E) Conclusion

Grâce aux avancées technologiques et aux découvertes continues de nouveaux agents thérapeutiques ciblant des mécanismes cellulaires divers et variés, le traitement du cancer va devenir de plus en plus personnalisé et efficace. Le séquençage quasi-systématique de l'ADN néoplasique dans certains centres hospitaliers va générer une base de données riche en informations liant les mutations génétiques à l'efficacité du traitement. En effet, chaque cancer peut présenter des mutations différentes donc chaque cancer doit être traité de manière spécifique. L'aire de la chimiothérapie, agent qui tue toutes cellules à prolifération élevée, va bientôt devenir obsolète et l'aire de l'oncologie de précision va prendre le dessus. Il reste toujours du travail afin de découvrir tous les mécanismes induisant le développement cancéreux, mais grâce aux travaux de l'ensemble des chercheurs et de médecins en oncologie, la compréhension de cette pathologie ne fait que croître.

Notre criblage, qui servait à trouver des gènes impliqués dans la résistance à l'imatinib dans la LMC, a permis de découvrir des gènes ou des mécanismes cellulaires qui pourraient également jouer un rôle dans le développement cancéreux en général. En effet, les gènes qui sont impliqués dans la résistance au traitement peuvent aussi faire partie des « Hallmarks of Cancer » et pourraient expliquer la transformation d'une pathologie chronique vers les phases accélérée et blastique. Le modèle de la LMC est puissant car les résultats que nous avons observés peuvent être généralisés pour d'autres types de cancer. En effet, certaines voies de signalisation ou certains mécanismes cellulaires sont impliqués dans le développement de nombreux différents types de lésions prolifératives. La détection de ces anomalies, suivie par l'action ciblée d'un ou de plusieurs agents thérapeutiques en combinaison, pourraient dans un futur proche, aider à mieux soigner un plus grand nombre de tumeurs malignes.

D'un point de vue personnel, je souhaite faire partie de ce mouvement en oncologie de précision. J'aimerais utiliser les outils et les techniques que j'ai appris au cours de mes études et au cours de ma thèse, pour mieux traiter ou pour mieux diagnostiquer le cancer. Je cherche à travailler dans une société de biotechnologie autour du domaine de l'oncologie, que ce soit dans la détection

précoce de la maladie (grâce à des outils CRISPR-Cas, par exemple), ou dans une meilleure compréhension de la pathologie par séquençage nouvelle génération. J'aimerais également passer plus de temps à communiquer autour des progrès technologiques, comme j'ai pu le faire en parallèle de ma thèse. Je pense que la communication de la science est presque aussi importante que la science elle-même et porte une place importante dans la société moderne.

Annexes

Annexe 1 : Le séquençage Sanger pré-NGS

La vérification de l'amplification des gRNA dans l'ADN génomique de cellules K562 avant le séquençage nouvelle génération s'est effectuée grâce au séquençage Sanger. En effet, ce type de séquençage ne peut pas distinguer chaque protospacer de chaque gRNA, mais peut nous donner une idée de l'efficacité des réactions d'amplification de PCR. Après les deux cycles de PCR et un séquençage Sanger, le chromatogramme des amplicons présente trois parties (**Figure 38**) :

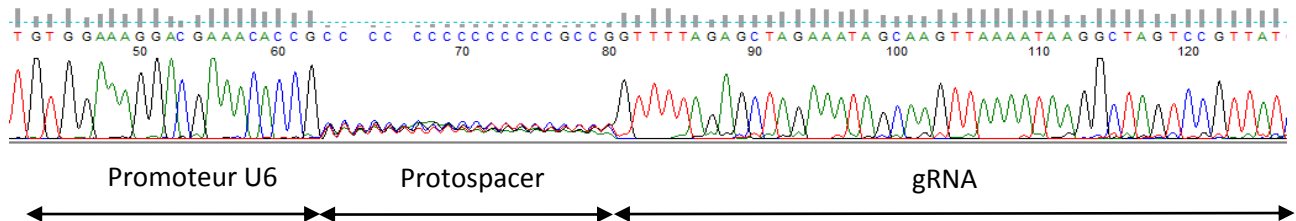


Figure 38 : Amplicon de PCR avant le séquençage nouvelle génération

En partie 5', nous retrouvons la séquence du promoteur U6 qui est associé à la transcription des gRNA. Au milieu, nous retrouvons 20 nt qui ne peuvent pas être séquencés de manière claire par Sanger. Ce sont tous les protospacers différents des 120 000 gRNA de la banque GeCKO. Nous voyons qu'à priori, il n'y a pas une amplification préférentielle d'un gRNA par rapport aux autres. En partie 3', nous détectons le reste de la séquence de la molécule gRNA, qui est identique à tous les gRNA.

Annexe 2 : Analyses bio-informatiques permettant la classification des gènes

L'utilisation de CutAdapt :

Lien de téléchargement : <https://pypi.python.org/pypi/cutadapt>

Guide d'utilisation : <http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>

L'utilisation de MAGECK :

Lien de téléchargement : <https://sourceforge.net/p/mageck/wiki/install/> (mot de passe : mageckkingdom)

Guide d'utilisation : <https://www.youtube.com/watch?v=OFLWSp1tdTI>

Téléchargement de la banque complète de sgRNA :

<https://sourceforge.net/projects/mageck/files/libraries/>

Dans un premier temps, un fichier contenant tous les documents de téléchargements de CutAdapt et de MAGeCK, les fichiers fastq et le fichier contenant la librairie de sgRNA (GeCKO) est créé. Ci-dessous, nous avons créé un dossier nommé « CutMageck » avec les fichiers fastq (deux fichiers pour les deux populations pré-traitement (preim1.fastq et preim2.fastq, deux fichiers pour les deux populations post-traitement post1im.fastq et post2im.fastq), la liste complète des sgRNA de la banque GeCKO (Human_GeCKOv2_library_combine.csv) et tous les fichiers des logiciels CutAdapt et MAGeCK.

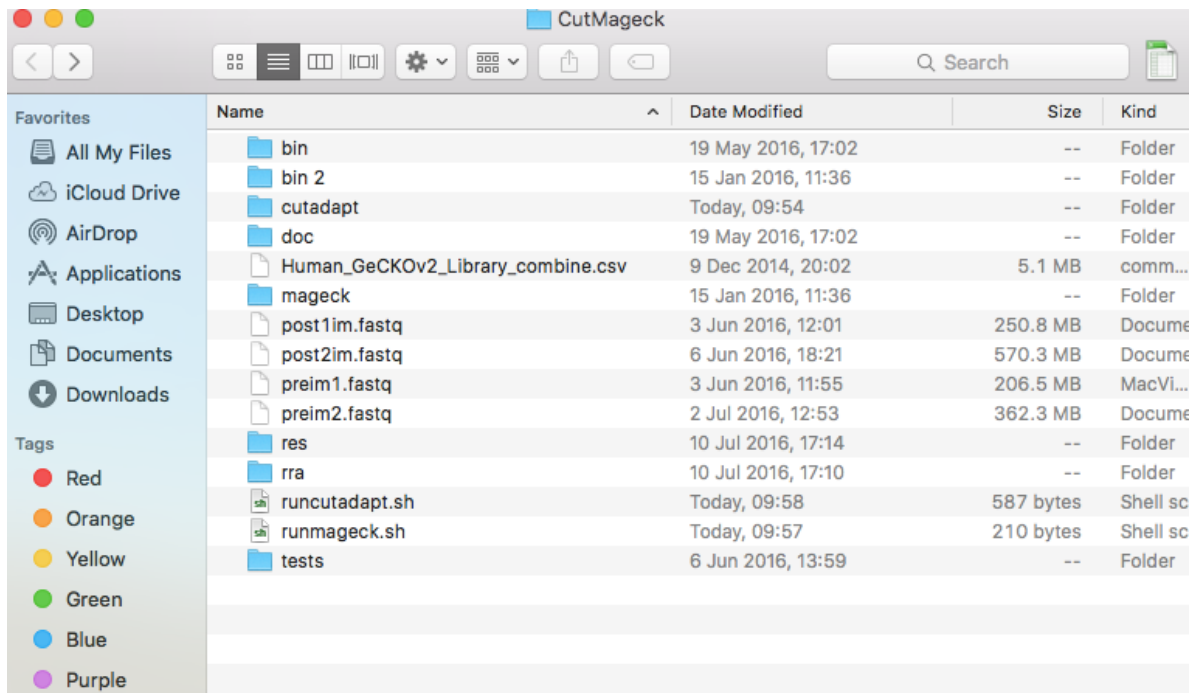
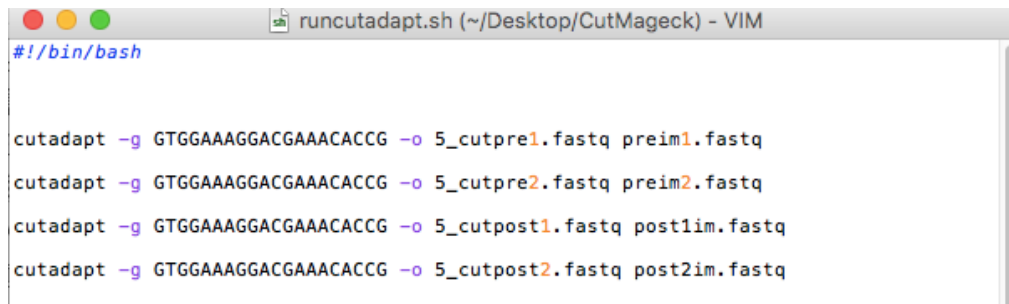


Figure 39 : Dossier complet sur iOS avant le lancement de Cutadapt et MAGeCK

Ensuite, le fichier « runcutadapt.sh » a été modifié pour pouvoir reconnaître les fichiers fastq correspondant à nos échantillons :

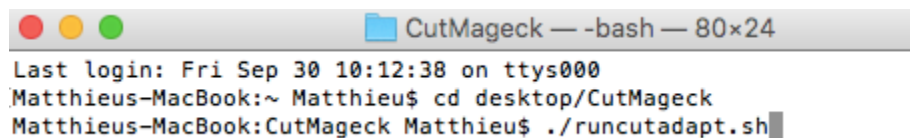


```
#!/bin/bash

cutadapt -g GTGGAAAGGACGAAACACCG -o 5_cutpre1.fastq preim1.fastq
cutadapt -g GTGGAAAGGACGAAACACCG -o 5_cutpre2.fastq preim2.fastq
cutadapt -g GTGGAAAGGACGAAACACCG -o 5_cutpost1.fastq post1im.fastq
cutadapt -g GTGGAAAGGACGAAACACCG -o 5_cutpost2.fastq post2im.fastq
```

Figure 40 : Configuration de runcutadapt.sh

Ce fichier contient plusieurs informations, l'intitulé « cutadapt » ne doit pas être modifié. La séquence de 20 nt après la lettre –g est la séquence directement en amont des protospacers. Le texte après la lettre -o correspond au nom du fichier de sortie. Les fastq initiaux sont reconnus grâce à leur nom en fin de ligne de code. Ce script va permettre d'effacer toutes les séquences nucléotidiques en amont des protospacers dans le fichier fastq. Ceci est obligatoire pour l'analyse MAGeCK. Pour lancer le programme, il faut ouvrir le terminal iOS et écrire deux lignes de code :



```
Last login: Fri Sep 30 10:12:38 on ttys000
Matthieus-MacBook:~ Matthieu$ cd desktop/CutMageck
Matthieus-MacBook:CutMageck Matthieu$ ./runcutadapt.sh
```

Figure 41 : Script pour lancer CutAdapt

La première ligne de code permet de trouver le fichier « CutMageck » qui est sur le bureau (« desktop »), et la deuxième ligne de code permet de lancer le script CutAdapt, qui doit automatiquement s'exécuter et couper les séquences dès qu'il retrouve la séquence en amont des protospacers : *GTGGAAAGGACGAAACACCG*.

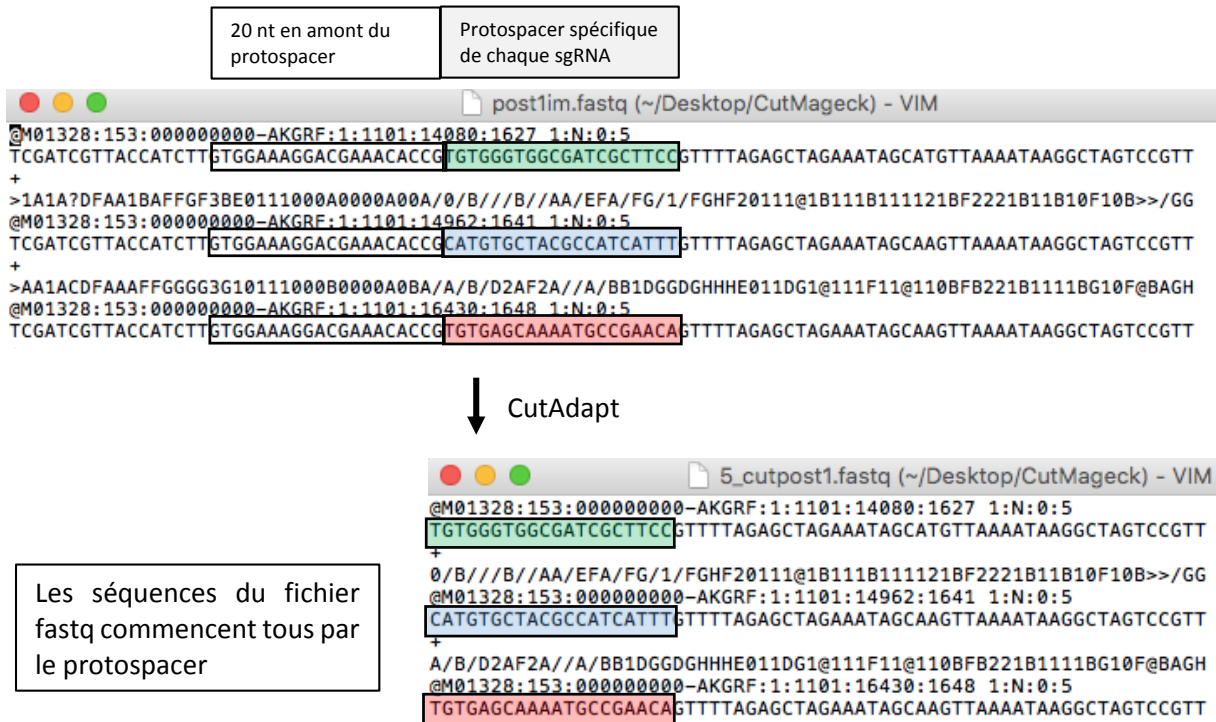


Figure 42 : Fichiers Fastq avant et après CutAdapt

Les fichiers fastq résultants contiennent les séquences nucléotidiques des sgRNA uniquement à partir de la séquence protospacer. Lors de l'analyse MAGECK, c'est cette première séquence qui va être analysée donc elle doit apparaître en premier. Les quatre fichiers fastq sont ensuite générés et sauvegardés dans le dossier « CutMageck ».

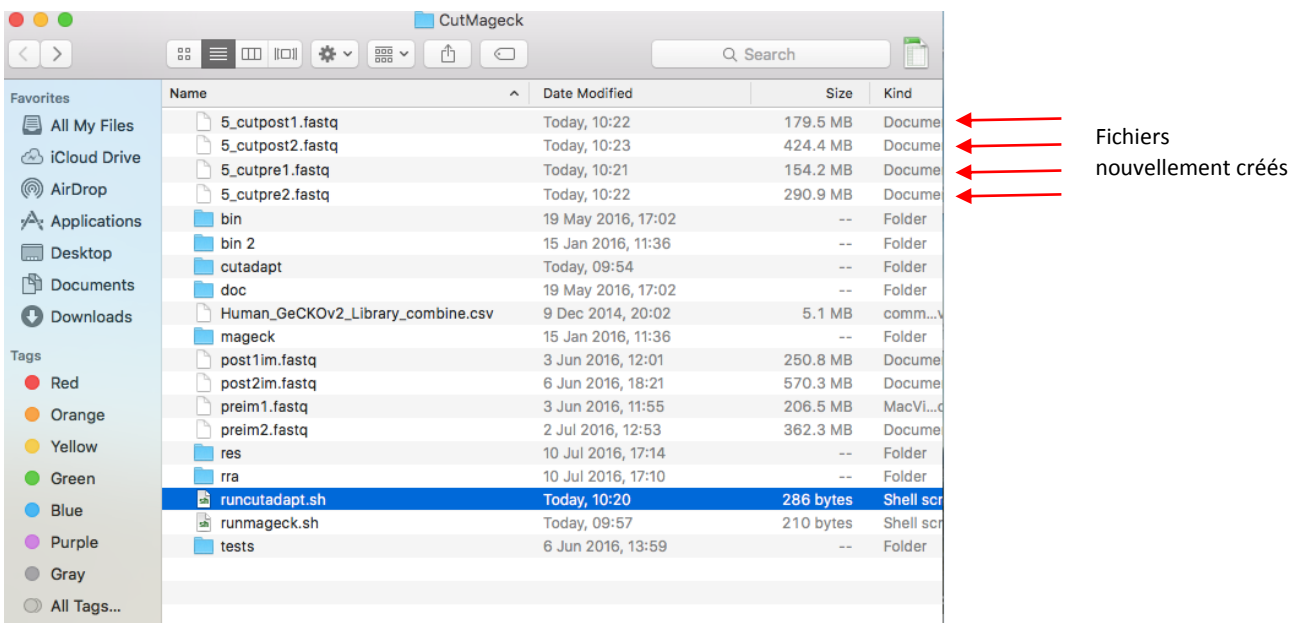
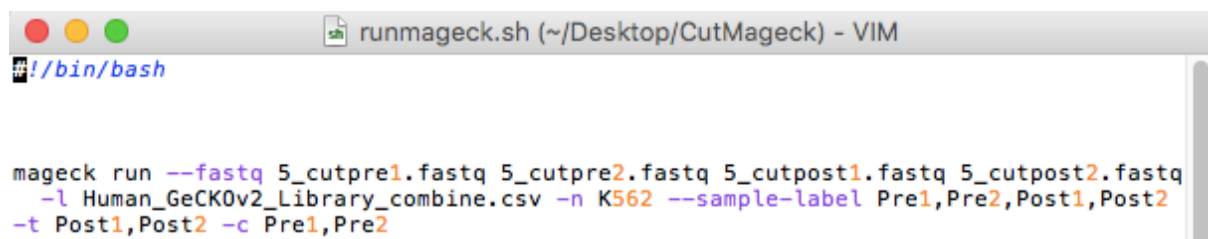


Figure 43 : Dossier iOS avec les fichiers fastq nouvellement créés

À partir de ces fichiers nouvellement créés, nous pouvons débiter l'analyse de l'enrichissement des sgRNA par MAGeCK. Pour ce faire, nous devons modifier le fichier « runmageck.sh » pour spécifiquement trouver nos séquences d'intérêt (fastq après analyse CutAdapt) et la banque de sgRNA de référence.



```
runmageck.sh (~/Desktop/CutMageck) - VIM
#!/bin/bash

mageck run --fastq 5_cutpre1.fastq 5_cutpre2.fastq 5_cutpost1.fastq 5_cutpost2.fastq
-l Human_GeCK0v2_Library_combine.csv -n K562 --sample-label Pre1,Pre2,Post1,Post2
-t Post1,Post2 -c Pre1,Pre2
```

Figure 44 : Script pour lancer MAGeCK

Comme le fichier « runcutadapt.sh », ce fichier (« runmageck.sh/ ») contient de multiples informations : après le sigle --fastq, le nom de tous les fichiers fastq doivent être listés, après -l le nom du fichier de la banque de gRNA, après -n le nom et finalement le nom des échantillons (-t = traités et -c = control). Sur le terminal iOS, à la suite des analyses CutAdapt, il faut taper « ./runmageck.sh » et le logiciel MAGeCK effectue le classement des sgRNA enrichis dans la population résistante. Le logiciel MAGeCK permet de classer les sgRNA ou les gènes du criblage GeCKO selon leur enrichissement positif ou leur déplétion négative. De ce fait, nous pouvons utiliser ce programme pour analyser les résultats d'un criblage positif ou négatif.

Annexe 3 : La détection d'indels par analyse TIDE

Afin de calculer le taux d'indels générés par CRISPR-Cas9, nous utilisons un logiciel gratuit en ligne nommé TIDE (« Tracking of Indels by DEcomposition »).³¹⁸ Afin d'utiliser ce logiciel, nous devons effectuer un séquençage Sanger du locus d'intérêt sur un échantillon contrôle, ainsi que sur l'échantillon modifié. Ensuite, nous déposons ces fichiers Sanger dans le logiciel (**Figure 45**), avec la séquence de 20 nt du protospacer, et TIDE calcule le pourcentage d'Indels dans la population modifiée. Le logiciel va ensuite prédire quelles sont les modifications apportées par CRISPR-Cas9.

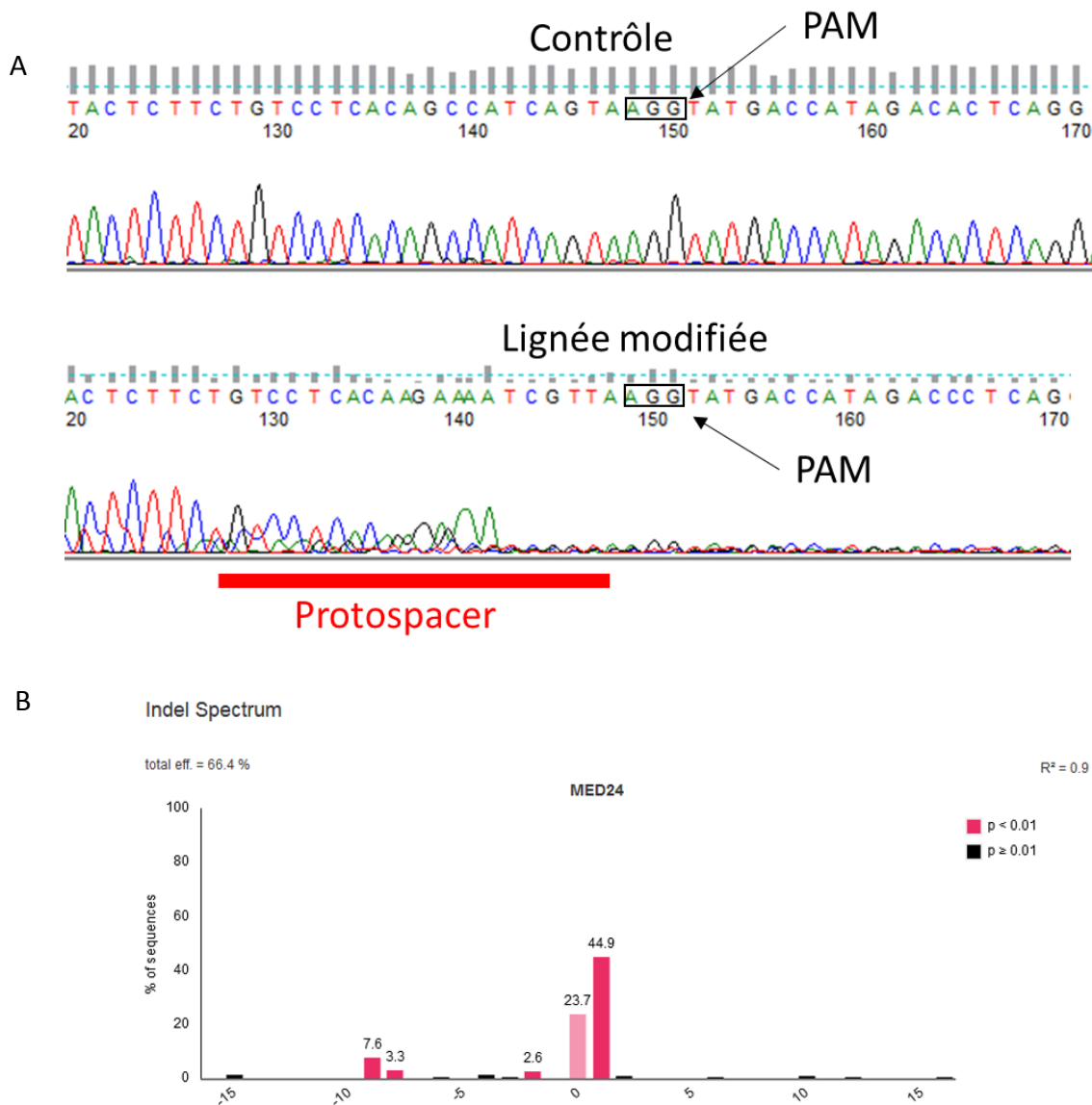


Figure 45 : Analyse TIDE, exemple pour le gène MED24

- (A) Chromatogrammes du même locus génétique avant et après modification génétique par CRISPR-Cas9
- (B) Calcul du pourcentage d'indels générés, ainsi que leur taille.

Références

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78–81 (2015).
4. Anand, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* **25**, 2097–2116 (2008).
5. McCulloch, S. D. & Kunkel, T. A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res.* **18**, 148–161 (2008).
6. *DNA repair and mutagenesis.* (ASM Press, 2006).
7. Warren, G. W. & Cummings, K. M. Tobacco and lung cancer: risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet.* 359–364 (2013). doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.359
8. Watson, M., Holman, D. M. & Maguire-Eisen, M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Semin. Oncol. Nurs.* **32**, 241–254 (2016).
9. Mehra, K., Berkowitz, A. & Sanft, T. Diet, Physical Activity, and Body Weight in Cancer Survivorship. *Med. Clin. North Am.* **101**, 1151–1165 (2017).
10. Martincorena, I. & Campbell, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science* **349**, 1483–1489 (2015).
11. Stratton, M. R., Campbell, P. J. & Futreal, P. A. The cancer genome. *Nature* **458**, 719–724 (2009).
12. Schinzel, A. C. & Hahn, W. C. Oncogenic transformation and experimental models of human cancer. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 71–84 (2008).
13. Stephens, P. J. *et al.* Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* **462**, 1005–1010 (2009).
14. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415–421 (2013).
15. Berdasco, M. & Esteller, M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev. Cell* **19**, 698–711 (2010).
16. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
17. Sherr, C. J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235–246 (2004).
18. Bamford, S. *et al.* The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br. J. Cancer* **91**, 355–358 (2004).
19. Forbes, S. A. *et al.* COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* **45**, D777–D783 (2017).
20. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* **313**, 745–747 (1985).
21. Davies, M. A. & Samuels, Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* **29**, 5545–5555 (2010).
22. Jiang, B. & Liu, L. Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. in *Advances in Cancer Research* **102**, 19–65 (Elsevier, 2009).
23. Burkhardt, D. L. & Sage, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 671–682 (2008).
24. Olivier, M., Hollstein, M. & Hainaut, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001008–a001008 (2010).
25. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
26. Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**, 1324–1337 (2007).
27. Galteland, E. *et al.* Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* **19**, 2313–2323 (2005).

28. Hockenbery, D., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* **348**, 334–336 (1990).
29. Boise, L. H. *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597–608 (1993).
30. Gibson, L. *et al.* bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival. *Oncogene* **13**, 665–675 (1996).
31. Kozopas, K. M., Yang, T., Buchan, H. L., Zhou, P. & Craig, R. W. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 3516–3520 (1993).
32. Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609–619 (1993).
33. Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **3**, 697–707 (1998).
34. Gibson, C. J. & Davids, M. S. BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Clin. Cancer Res.* **21**, 5021–5029 (2015).
35. Kang, M. H. & Reynolds, C. P. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 1126–1132 (2009).
36. Ozaki, T. & Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* **3**, 994–1013 (2011).
37. Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W. & Villunger, A. Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis* **14**, 584–596 (2009).
38. Jansson, A. & Sun, X.-F. Bax Expression Decreases Significantly From Primary Tumor to Metastasis in Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* **20**, 811–816 (2002).
39. Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochem. Biokhimiia* **62**, 1180–1190 (1997).
40. Allsopp, R. C. *et al.* Telomere Shortening Is Associated with Cell Division in Vitro and in Vivo. *Exp. Cell Res.* **220**, 194–200 (1995).
41. Shay, J. W. & Wright, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 349–353 (2011).
42. Corey, D. R. Telomeres and Telomerase: From Discovery to Clinical Trials. *Chem. Biol.* **16**, 1219–1223 (2009).
43. Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R. & Reddel, R. R. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* **21**, 598–610 (2002).
44. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
45. Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 789–791 (2009).
46. Gabhann, F. M. & Popel, A. S. Systems Biology of Vascular Endothelial Growth Factors. *Microcirculation* **15**, 715–738 (2008).
47. Sporn, M. B. The war on cancer. *Lancet Lond. Engl.* **347**, 1377–1381 (1996).
48. Klymkowsky, M. W. & Savagner, P. Epithelial-Mesenchymal Transition. *Am. J. Pathol.* **174**, 1588–1593 (2009).
49. Garg, M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J. Stem Cells* **5**, 188 (2013).
50. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
51. Fouad, Y. A. & Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 1016–1036 (2017).
52. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
53. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* **18**, (2016).
54. Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 220–228 (2010).

55. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071–1078 (2009).
56. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–16 (1992).
57. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
58. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–548 (2009).
59. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
60. Kennedy, K. M. & Dewhirst, M. W. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* **6**, 127–148 (2010).
61. Lister, J. On the Antiseptic Principle in the Practice of Surgery. *BMJ* **2**, 246–248 (1867).
62. Kapur, B. N. The fruits of long endeavors - 200 years of oncology. *Med. J. Armed Forces India* **70**, 95–97 (2014).
63. Halsted, W. S. I. The Results of Radical Operations for the Cure of Carcinoma of the Breast. *Ann. Surg.* **46**, 1–19 (1907).
64. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R. & Yeoh, K.-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 193–199 (2012).
65. DeVita, V. T. & Rosenberg, S. A. Two Hundred Years of Cancer Research. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2207–2214 (2012).
66. Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 65–72 (2005).
67. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 493–502 (2002).
68. Druker, B. J. *et al.* Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1031–1037 (2001).
69. Bhullar, K. S. *et al.* Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer* **17**, 48 (2018).
70. Pardanani, A. & Tefferi, A. Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood* **104**, 1931–1939 (2004).
71. Din, O. S. & Woll, P. J. Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate. *Ther. Clin. Risk Manag.* **4**, 149–162 (2008).
72. Pardanani, A. *et al.* Imatinib therapy for hypereosinophilic syndrome and other eosinophilic disorders. *Blood* **101**, 3391–3397 (2003).
73. Baudino, T. A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **12**, 3–20 (2015).
74. Wilhelm, S. M. *et al.* BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* **64**, 7099–7109 (2004).
75. Ma, L. *et al.* EGFR Mutant Structural Database: computationally predicted 3D structures and the corresponding binding free energies with gefitinib and erlotinib. *BMC Bioinformatics* **16**, 85 (2015).
76. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* **11**, 353–361 (2005).
77. Martin, D. E. & Hall, M. N. The expanding TOR signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 158–166 (2005).
78. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **30**, 87 (2011).
79. Oltsersdorf, T. *et al.* An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* **435**, 677–681 (2005).
80. Tse, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* **68**, 3421–3428 (2008).
81. Souers, A. J. *et al.* ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat. Med.* **19**, 202–208 (2013).

82. Roberts, A. W. *et al.* Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 488–496 (2012).
83. Seymour, J. ABT-199 for chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **12**, 698–700 (2014).
84. Seymour, J. F. *et al.* Venetoclax–Rituximab in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1107–1120 (2018).
85. Del Gaizo Moore, V. *et al.* Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J. Clin. Invest.* **117**, 112–121 (2007).
86. Konopleva, M. *et al.* Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov.* **6**, 1106–1117 (2016).
87. Bayat Mokhtari, R. *et al.* Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* **8**, 38022–38043 (2017).
88. Yap, T. A., Omlin, A. & de Bono, J. S. Development of Therapeutic Combinations Targeting Major Cancer Signaling Pathways. *J. Clin. Oncol.* **31**, 1592–1605 (2013).
89. Al-Lazikani, B., Banerji, U. & Workman, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. *Nat. Biotechnol.* **30**, 679–692 (2012).
90. Ascierto, P. A. *et al.* The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J. Transl. Med.* **10**, 85 (2012).
91. Larkin, J. *et al.* Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF* -Mutated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1867–1876 (2014).
92. Papadimitrakopoulou, V. A. *et al.* Everolimus and Erlotinib as Second- or Third-Line Therapy in Patients with Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 1594–1601 (2012).
93. Wylie, A. A. *et al.* The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR–ABL1. *Nature* **543**, 733–737 (2017).
94. Airiau, K. *et al.* Synergistic cooperation between ABT-263 and MEK1/2 inhibitor: effect on apoptosis and proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget* **7**, 845–859 (2016).
95. Gong, J., Chehrazi-Raffle, A., Reddi, S. & Salgia, R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J. Immunother. Cancer* **6**, (2018).
96. Poirot, L. *et al.* Multiplex Genome-Edited T-cell Manufacturing Platform for “Off-the-Shelf” Adoptive T-cell Immunotherapies. *Cancer Res.* **75**, 3853–3864 (2015).
97. Androulla, M. N. & Lefkothea, P. C. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **19**, 5–18 (2018).
98. Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **53**, 615–627 (2002).
99. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin. Exp. Metastasis* **35**, 309–318 (2018).
100. Hu, X. & Zhang, Z. Understanding the Genetic Mechanisms of Cancer Drug Resistance Using Genomic Approaches. *Trends Genet. TIG* **32**, 127–137 (2016).
101. Soverini, S. *et al.* Next-generation sequencing for sensitive detection of BCR-ABL1 mutations relevant to tyrosine kinase inhibitor choice in imatinib-resistant patients. *Oncotarget* **7**, 21982–21990 (2016).
102. Hochhaus, A. *et al.* Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* **109**, 2303–2309 (2007).
103. Mahon, F.-X. *et al.* Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res.* **68**, 9809–9816 (2008).
104. Bradeen, H. A. *et al.* Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood* **108**, 2332–2338 (2006).
105. Wang, Z. *et al.* Activation of the BMP-BMPR pathway conferred resistance to EGFR-TKIs in lung squamous cell carcinoma patients with EGFR mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9990–9995 (2015).

106. Engelman, J. A. *et al.* Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J. Clin. Invest.* **116**, 2695–2706 (2006).
107. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* **3**, 75ra26 (2011).
108. Huang, Y. Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 183–201 (2007).
109. Sherlach, K. S. & Roepe, P. D. Drug resistance associated membrane proteins. *Front. Physiol.* **5**, (2014).
110. Goldstein, L. J. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur. J. Cancer* **32**, 1039–1050 (1996).
111. Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468–7485 (2003).
112. Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J. & Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **1**, 27–42 (2004).
113. Ishikawa, T. & Nakagawa, H. Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics. *J. Exp. Ther. Oncol.* **8**, 5–24 (2009).
114. Lu, J. F., Pokharel, D. & Bebawy, M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metab. Rev.* **47**, 406–419 (2015).
115. Kirschner, K. & Melton, D. W. Multiple roles of the ERCC1-XPF endonuclease in DNA repair and resistance to anticancer drugs. *Anticancer Res.* **30**, 3223–3232 (2010).
116. Ceppi, P. *et al.* ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **17**, 1818–1825 (2006).
117. Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. & Jacks, T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**, 847–849 (1993).
118. Sun, Y. Tumor microenvironment and cancer therapy resistance. *Cancer Lett.* **380**, 205–215 (2016).
119. Devaud, C., John, L. B., Westwood, J. A., Darcy, P. K. & Kershaw, M. H. Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2**, e25961 (2013).
120. Lewis, M. Tumor-Associated Macrophages, Inflammation and Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma. *J. Mol. Genet. Med.* **08**, (2014).
121. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
122. Kourou, K., Exarchos, T. P., Exarchos, K. P., Karamouzis, M. V. & Fotiadis, D. I. Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **13**, 8–17 (2015).
123. Way, G. P. *et al.* Machine Learning Detects Pan-cancer Ras Pathway Activation in The Cancer Genome Atlas. *Cell Rep.* **23**, 172-180.e3 (2018).
124. Krempel, R. *et al.* Integrative analysis and machine learning on cancer genomics data using the Cancer Systems Biology Database (CancerSysDB). *BMC Bioinformatics* **19**, (2018).
125. Chakravarty, D. *et al.* OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precis. Oncol.* **1**, 1–16 (2017).
126. Silver, R. T. Chronic myeloid leukemia. A perspective of the clinical and biologic issues of the chronic phase. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **4**, 319–335 (1990).
127. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 7–30 (2017).
128. Jabbour, E. & Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am. J. Hematol.* **93**, 442–459 (2018).
129. Balchen, V. & Simon, K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin. Interv. Aging* **Volume 11**, 967–976 (2016).
130. Feinstein, E. *et al.* p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6293–6297 (1991).

131. Towatari, M., Adachi, K., Kato, H. & Saito, H. Absence of the human retinoblastoma gene product in the megakaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* **78**, 2178–2181 (1991).
132. Faderl, S. *et al.* The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **341**, 164–172 (1999).
133. Nowell, P. C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* **8**, 65–66 (1960).
134. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
135. Bartram, C. R. *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277–280 (1983).
136. Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93–99 (1984).
137. Lugo, T. G., Pendergast, A. M., Muller, A. J. & Witte, O. N. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* **247**, 1079–1082 (1990).
138. Laneuville, P. Abl tyrosine protein kinase. *Semin. Immunol.* **7**, 255–266 (1995).
139. Reuther, G. W., Fu, H., Cripe, L. D., Collier, R. J. & Pendergast, A. M. Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* **266**, 129–133 (1994).
140. McWhirter, J. R., Galasso, D. L. & Wang, J. Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7587–7595 (1993).
141. Montaner, S., Perona, R., Saniger, L. & Lacal, J. C. Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J. Biol. Chem.* **273**, 12779–12785 (1998).
142. Diekmann, D. *et al.* Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**, 400–402 (1991).
143. Diekmann, D., Nobes, C. D., Burbelo, P. D., Abo, A. & Hall, A. Rac GTPase interacts with GAPs and target proteins through multiple effector sites. *EMBO J.* **14**, 5297–5305 (1995).
144. Ma, G., Lu, D., Wu, Y., Liu, J. & Arlinghaus, R. B. Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* **14**, 2367–2372 (1997).
145. Voncken, J. W. *et al.* Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* **80**, 719–728 (1995).
146. Abelson, H. T. & Rabstein, L. S. Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* **30**, 2213–2222 (1970).
147. Wang, J. Y. J. The Capable ABL: What Is Its Biological Function? *Mol. Cell. Biol.* **34**, 1188–1197 (2014).
148. Van Etten, R. A. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leuk. Res.* **28 Suppl 1**, S21-28 (2004).
149. Kipreos, E. T. & Wang, J. Y. Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science* **248**, 217–220 (1990).
150. Yuan, Z. M. *et al.* p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* **399**, 814–817 (1999).
151. Lewis, J. M. & Schwartz, M. A. Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J. Biol. Chem.* **273**, 14225–14230 (1998).
152. Van Etten, R. A. Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* **9**, 179–186 (1999).
153. Wetzler, M. *et al.* Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J. Clin. Invest.* **92**, 1925–1939 (1993).
154. Melo, J. V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* **88**, 2375–2384 (1996).
155. Burmeister, T. *et al.* Fine structure of translocation breakpoints within the major breakpoint region in BCR-ABL1-positive leukemias. *DNA Repair* **10**, 1131–1137 (2011).
156. Deininger, M. W., Goldman, J. M. & Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343–3356 (2000).
157. Cilloni, D. & Saglio, G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* **18**, 930–937 (2012).

158. Pendergast, A. M. *et al.* BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **75**, 175–185 (1993).
159. Pelicci, G. *et al.* Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene* **11**, 899–907 (1995).
160. Oda, T. *et al.* Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J. Biol. Chem.* **269**, 22925–22928 (1994).
161. Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F. & Marshall, C. J. Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **14**, 3136–3145 (1995).
162. Cahill, M. A., Janknecht, R. & Nordheim, A. Signalling pathways: jack of all cascades. *Curr. Biol. CB* **6**, 16–19 (1996).
163. Watzinger, F. *et al.* Absence of N-ras mutations in myeloid and lymphoid blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* **54**, 3934–3938 (1994).
164. Sattler, M. *et al.* The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* **12**, 839–846 (1996).
165. Naka, K. *et al.* TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **463**, 676–680 (2010).
166. Agarwal, A. *et al.* Absence of SKP2 expression attenuates BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Blood* **112**, 1960–1970 (2008).
167. Markova, B. *et al.* Novel pathway in Bcr-Abl signal transduction involves Akt-independent, PLC-gamma1-driven activation of mTOR/p70S6-kinase pathway. *Oncogene* **29**, 739–751 (2010).
168. Ly, C., Arechiga, A. F., Melo, J. V., Walsh, C. M. & Ong, S. T. Bcr-Abl kinase modulates the translation regulators ribosomal protein S6 and 4E-BP1 in chronic myelogenous leukemia cells via the mammalian target of rapamycin. *Cancer Res.* **63**, 5716–5722 (2003).
169. Chai, S. K., Nichols, G. L. & Rothman, P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **159**, 4720–4728 (1997).
170. de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Jove, R. & Koenderman, L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* **94**, 1108–1112 (1999).
171. Nosaka, T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* **18**, 4754–4765 (1999).
172. Horita, M. *et al.* Blockade of the Bcr-Abl Kinase Activity Induces Apoptosis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 5–Dependent Expression of Bcl-X_L. *J. Exp. Med.* **191**, 977–984 (2000).
173. de Groot, R. P., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W. & Koenderman, L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol. Cell Biol. Res. Commun. MCBRC* **3**, 299–305 (2000).
174. Xie, S. *et al.* Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* **20**, 6188–6195 (2001).
175. Skorski, T. *et al.* Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* **16**, 6151–6161 (1997).
176. Sánchez-García, I. & Martín-Zanca, D. Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J. Mol. Biol.* **267**, 225–228 (1997).
177. Neshat, M. S., Raitano, A. B., Wang, H. G., Reed, J. C. & Sawyers, C. L. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1179–1186 (2000).
178. *Hematologic malignancies: myeloproliferative disorders.* (Springer, 2007).
179. Fefer, A. *et al.* Disappearance of Ph1-positive cells in four patients with chronic granulocytic leukemia after chemotherapy, irradiation and marrow transplantation from an identical twin. *N. Engl. J. Med.* **300**, 333–337 (1979).
180. Talpaz, M., McCredie, K. B., Mavligit, G. M. & Gutterman, J. U. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **62**, 689–692 (1983).

181. Guilhot, F. *et al.* Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 223–229 (1997).
182. Kaur, G. *et al.* Tyrphostin induced growth inhibition: correlation with effect on p210bcr-abl autokinase activity in K562 chronic myelogenous leukemia. *Anticancer. Drugs* **5**, 213–222 (1994).
183. Anafi, M., Gazit, A., Gilon, C., Ben-Neriah, Y. & Levitzki, A. Selective interactions of transforming and normal abl proteins with ATP, tyrosine-copolymer substrates, and tyrphostins. *J. Biol. Chem.* **267**, 4518–4523 (1992).
184. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566 (1996).
185. Deininger, M. W., Goldman, J. M., Lydon, N. & Melo, J. V. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* **90**, 3691–3698 (1997).
186. Kantarjian, H. *et al.* Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* **119**, 1981–1987 (2012).
187. Deininger, M. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **105**, 2640–2653 (2005).
188. Weinstein, I. B., Joe, A. & Felsher, D. Oncogene Addiction. *Cancer Res.* **68**, 3077–3080 (2008).
189. Sharma, S. V. *et al.* A common signaling cascade may underlie ‘addiction’ to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell* **10**, 425–435 (2006).
190. Soverini, S., Mancini, M., Bavaro, L., Cavo, M. & Martinelli, G. Chronic myeloid leukemia: the paradigm of targeting oncogenic tyrosine kinase signaling and counteracting resistance for successful cancer therapy. *Mol. Cancer* **17**, (2018).
191. Tokarski, J. S. *et al.* The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* **66**, 5790–5797 (2006).
192. Kantarjian, H. *et al.* Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2260–2270 (2010).
193. Weisberg, E. *et al.* AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br. J. Cancer* **94**, 1765–1769 (2006).
194. Cai, J. *et al.* Design and synthesis of novel 4-benzothiazole amino quinazolines Dasatinib derivatives as potential anti-tumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **63**, 702–712 (2013).
195. Rensing Rix, L. L. *et al.* Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**, 477–485 (2009).
196. Golas, J. M. *et al.* SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res.* **63**, 375–381 (2003).
197. Saglio, G. *et al.* Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2251–2259 (2010).
198. Cortes, J. E. *et al.* Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J. Clin. Oncol.* **36**, 231–237 (2018).
199. Zhou, T. *et al.* Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance: Structural Mechanism of Ponatinib. *Chem. Biol. Drug Des.* **77**, 1–11 (2011).
200. Zhang, J. *et al.* Targeting Bcr–Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **463**, 501–506 (2010).
201. Mahon, F. X. *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**, 1070–1079 (2000).
202. Mahon, F.-X. *et al.* MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* **101**, 2368–2373 (2003).
203. Belloc, F. *et al.* Imatinib and nilotinib induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells through a Bim-dependant pathway modulated by cytokines. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 912–919 (2007).

204. Augis, V. *et al.* A single nucleotide polymorphism in cBIM is associated with a slower achievement of major molecular response in chronic myeloid leukaemia treated with imatinib. *PLoS One* **8**, e78582 (2013).
205. Gioia, R. *et al.* Quantitative phosphoproteomics revealed interplay between Syk and Lyn in the resistance to nilotinib in chronic myeloid leukemia cells. *Blood* **118**, 2211–2221 (2011).
206. Gioia, R. *et al.* CBL controls a tyrosine kinase network involving AXL, SYK and LYN in nilotinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *J. Pathol.* **237**, 14–24 (2015).
207. Gamas, P. *et al.* Inhibition of imatinib-mediated apoptosis by the caspase-cleaved form of the tyrosine kinase Lyn in chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* **23**, 1500–1506 (2009).
208. Pocaly, M. *et al.* Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **21**, 93–101 (2007).
209. Gorre, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876–880 (2001).
210. Barthe, C. Roots of Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy. *Science* **293**, 2163a – 2163 (2001).
211. Schepers, K., Campbell, T. B. & Passegué, E. Normal and leukemic stem cell niches: insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* **16**, 254–267 (2015).
212. Soverini, S. *et al.* Implications of BCR-ABL1 kinase domain-mediated resistance in chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **38**, 10–20 (2014).
213. Soverini, S. *et al.* BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* **118**, 1208–1215 (2011).
214. Nagar, B. *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62**, 4236–4243 (2002).
215. Tamborini, E. *et al.* A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient. *Gastroenterology* **127**, 294–299 (2004).
216. Gotlib, J. *et al.* The FIP1L1-PDGFRalpha fusion tyrosine kinase in hypereosinophilic syndrome and chronic eosinophilic leukemia: implications for diagnosis, classification, and management. *Blood* **103**, 2879–2891 (2004).
217. Deininger, M. W. *et al.* Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood* **127**, 703–712 (2016).
218. Wang, D., Pan, H. & Wang, Y. T315L: a novel mutation within BCR-ABL kinase domain confers resistance against ponatinib. *Leuk. Lymphoma* **58**, 1733–1735 (2017).
219. Gadzicki, D. *et al.* BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *Cancer Genet. Cytogenet.* **159**, 164–167 (2005).
220. Morel, F. *et al.* Double minutes containing amplified bcr-abl fusion gene in a case of chronic myeloid leukemia treated by imatinib. *Eur. J. Haematol.* **70**, 235–239 (2003).
221. Barnes, D. J. *et al.* Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* **65**, 8912–8919 (2005).
222. Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H. M. & Cortes, J. E. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Control* **16**, 122–131 (2009).
223. Donato, N. J. *et al.* BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* **101**, 690–698 (2003).
224. Wu, J. *et al.* Association between imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 926–939 (2008).
225. Wagle, M. *et al.* A role for FOXO1 in BCR-ABL1-independent tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **30**, 1493–1501 (2016).
226. Eiring, A. M. *et al.* β -Catenin is required for intrinsic but not extrinsic BCR-ABL1 kinase-independent resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 2328–2337 (2015).

227. Eiring, A. M. *et al.* Combined STAT3 and BCR-ABL1 inhibition induces synthetic lethality in therapy-resistant chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 586–597 (2015).
228. Mitchell, R. *et al.* Targeting BCR-ABL-Independent TKI Resistance in Chronic Myeloid Leukemia by mTOR and Autophagy Inhibition. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 467–478 (2018).
229. Ben Hassine, I. *et al.* hOCT1 gene expression predict for optimal response to Imatinib in Tunisian patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**, 737–745 (2017).
230. Crossman, L. C. *et al.* hOCT 1 and resistance to imatinib. *Blood* **106**, 1133–1134; author reply 1134 (2005).
231. Ng, K. P. *et al.* A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat. Med.* **18**, 521–528 (2012).
232. Khorashad, J. S. *et al.* shRNA library screening identifies nucleocytoplasmic transport as a mediator of BCR-ABL1 kinase-independent resistance. *Blood* **125**, 1772–1781 (2015).
233. Morotti, A., Panuzzo, C., Fava, C. & Saglio, G. Kinase-inhibitor-insensitive cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* **14**, 287–299 (2014).
234. Rousselot, P. *et al.* Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* **109**, 58–60 (2007).
235. Mahon, F.-X. Treatment-free remission in CML: who, how, and why? *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2017**, 102–109 (2017).
236. Sadovnik, I. *et al.* Identification of CD25 as STAT5-Dependent Growth Regulator of Leukemic Stem Cells in Ph+ CML. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 2051–2061 (2016).
237. Saito, Y. *et al.* Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci. Transl. Med.* **2**, 17ra9 (2010).
238. Chen, M. *et al.* Targeting Primitive Chronic Myeloid Leukemia Cells by Effective Inhibition of a New AHI-1-BCR-ABL-JAK2 Complex. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 405–423 (2013).
239. Prost, S. *et al.* Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature* **525**, 380–383 (2015).
240. Charaf, L. *et al.* Effect of tyrosine kinase inhibitors on stemness in normal and chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* **31**, 65–74 (2017).
241. Lewis, M. *et al.* What are the challenges in 2016 regarding resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and cancer?: Resistance to TKI in CML and cancer. *Hematol. Oncol.* (2016). doi:10.1002/hon.2329
242. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
243. Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* **169**, 559 (2017).
244. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
245. Bikard, D. *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7429–7437 (2013).
246. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).
247. Porteus, M. H. & Baltimore, D. Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* **300**, 763 (2003).
248. Joung, J. K. & Sander, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 49–55 (2013).
249. Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. & Gregory, P. D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 636–646 (2010).
250. Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 143–148 (2011).
251. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2579–2586 (2012).

252. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–5433 (1987).
253. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005).
254. Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 653–663 (2005).
255. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 2551–2561 (2005).
256. Jansen, R., Embden, J. D. A. van, Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–1575 (2002).
257. Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7 (2006).
258. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
259. Sapranaukas, R. *et al.* The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **39**, 9275–9282 (2011).
260. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).
261. Shmakov, S. *et al.* Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Mol. Cell* **60**, 385–397 (2015).
262. Makarova, K. S., Aravind, L., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct* **6**, 38 (2011).
263. Mohanraju, P. *et al.* Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* **353**, aad5147 (2016).
264. *CRISPR-Cas Systems*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-34657-6
265. Amitai, G. & Sorek, R. CRISPR–Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 67–76 (2016).
266. Deveau, H. *et al.* Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390–1400 (2008).
267. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiol. Read. Engl.* **155**, 733–740 (2009).
268. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 722–736 (2015).
269. Makarova, K. S., Zhang, F. & Koonin, E. V. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell* **168**, 946–946.e1 (2017).
270. Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E. & Koonin, E. V. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **42**, 6091–6105 (2014).
271. Charpentier, E., Richter, H., van der Oost, J. & White, M. F. Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 428–441 (2015).
272. Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602–607 (2011).
273. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529 (2017).
274. Lieber, M. R. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
275. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).

276. Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S. & Yang, S.-H. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **4**, e264 (2015).
277. Chen, H., Choi, J. & Bailey, S. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *J. Biol. Chem.* **289**, 13284–13294 (2014).
278. Knight, S. C. *et al.* Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science* **350**, 823–826 (2015).
279. Jinek, M. *et al.* Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* **343**, 1247997 (2014).
280. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C. & Doudna, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**, 62–67 (2014).
281. Romiguier, J., Ranwez, V., Douzery, E. J. P. & Galtier, N. Contrasting GC-content dynamics across 33 mammalian genomes: Relationship with life-history traits and chromosome sizes. *Genome Res.* **20**, 1001–1009 (2010).
282. Josephs, E. A. *et al.* Structure and specificity of the RNA-guided endonuclease Cas9 during DNA interrogation, target binding and cleavage. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8924–8941 (2015).
283. Sternberg, S. H., LaFrance, B., Kaplan, M. & Doudna, J. A. Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR–Cas9. *Nature* **527**, 110–113 (2015).
284. Jiang, F., Zhou, K., Ma, L., Gressel, S. & Doudna, J. A. STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science* **348**, 1477–1481 (2015).
285. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832 (2013).
286. Wu, X. *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 670–676 (2014).
287. Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. & Sinha, R. P. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–32 (2010).
288. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361–370 (2000).
289. Murakami, H. & Keeney, S. Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes Dev.* **22**, 286–292 (2008).
290. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* **47**, 497–510 (2012).
291. Johnson, R. D. & Jasin, M. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 196–201 (2001).
292. Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L. & Corn, J. E. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* **34**, 339–344 (2016).
293. Aird, E. J., Lovendahl, K. N., St. Martin, A., Harris, R. S. & Gordon, W. R. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun. Biol.* **1**, (2018).
294. Moore, J. K. & Haber, J. E. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2164–2173 (1996).
295. Davis, A. J. & Chen, D. J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl. Cancer Res.* **2**, 130–143 (2013).
296. McVey, M. & Lee, S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director’s cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet. TIG* **24**, 529–538 (2008).
297. Heidenreich, E. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *EMBO J.* **22**, 2274–2283 (2003).
298. Wang, H. & Xu, X. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci.* **7**, (2017).
299. *Genetics: from genes to genomes.* (McGraw-Hill Higher Education, 2008).
300. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* **343**, 84–87 (2014).

301. Joung, J. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat. Protoc.* **12**, 828–863 (2017).
302. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**, 80–84 (2014).
303. Morgens, D. W. *et al.* Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nat. Commun.* **8**, 15178 (2017).
304. Hart, T. *et al.* Evaluation and Design of Genome-Wide CRISPR/SpCas9 Knockout Screens. *G3amp58 GenesGenomesGenetics* **7**, 2719–2727 (2017).
305. Wang, T. *et al.* Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* **350**, 1096–1101 (2015).
306. Ma, H. *et al.* A CRISPR-Based Screen Identifies Genes Essential for West-Nile-Virus-Induced Cell Death. *Cell Rep.* **12**, 673–683 (2015).
307. Doench, J. G. *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–191 (2016).
308. Wang, T. *et al.* Gene Essentiality Profiling Reveals Gene Networks and Synthetic Lethal Interactions with Oncogenic Ras. *Cell* **168**, 890-903.e15 (2017).
309. Morgens, D. W., Deans, R. M., Li, A. & Bassik, M. C. Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nat. Biotechnol.* **34**, 634–636 (2016).
310. Evers, B. *et al.* CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nat. Biotechnol.* **34**, 631–633 (2016).
311. Agatheeswaran, S., Pattnayak, N. C. & Chakraborty, S. Identification and functional characterization of the miRNA-gene regulatory network in chronic myeloid leukemia lineage negative cells. *Sci. Rep.* **6**, 32493 (2016).
312. Wallace, J. *et al.* Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies MicroRNAs That Regulate Myeloid Leukemia Cell Growth. *PLOS ONE* **11**, e0153689 (2016).
313. Cao, J. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in gastrointestinal stromal tumor with Imatinib resistance. *Mol. Cancer* **17**, (2018).
314. Li, W. *et al.* MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. *Genome Biol.* **15**, 554 (2014).
315. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10 (2011).
316. Haynes, W. Benjamini–Hochberg Method. in *Encyclopedia of Systems Biology* (eds. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H. & Yokota, H.) 78–78 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4419-9863-7_1215
317. Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B. & Valen, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.* **44**, W272–W276 (2016).
318. Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M. & van Steensel, B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* **42**, e168–e168 (2014).
319. Reich, M. *et al.* GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* **38**, 500–501 (2006).
320. Abraham, S. A. *et al.* Dual targeting of p53 and c-MYC selectively eliminates leukaemic stem cells. *Nature* **534**, 341–346 (2016).
321. Dkhissi, F. *et al.* The downregulation of BAP1 expression by BCR-ABL reduces the stability of BRCA1 in chronic myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* **43**, 775–780 (2015).
322. Liu, X.-Y. *et al.* Spred2 is involved in imatinib-induced cytotoxicity in chronic myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 637–642 (2010).
323. Yang, Y. *et al.* Spred2 modulates the erythroid differentiation induced by imatinib in chronic myeloid leukemia cells. *PLoS One* **10**, e0117573 (2015).
324. Gonzalez, M. S. *et al.* BAX/BCL-XL gene expression ratio inversely correlates with disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood Cells. Mol. Dis.* **45**, 192–196 (2010).

325. Siatecka, M. & Bieker, J. J. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood* **118**, 2044–2054 (2011).
326. Limame, R., de Beeck, K. O., Lardon, F., De Wever, O. & Pauwels, P. Krüppel-like factors in cancer progression: three fingers on the steering wheel. *Oncotarget* **5**, (2014).
327. Miller, I. J. & Bieker, J. J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2776–2786 (1993).
328. Perkins, A. C., Sharpe, A. H. & Orkin, S. H. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**, 318–322 (1995).
329. Coghill, E. *et al.* Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. *Blood* **97**, 1861–1868 (2001).
330. Tallack, M. R., Keys, J. R., Humbert, P. O. & Perkins, A. C. EKLF/KLF1 controls cell cycle entry via direct regulation of E2f2. *J. Biol. Chem.* **284**, 20966–20974 (2009).
331. Saußele, S. & Silver, R. T. Management of chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Ann. Hematol.* **94 Suppl 2**, S159–165 (2015).
332. Humbert, M. *et al.* Deregulated expression of Kruppel-like factors in acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **35**, 909–913 (2011).
333. Andersson, L. C., Nilsson, K. & Gahmberg, C. G. K562—a human erythroleukemic cell line. *Int. J. Cancer* **23**, 143–147 (1979).
334. Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. & Korsmeyer, S. J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* **17**, 3878–3885 (1998).
335. Hsu, Y. T., Wolter, K. G. & Youle, R. J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3668–3672 (1997).
336. Miyashita, T. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
337. Selvakumaran, M. *et al.* Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9**, 1791–1798 (1994).
338. Yu, D., Guo, Y., Tan, W. & Lin, D. [Functional Bax polymorphism associated with lung cancer susceptibility]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **32**, 324–327 (2010).
339. Moshynska, O., Sankaran, K. & Saxena, A. Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Mol. Pathol. MP* **56**, 205–209 (2003).
340. Saxena, A., Moshynska, O., Sankaran, K., Viswanathan, S. & Sheridan, D. P. Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett.* **187**, 199–205 (2002).
341. Ocaña, M. G. *et al.* Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* **9**, 249–255 (2007).
342. Testa, J. R. *et al.* Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat. Genet.* **43**, 1022–1025 (2011).
343. Wiesner, T. *et al.* Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat. Genet.* **43**, 1018–1021 (2011).
344. Jensen, D. E. *et al.* BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* **16**, 1097–1112 (1998).
345. Harbour, J. W. *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**, 1410–1413 (2010).
346. Peña-Llopis, S. *et al.* BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* **44**, 751–759 (2012).
347. Carbone, M. *et al.* Consensus Report of the 2015 Weinman International Conference on Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 1246–1262 (2016).

348. Carbone, M. *et al.* Combined Genetic and Genealogic Studies Uncover a Large BAP1 Cancer Syndrome Kindred Tracing Back Nine Generations to a Common Ancestor from the 1700s. *PLoS Genet.* **11**, e1005633 (2015).
349. Ventii, K. H. *et al.* BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res.* **68**, 6953–6962 (2008).
350. Bononi, A. *et al.* BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature* (2017). doi:10.1038/nature22798
351. White, A. E. & Harper, J. W. Emerging Anatomy of the BAP1 Tumor Suppressor System. *Science* **337**, 1463–1464 (2012).
352. Affar, E. B. & Carbone, M. BAP1 regulates different mechanisms of cell death. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).
353. Kimball, S. R., Fabian, J. R., Pavitt, G. D., Hinnebusch, A. G. & Jefferson, L. S. Regulation of guanine nucleotide exchange through phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF2 α . Role of the α - and δ -subunits of eIF2b. *J. Biol. Chem.* **273**, 12841–12845 (1998).
354. Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E. & Hinnebusch, A. G. Tight binding of the phosphorylated α subunit of initiation factor 2 (eIF2 α) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5018–5030 (2001).
355. Donzé, O., Jagus, R., Koromilas, A. E., Hershey, J. W. & Sonenberg, N. Abrogation of translation initiation factor eIF-2 phosphorylation causes malignant transformation of NIH 3T3 cells. *EMBO J.* **14**, 3828–3834 (1995).
356. Chen, T. *et al.* Chemical genetics identify eIF2 α kinase heme-regulated inhibitor as an anticancer target. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 610–616 (2011).
357. Denoyelle, S. *et al.* In vitro inhibition of translation initiation by N,N'-diarylureas--potential anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 402–409 (2012).
358. Chen, T. *et al.* Explorations of substituted urea functionality for the discovery of new activators of the heme-regulated inhibitor kinase. *J. Med. Chem.* **56**, 9457–9470 (2013).
359. Burwick, N. & Aktas, B. H. The eIF2- α kinase HRI: a potential target beyond the red blood cell. *Expert Opin. Ther. Targets* **21**, 1171–1177 (2017).
360. Burwick, N. *et al.* The eIF2- α kinase HRI is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Leuk. Res.* **55**, 23–32 (2017).
361. Allen, B. L. & Taatjes, D. J. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 155–166 (2015).
362. Malik, S. & Roeder, R. G. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 761–772 (2010).
363. Hasegawa, N. *et al.* Mediator Subunits MED1 and MED24 Cooperatively Contribute to Pubertal Mammary Gland Development and Growth of Breast Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1483–1495 (2012).
364. Wu, B. *et al.* MED12 mutations and NOTCH signalling in chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **179**, 421–429 (2017).
365. Ko, T. K. *et al.* The BIM deletion polymorphism: A paradigm of a permissive interaction between germline and acquired TKI resistance factors in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* **7**, 2721–2733 (2016).
366. Li, X. *et al.* BIM Deletion Polymorphism Confers Resistance to Osimertinib in EGFR T790M Lung Cancer: a Case Report and Literature Review. *Target. Oncol.* **13**, 517–523 (2018).
367. Yuan, J. *et al.* Clinical Implications of the BIM Deletion Polymorphism in Advanced Lung Adenocarcinoma Treated With Gefitinib. *Clin. Lung Cancer* **19**, e431–e438 (2018).
368. Zhang, L. *et al.* Clinical features of Bim deletion polymorphism and its relation with crizotinib primary resistance in Chinese patients with ALK/ROS1 fusion-positive non-small cell lung cancer. *Cancer* **123**, 2927–2935 (2017).
369. Masoumi-Moghaddam, S., Amini, A. & Morris, D. L. The developing story of Sprouty and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **33**, 695–720 (2014).
370. Haydn, J. M. *et al.* The MAPK pathway as an apoptosis enhancer in melanoma. *Oncotarget* **5**, 5040–5053 (2014).

371. Kachroo, N., Valencia, T., Warren, A. Y. & Gnanapragasam, V. J. Evidence for downregulation of the negative regulator SPRED2 in clinical prostate cancer. *Br. J. Cancer* **108**, 597–601 (2013).
372. Ma, X.-N. *et al.* Regulation of human hepatocellular carcinoma cells by Spred2 and correlative studies on its mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **410**, 803–808 (2011).
373. Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P. & Yeh, E. T. Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 28557–28562 (1997).
374. Willems, A. R., Schwab, M. & Tyers, M. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1695**, 133–170 (2004).
375. Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 323–333 (2005).
376. Zhou, W. *et al.* UBE2M Is a Stress-Inducible Dual E2 for Neddylation and Ubiquitylation that Promotes Targeted Degradation of UBE2F. *Mol. Cell* **70**, 1008-1024.e6 (2018).
377. Cukras, S., Morffy, N., Ohn, T. & Kee, Y. Inactivating UBE2M impacts the DNA damage response and genome integrity involving multiple cullin ligases. *PLoS One* **9**, e101844 (2014).
378. Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27**, S2–S19 (2008).
379. Baudin, A. *et al.* ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR resonance assignments and secondary structure determination of the extra-cellular domain from the human proapoptotic TRAIL-R2 death receptor 5 (DR5-ECD). *Biomol. NMR Assign.* **12**, 309–314 (2018).
380. von Karstedt, S., Montinaro, A. & Walczak, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 352–366 (2017).
381. Park, S.-J., Kim, M.-J., Kim, H.-B., Kang, C.-D. & Kim, S.-H. Sensitization of imatinib-resistant CML cells to TRAIL-induced apoptosis is mediated through down-regulation of Bcr-Abl as well as c-FLIP. *Biochem. J.* **420**, 73–81 (2009).
382. Peltonen, S., Kallionpää, R. A. & Peltonen, J. Neurofibromatosis type 1 (NF1) gene: Beyond café au lait spots and dermal neurofibromas. *Exp. Dermatol.* **26**, 645–648 (2017).
383. Rosenbaum, T. & Wimmer, K. Neurofibromatosis type 1 (NF1) and associated tumors. *Klin. Padiatr.* **226**, 309–315 (2014).
384. Philpott, C., Tovell, H., Frayling, I. M., Cooper, D. N. & Upadhyaya, M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Hum. Genomics* **11**, 13 (2017).
385. Szucs, Z. *et al.* Molecular subtypes of gastrointestinal stromal tumors and their prognostic and therapeutic implications. *Future Oncol. Lond. Engl.* **13**, 93–107 (2017).
386. Peschard, P. *et al.* Genetic deletion of RALA and RALB small GTPases reveals redundant functions in development and tumorigenesis. *Curr. Biol. CB* **22**, 2063–2068 (2012).
387. Yang, S.-H. *et al.* Overexpression of regulator of G protein signaling 11 promotes cell migration and associates with advanced stages and aggressiveness of lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **7**, 31122–31136 (2016).
388. Kechagioglou, P. *et al.* Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* **34**, 1387–1400 (2014).
389. Wise, H. M., Hermida, M. A. & Leslie, N. R. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **131**, 197–210 (2017).
390. Leslie, N. R. & Downes, C. P. PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochem. J.* **382**, 1–11 (2004).
391. Steelman, L. S. *et al.* Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* **22**, 686–707 (2008).
392. Huang, J. & Manning, B. D. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem. J.* **412**, 179–190 (2008).
393. Bar-Peled, L. *et al.* A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* **340**, 1100–1106 (2013).

394. Gregg, S. Q., Robinson, A. R. & Niedernhofer, L. J. Physiological consequences of defects in ERCC1–XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair* **10**, 781–791 (2011).
395. Sun, S. *et al.* Identification of PRKDC (Protein Kinase, DNA-Activated, Catalytic Polypeptide) as an essential gene for colorectal cancer (CRCs) cells. *Gene* **584**, 90–96 (2016).
396. Randle, S. J. & Laman, H. F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **36**, 3–17 (2016).
397. Wei, J. *et al.* A new mechanism of RhoA ubiquitination and degradation: Roles of SCF FBXL19 E3 ligase and Erk2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 2757–2764 (2013).
398. Kamai, T. *et al.* Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 4799–4805 (2004).
399. Liu, X., Chen, D. & Liu, G. Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1895–1901 (2014).
400. Notsuda, H. *et al.* p190A RhoGAP is involved in EGFR pathways and promotes proliferation, invasion and migration in lung adenocarcinoma cells. *Int. J. Oncol.* **43**, 1569–1577 (2013).
401. Choi, E. J., Kim, M. S., Song, S. Y., Yoo, N. J. & Lee, S. H. Low Frequent Mutation of ARHGAP35, a Candidate Tumor Suppressor Gene, in Gastric and Colorectal Cancers. *Pathol. Oncol. Res. POR* **24**, 175–176 (2018).
402. Xiao, Y. *et al.* RNF7 knockdown inhibits prostate cancer tumorigenesis by inactivation of ERK1/2 pathway. *Sci. Rep.* **7**, 43683 (2017).
403. Danckwardt, S., Hentze, M. W. & Kulozik, A. E. 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO J.* **27**, 482–498 (2008).
404. Masamha, C. P. & Wagner, E. J. The contribution of alternative polyadenylation to the cancer phenotype. *Carcinogenesis* **39**, 2–10 (2018).
405. Nilubol, N., Boufraquech, M., Zhang, L. & Kebebew, E. Loss of CPSF2 expression is associated with increased thyroid cancer cellular invasion and cancer stem cell population, and more aggressive disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E1173-1182 (2014).
406. Sung, T. Y. *et al.* Negative Expression of CPSF2 Predicts a Poorer Clinical Outcome in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* **25**, 1020–1025 (2015).
407. Miles, W. O. *et al.* Alternative Polyadenylation in Triple-Negative Breast Tumors Allows NRAS and c-JUN to Bypass PUMILIO Posttranscriptional Regulation. *Cancer Res.* **76**, 7231–7241 (2016).
408. Schönemann, L. *et al.* Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes Dev.* **28**, 2381–2393 (2014).
409. Yang, Q., Modi, P., Newcomb, T., Quéva, C. & Gandhi, V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 1537–1542 (2015).
410. Saran, U., Foti, M. & Dufour, J.-F. Cellular and molecular effects of the mTOR inhibitor everolimus. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **129**, 895–914 (2015).
411. Chen, Y. *et al.* Idelalisib induces G1 arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Oncol. Rep.* **36**, 3643–3650 (2016).
412. Schöffski, P. *et al.* A phase I-II study of everolimus (RAD001) in combination with imatinib in patients with imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21**, 1990–1998 (2010).
413. Kuwatsuka, Y. *et al.* The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Cancer J.* **1**, e17 (2011).
414. Small Molecules Inhibit the RAS-Like Small GTPases RALA and RALB. *Cancer Discov.* **4**, 1251–1251 (2014).
415. Fredericks, J. & Ren, R. The role of RAS effectors in BCR/ABL induced chronic myelogenous leukemia. *Front. Med.* **7**, 452–461 (2013).
416. Molli, P. R., Pradhan, M. B., Advani, S. H. & Naik, N. R. RhoA: a therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Mol. Cancer* **11**, 16 (2012).

417. Chen, J.-Y., Wang, M.-C. & Hung, W.-C. Bcr-Abl-induced tyrosine phosphorylation of Emi1 to stabilize Skp2 protein via inhibition of ubiquitination in chronic myeloid leukemia cells. *J. Cell. Physiol.* **226**, 407–413 (2011).
418. Lee, Y. & Lim, H.-S. Skp2 Inhibitors: Novel Anticancer Strategies. *Curr. Med. Chem.* **23**, 2363–2379 (2016).
419. Ko, T. K., Chuah, C. T. H., Huang, J. W. J., Ng, K.-P. & Ong, S. T. The BCL2 inhibitor ABT-199 significantly enhances imatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia progenitors. *Oncotarget* **5**, 9033–9038 (2014).
420. Hamai, A. *et al.* Imatinib enhances human melanoma cell susceptibility to TRAIL-induced cell death: Relationship to Bcl-2 family and caspase activation. *Oncogene* **25**, 7618–7634 (2006).
421. Pedriali, G. *et al.* Regulation of Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Ca²⁺ Transfer and Its Importance for Anti-Cancer Therapies. *Front. Oncol.* **7**, (2017).
422. Kondratskyi, A. *et al.* Identification of ML-9 as a lysosomotropic agent targeting autophagy and cell death. *Cell Death Dis.* **5**, e1193 (2014).
423. Lee, T. I. & Young, R. A. Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease. *Cell* **152**, 1237–1251 (2013).
424. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.* **44**, 685–689 (2012).
425. Firestein, R. *et al.* CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* **455**, 547–551 (2008).
426. Kapoor, A. *et al.* The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* **468**, 1105–1109 (2010).
427. Bhagwat, A. S. *et al.* BET Bromodomain Inhibition Releases the Mediator Complex from Select cis-Regulatory Elements. *Cell Rep.* **15**, 519–530 (2016).
428. Law, J. C., Ritke, M. K., Yalowich, J. C., Leder, G. H. & Ferrell, R. E. Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk. Res.* **17**, 1045–1050 (1993).

Identification de voies de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique par criblage CRISPR-Cas9.

La caractérisation des tumeurs malignes et la compréhension des mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux sont essentielles pour la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Les criblages génétiques, devenus encore plus puissants avec la technologie d'édition du génome CRISPR-Cas9, le séquençage nouvelle génération et la bioinformatique, sont des outils formidables pour décrypter de nouveaux mécanismes cellulaires, dont la résistance au traitement. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif qui est caractérisé par l'anomalie génétique t(9;22). Cette aberration chromosomique est à l'origine du gène de fusion *BCR-ABL1* qui code l'oncogène du même nom responsable de la prolifération anarchique des cellules. L'imatinib mesylate, un inhibiteur de tyrosine kinase, élimine de manière spécifique les cellules leucémiques en ciblant et en bloquant l'activité kinase de cette protéine. Malheureusement, comme pour tout type de thérapie ciblée, une résistance au traitement survient chez certains patients. Afin de repérer des nouvelles voies de résistance à cet inhibiteur de tyrosine kinase, nous avons effectué un criblage génétique avec la librairie « genome-scale CRISPR knock-out » (GeCKO v2) *in vitro* dans la lignée cellulaire K562. Nous avons découvert plusieurs gènes qui semblent être essentiels pour la réponse au traitement par imatinib, tels que les facteurs pro-apoptotiques *BIM* et *BAX*, ou le répresseur de la voie des MAPK, *SPRED2*. Le rétablissement spécifique de l'apoptose dans les cellules *BIM* knock-out (KO) par des BH3-mimétiques, ou l'inhibition ciblée de la voie MAPK dans la lignée *SPRED2* KO sensibilise de nouveau les lignées résistantes. Dans ce travail, nous avons découvert des mécanismes de résistance déjà connus (l'apoptose, la voie MAPK...) mais nous avons également démontré l'implication de voies peu connues telles que le complexe Mediator, la maturation de ARNm et l'ubiquitylation de protéines. Spécifiquement cibler ces lésions génétiques avec des thérapies ciblées combinées peut permettre de surmonter les phénotypes de résistance et ouvre la porte à l'utilisation de l'oncologie de précision.

Mots clés : inhibiteurs de tyrosine kinase, leucémie myéloïde chronique, criblage CRISPR-Cas9

Genome-wide CRISPR-Cas9 Screening to Identify Pathways Involved in Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Chronic Myeloid Leukemia.

The characterisation of malignant tumour growth and the understanding of resistance mechanisms to treatment in cancer is of utmost importance for the discovery of novel "druggable" targets. Efficient genetic screening, now even more possible with the convergence of CRISPR-Cas9 gene editing technology, next-generation sequencing and bioinformatics, is an important tool for deciphering novel cellular processes, such as resistance to treatment in cancer. Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder characterised by the t(9;22) genetic abnormality, which encodes the driver of CML, the BCR-ABL1 fusion protein. Imatinib mesylate, a tyrosine kinase inhibitor, specifically eliminates CML cells by targeting and blocking the kinase activity of this protein, yet, as for all targeted therapies in cancer, resistance to treatment exists. In order to discover alternative BCR-ABL1 independent mechanisms of imatinib resistance, we utilized the genome-scale CRISPR knock-out library GeCKO v2 to screen for imatinib sensitising genes *in vitro* on K562 cells. We revealed genes that seem essential for imatinib induced cell death, such as pro-apoptotic genes (*BIM*, *BAX*) or MAPK inhibitor *SPRED2*. Specifically re-establishing apoptotic capabilities in *BIM* knock-out (KO) cells with BH3-mimetics, or inhibiting MAP-kinase signalling in *SPRED2* KO cells with MEK inhibitors restores sensitivity to imatinib, overcoming resistance phenotypes. In this work, we discovered previously identified pathways (apoptosis, MAP-kinase signalling) and novel pathways that modulate response to imatinib in CML cell lines, such as the implication of the Mediator complex, mRNA processing and protein ubiquitylation. Targeting these specific genetic lesions with combinational therapy can overcome resistance phenotypes and paves the road for the use of precision oncology.

Key words: tyrosine kinase inhibitors, chronic myeloid leukemia, CRISPR-Cas9 screen