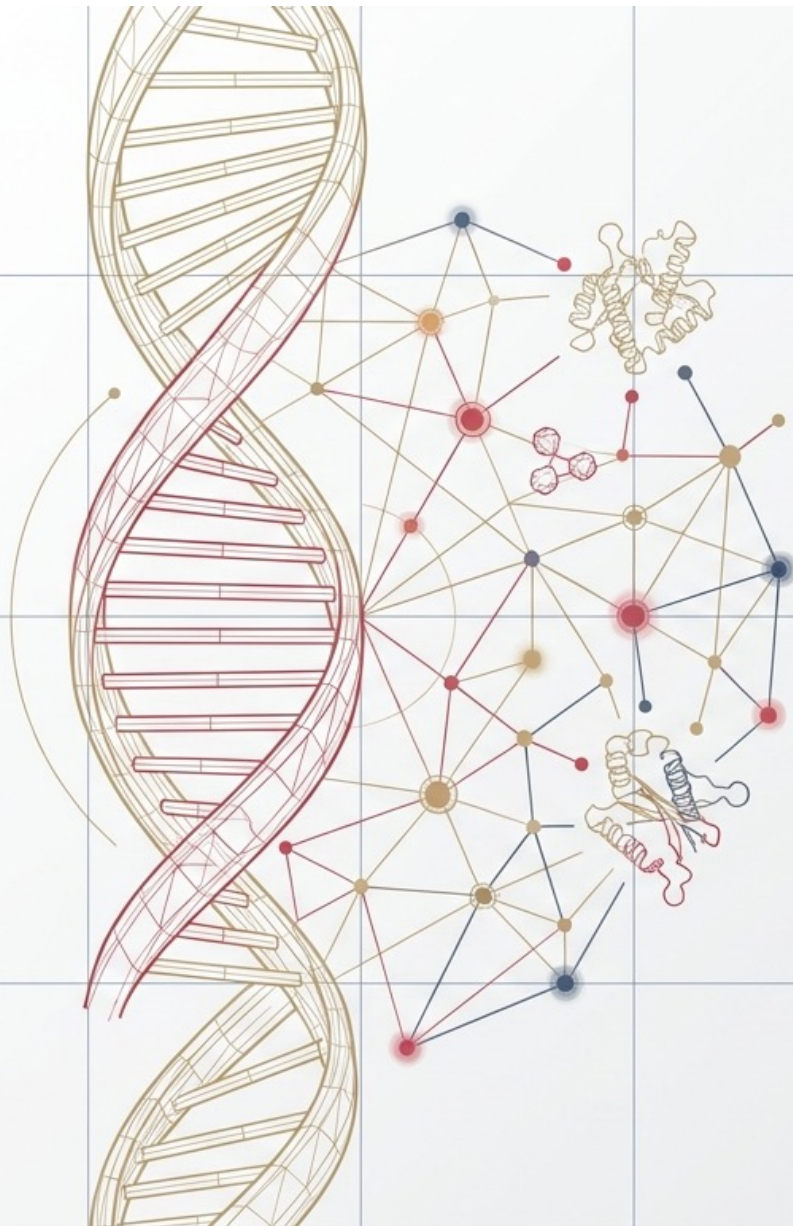




Le plan fonctionnel de l'oncologie : Découverte de cibles thérapeutiques via les cribles CRISPR/Cas9

De l'hétérogénéité génétique à la causalité fonctionnelle dans les hémopathies malignes.

1

Ciblage précis des dépendances cellulaires.

2

Létalité synthétique et mécanismes de résistance.

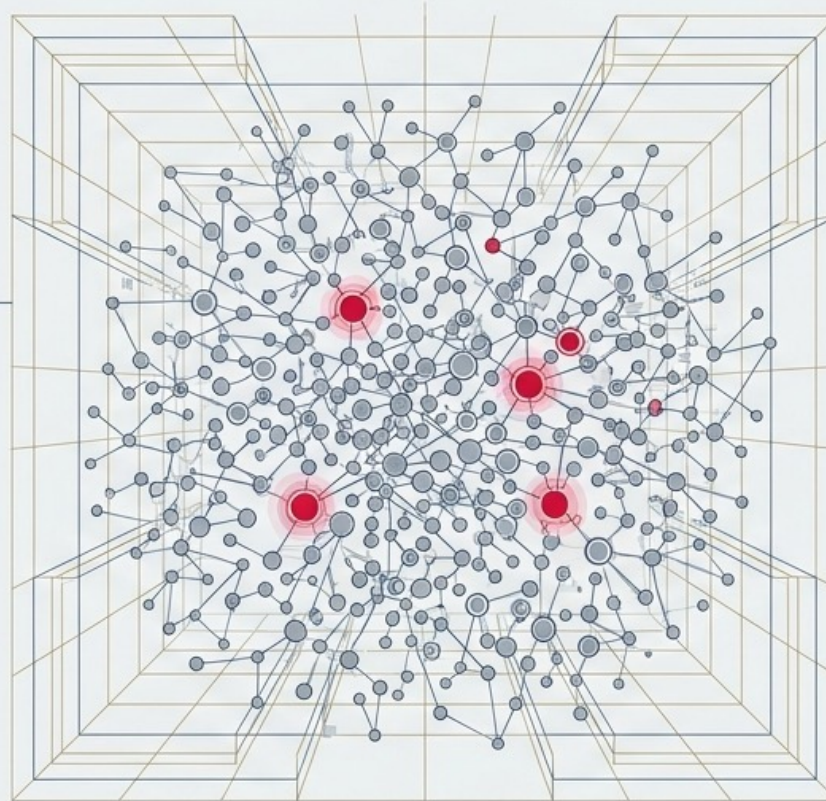
3

Optimisation des immunothérapies (CAR-T, MoAbs).

Le défi de l'hétérogénéité génétique : Le bruit de fond mutationnel

**50 à 400
mutations**

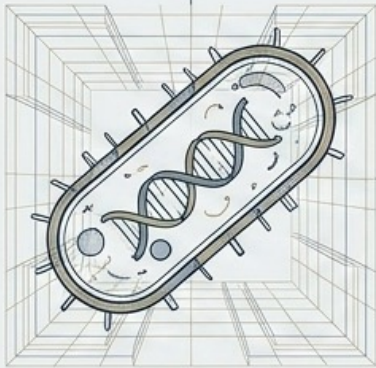
Identifiées en moyenne
par patient dans les
hémopathies malignes.



Comment distinguer
les altérations motrices
(drivers) responsables
de la survie tumorale,
des mutations
passagères (passengers)
sans impact fonctionnel ?

La révolution CRISPR/Cas9 : De l'immunité bactérienne à l'édition génomique

2005



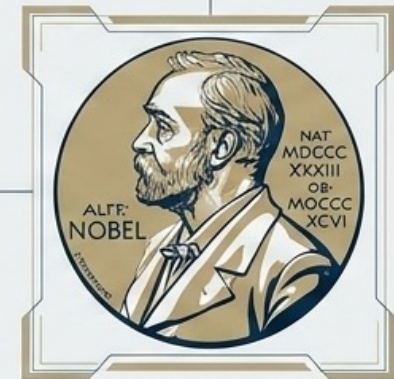
Découverte des séquences CRISPR comme système d'immunité adaptative bactérienne.

2012



Caractérisation biochimique du clivage médié par Cas9 (E. Charpentier & J. Doudna).

2020



Prix Nobel de Chimie pour le développement de l'outil d'édition du génome.

CRISPR/Cas9

Le plafond de verre des approches OMICS : La corrélation n'équivaut pas à la causalité



La carte statique : Approches OMICS

Séquençage et profilage transcriptionnel.

Révèle l'architecture structurelle et les
certaines d'altérations existantes.

Nature : Purement observationnelle et
corrélative.



Le test de stress : Génomique Fonctionnelle

Criblage par perturbation CRISPR/Cas9.

Interroge directement les réseaux de
survie et la dépendance à une cible.

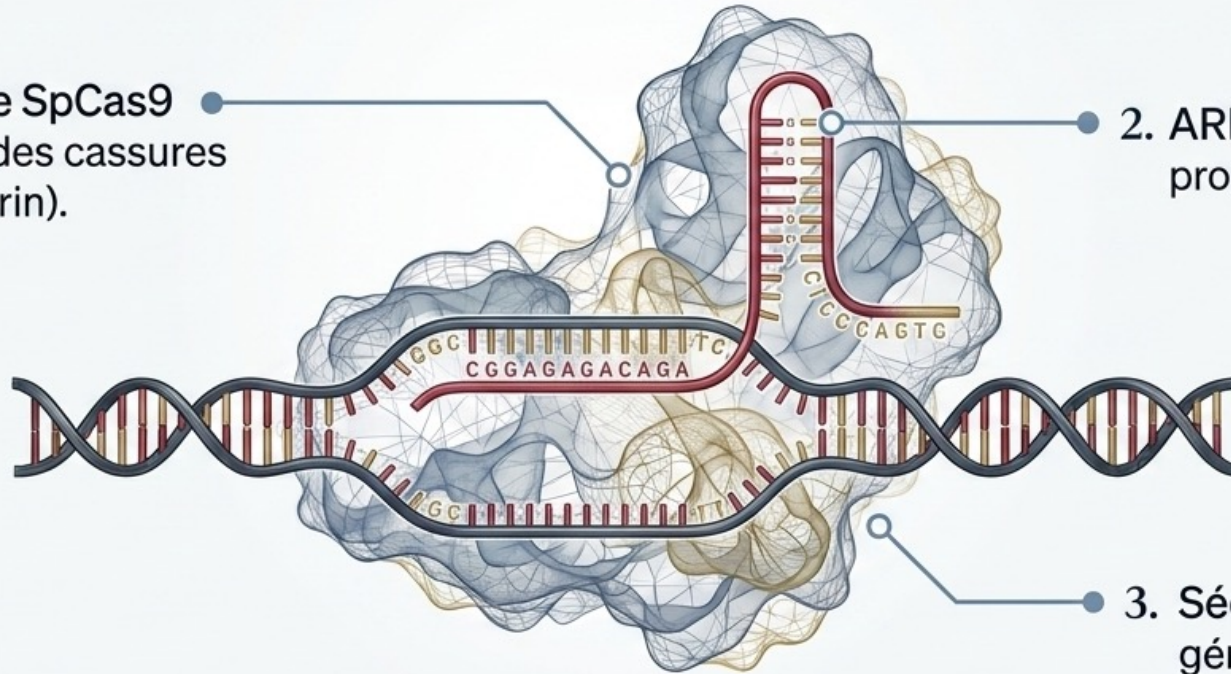
Nature : Strictement causale (gène
inactivé = mort cellulaire).

CRISPR/Cas9

L'anatomie de la perturbation causale : Le complexe Ribonucléoprotéique (RNP)

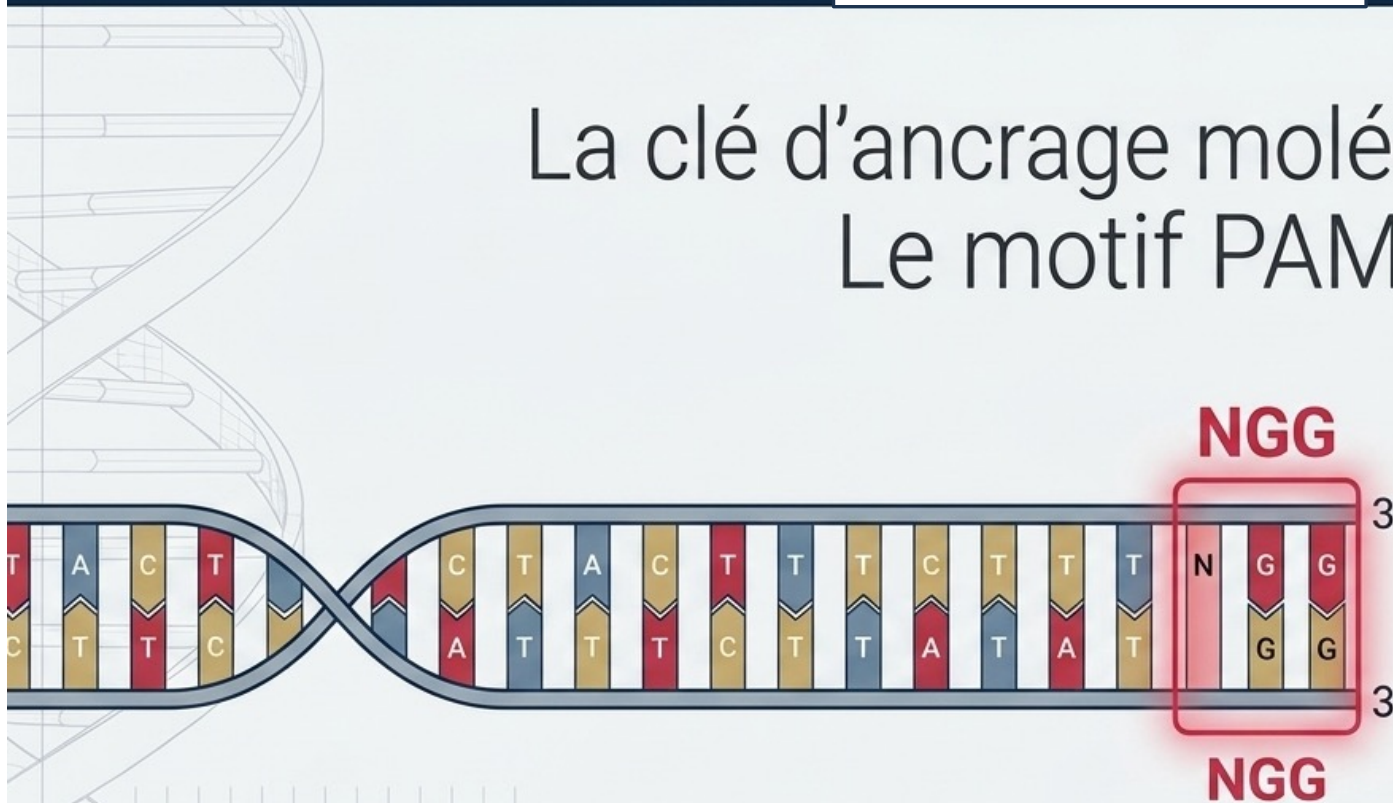
1. Nucléase SpCas9
(Génère des cassures
double-brin).

2. ARN guide (sgRNA)
programmable.



3. Séquence cible
génomique.

La clé d'ancrage moléculaire : Le motif PAM

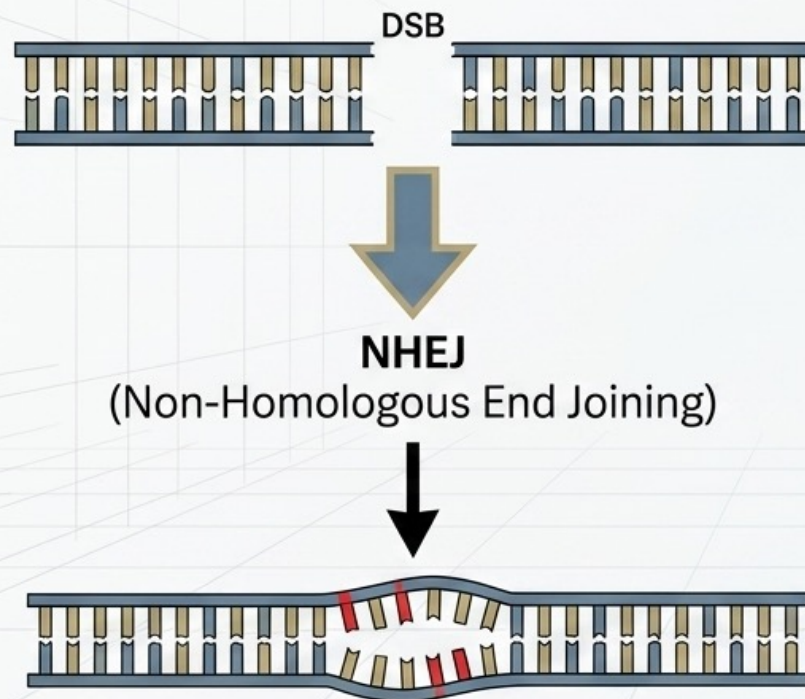


Protospacer Adjacent Motif (PAM)

La Protospacer Adjacent Motif (PAM) (Protospacer Adjacent 3' enièlement l'interaction PAM-Cas9 est le prérequis dopons de diirarde absolu pour l'ouverture du double brin d'ADN.

- Séquence indispensable (NGG pour SpCas9) flquant la cible en 3'.
- L'interaction PAM-Cas9 est le prérequis absolu pour l'ouverture du double brin d'ADN.
- Garantit la spécificité de la liaison et initie le clivage catalytique.

Mécanismes de réparation post-clivage (1/2) : La voie NHEJ



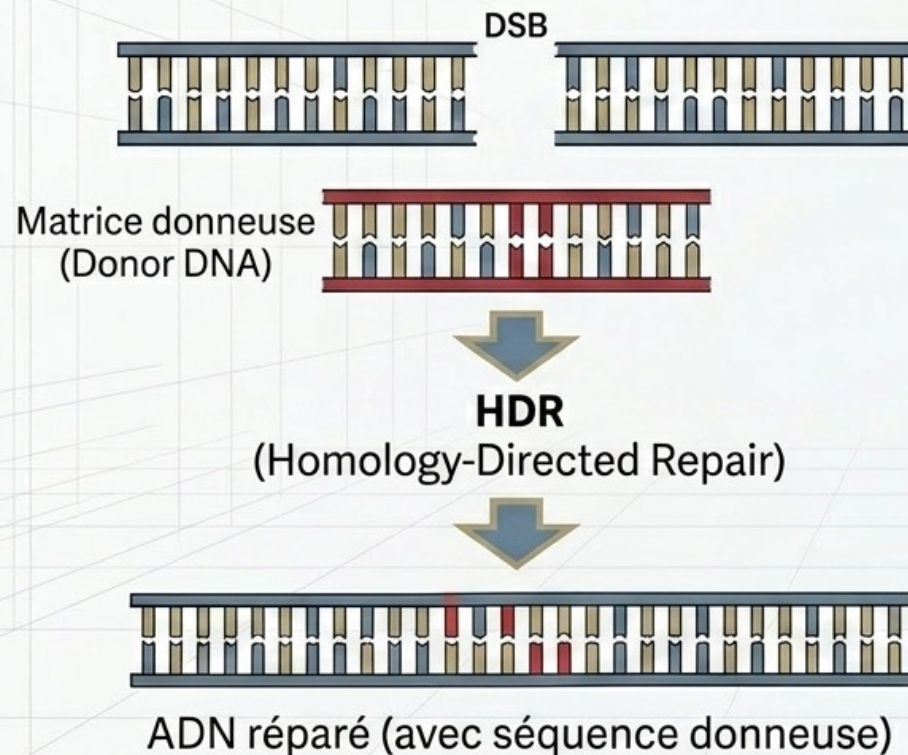
Conséquence Fonctionnelle

Processus **rapide** mais propice aux erreurs.

Génère des **Indels**
(Insertions/Délétions) provoquant
un **décalage du cadre de lecture**.

Résultat : Knock-out (KO) génétique
complet.

Mécanismes de réparation post-clivage (2/2) : La voie HDR



Conséquence Fonctionnelle

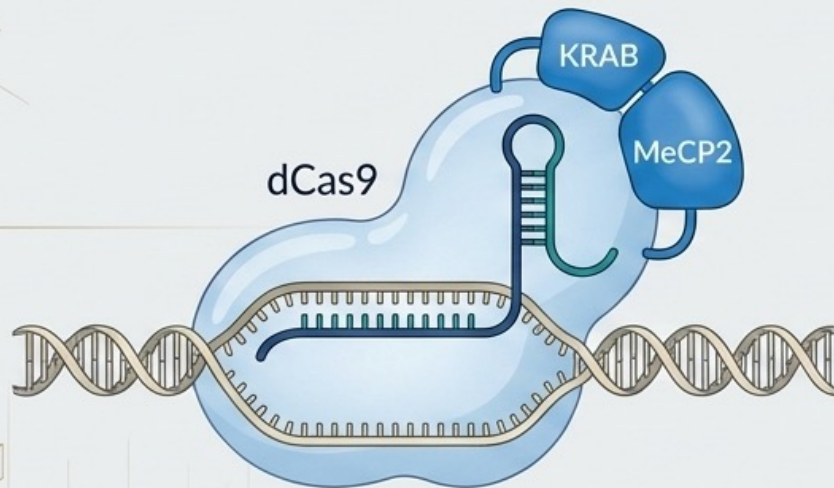
Réparation précise utilisant une matrice externe.

Permet l'introduction spécifique de **mutations** ou de marqueurs.

Résultat : **Knock-in (KI) ciblé** ou **édition de précision**.

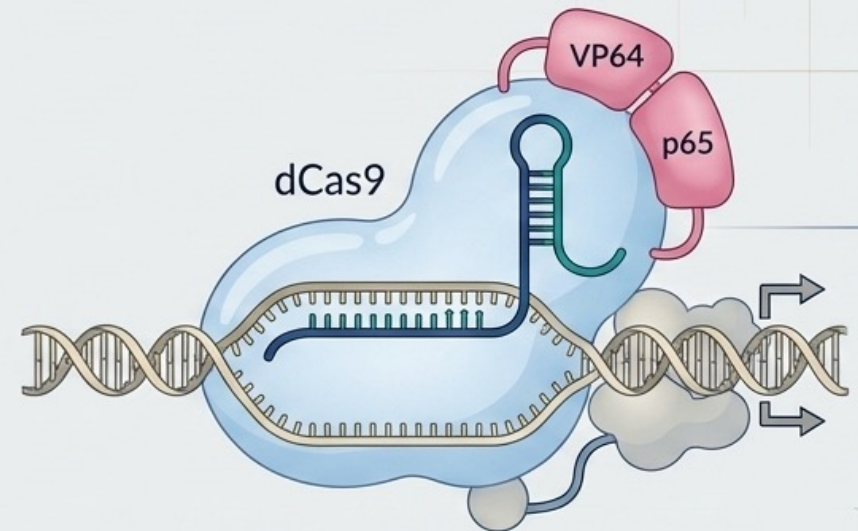
L'évolution de l'outil : Modulation transcriptionnelle (CRISPRi et CRISPRa)

CRISPRi



Répression stérique et recrutement de facteurs inhibiteurs. **Silencage génétique sans coupure de l'ADN.**

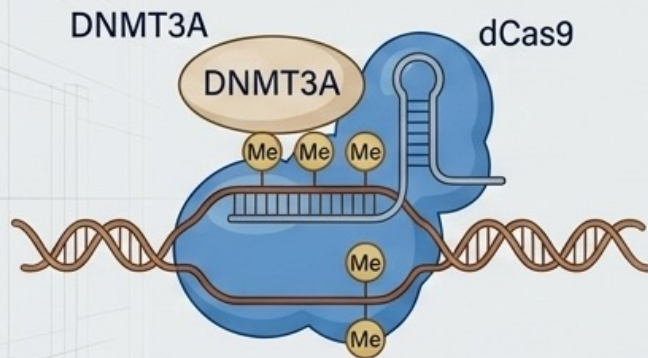
CRISPRa



Activation transcriptionnelle ciblée.
Force l'expression de gènes endogènes via le recrutement de la machinerie cellulaire.

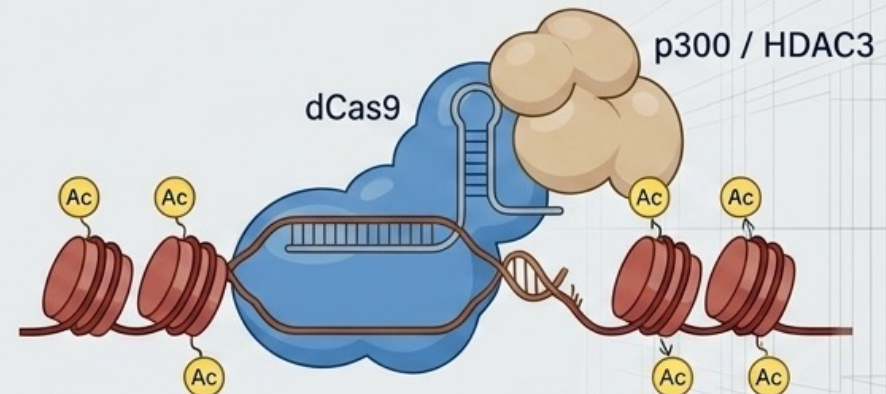
L'évolution de l'outil : Édition épigénétique ciblée

Méthylation ciblée de l'ADN



Méthylation ciblée de l'ADN pour réprimer durablement les promoteurs.

Acétylation / Désacétylation des histones



Acétylation ou désacétylation des histones pour le remodelage local de la chromatine.

Avantage majeur : Permet un **criblage à haut débit** des **éléments régulateurs non codants** sans altérer la séquence génomique.

CRISPR/Cas9

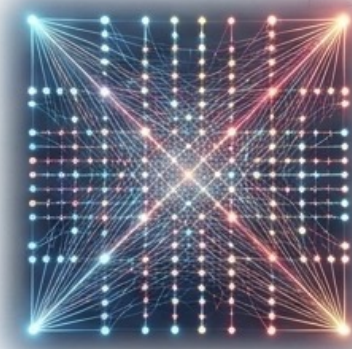
La transition vers le haut débit : Interroger le génome entier



Édition Monogénique
(1 cible)



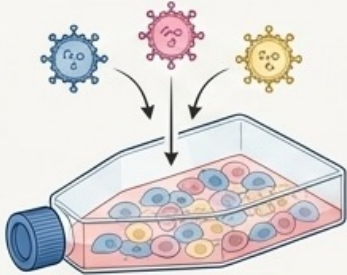
Criblage Cibléd
(Panel de centaines de gènes)



Criblage Génome Entier
(Perturbation simultanée
de 19 000 gènes)

**Comment passer d'un outil de précision à une
plateforme de découverte causale massive ?**

Architecture des cribles à haut débit : Pooled vs Arrayed

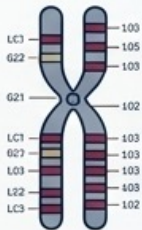
Cribles Mélangés (Pooled)	Cribles en Puits (Arrayed)
	
Mécanique : Bibliothèque globale transduite en masse dans un seul pool cellulaire.	Mécanique : Un gène ciblé par puits distinct (plaques multipuits).
Lectures (Readouts) : Survie (FACS), prolifération, marqueurs de surface.	Lectures (Readouts) : Imagerie à haut contenu, sécrétome, morphologie.
Avantage : Haut débit massif, faible coût, idéal pour létalité synthétique.	Avantage : Permet l'analyse de phénotypes complexes et des interactions cellulaires.

Conception de l'architecture : Bibliothèques sgRNA

Bibliothèque type Brunello



Exemple de conception optimisée



19 000
gènes codants
ciblés

Lentiviral vector
plasmid

sgRNA
cassette

> 75 000
sgRNAs
différents



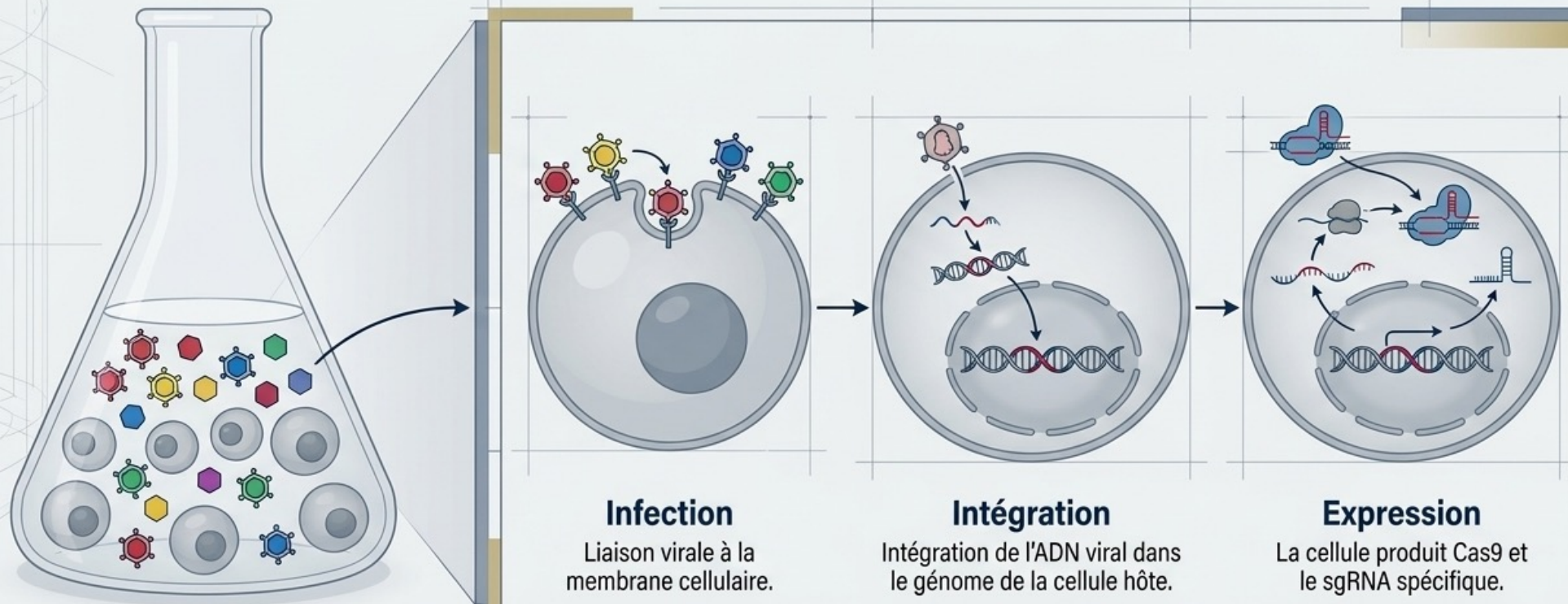
4 guides distincts
par gène pour assurer la
robustesse statistique

L'objectif est d'assurer une couverture complète du protéome humain tout en minimisant les effets hors-cible (*off-targets*).

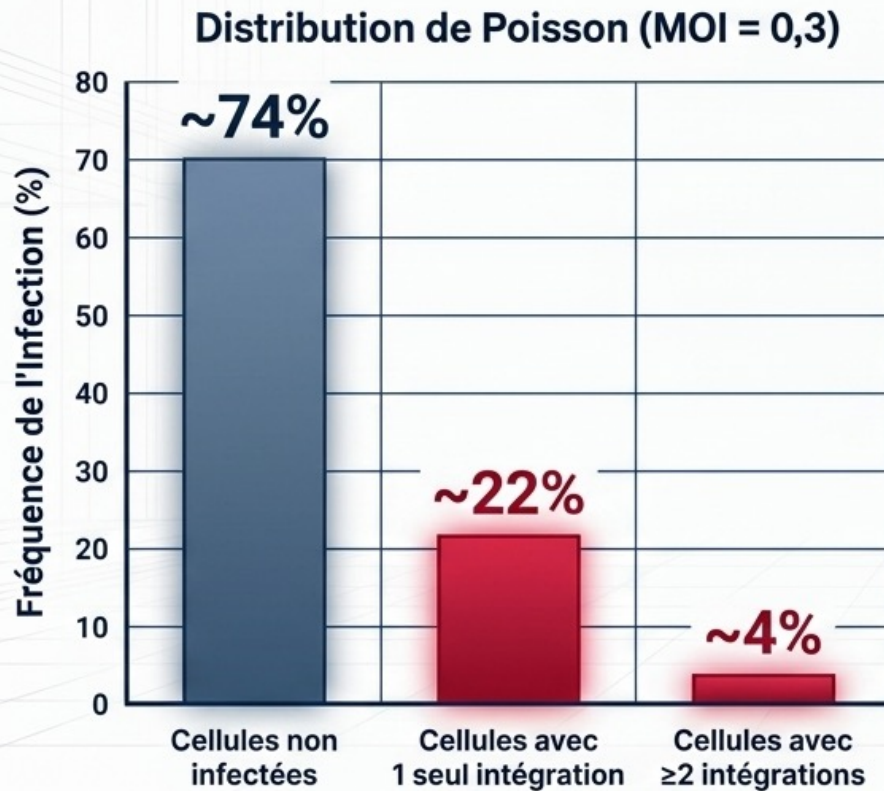
CRISPR/Cas9

⚠ Impératif absolu : Éviter les effets de confusion poly-géniques (un phénotype doit être attribuable à un seul gène).

Étape 1 : La dynamique de la transduction lentivirale



L'importance critique de la faible MOI (Multiplicité d'Infection 0,3)



Conclusion Clé : Causalité Stricte

La loi de Poisson dicte qu'à une MOI de 0,3, la grande majorité des cellules infectées ne recevront qu'un seul sgRNA. Cela garantit la causalité stricte : 1 cellule = 1 Knock-out = 1 phénotype.

↳ Élimination des effets de confusion poly-géniques.

Maintien de la représentation : L'arithmétique du crible

$$\begin{array}{ccc} 100\,000 & \times & 500 \text{ cellules de} \\ \text{perturbations (sgRNAs)} & & \text{représentation par guide} \\ = & \boxed{50 \text{ millions de cellules infectées requises}} \end{array}$$

À une efficacité d'infection de 40% (MOI 0.3) :

Il faut cultiver 125 millions de cellules de départ par réplicat.

La logistique de laboratoire devient massive, nécessitant des bioréacteurs ou de multiples flasques d'expansion pour éviter les goulots d'étranglement statistiques.

Étape 2 : Sélection et maturation cellulaire



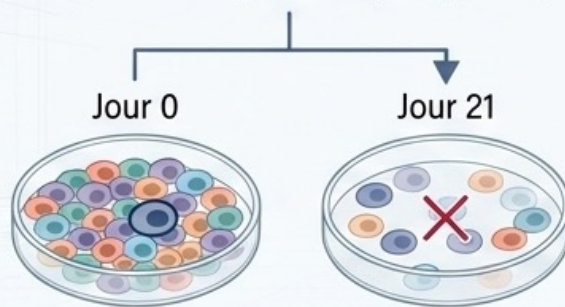
Pourquoi 14 doublements ?

Le KO est génétique, mais la protéine préexistante doit être métaboliquement dégradée (turnover) pour que le phénotype d'essentialité se manifeste cliniquement.

Paradigmes de lecture : Déplétion vs Enrichissement

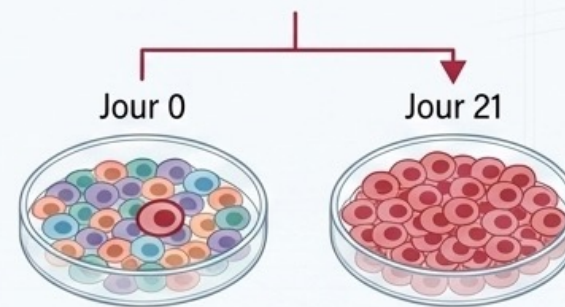
Comparaison des populations de cellules
(Jour 0 vs Jour 21)

Crible de Déplétion (Drop-out)



Les sgRNAs qui disparaissent ciblent des gènes essentiels à la survie ou révèlent une létalité synthétique.

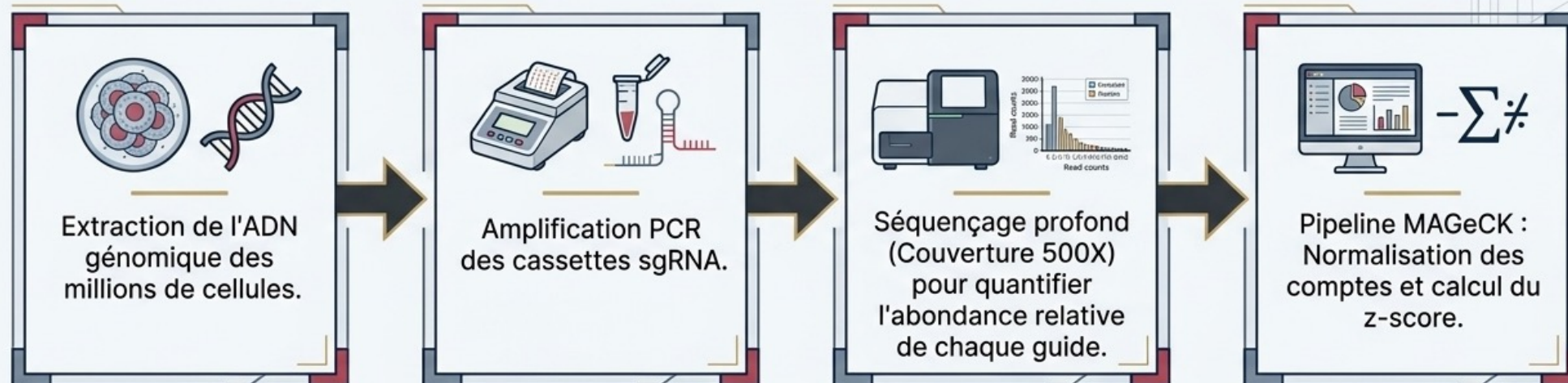
Crible d'Enrichissement



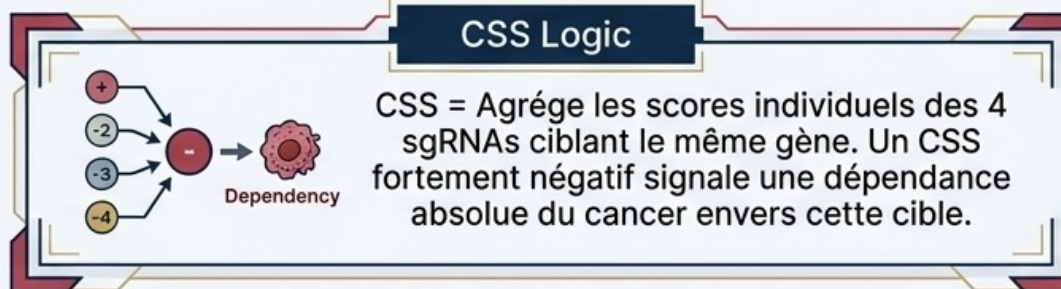
Les sgRNAs qui pullulent ciblent des gènes conférant une résistance à une pression médicamenteuse.

CRISPR/Cas9

Étape 3 : Du séquençage NGS au CRISPR Screen Score (CSS)

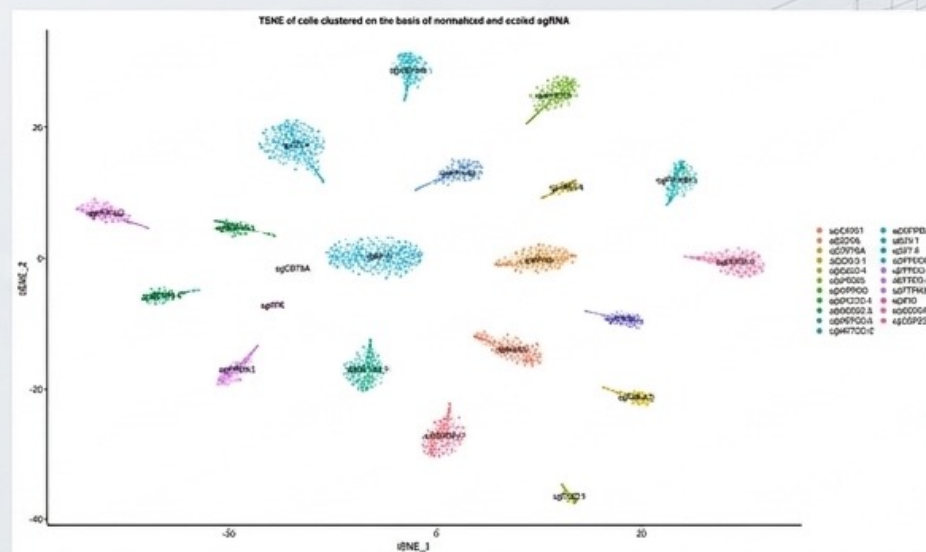
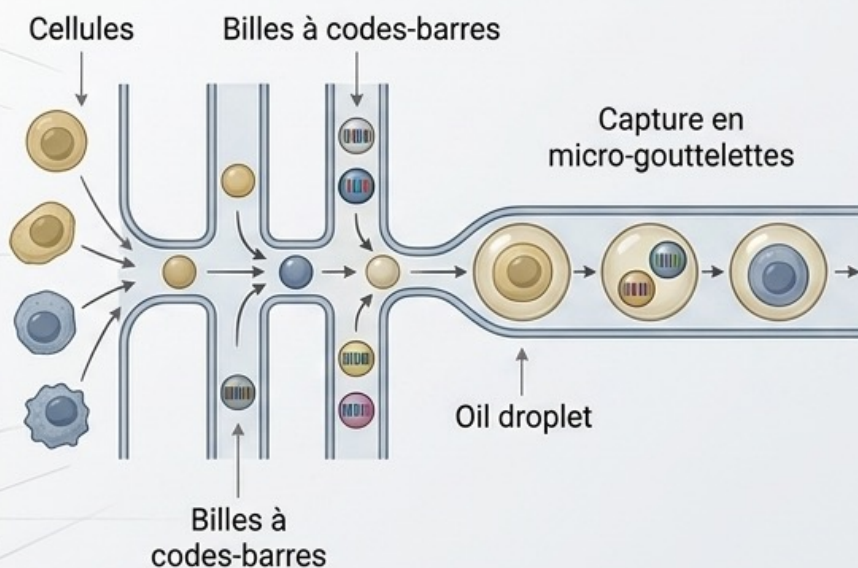


CSS Logic



CRISPR/Cas9

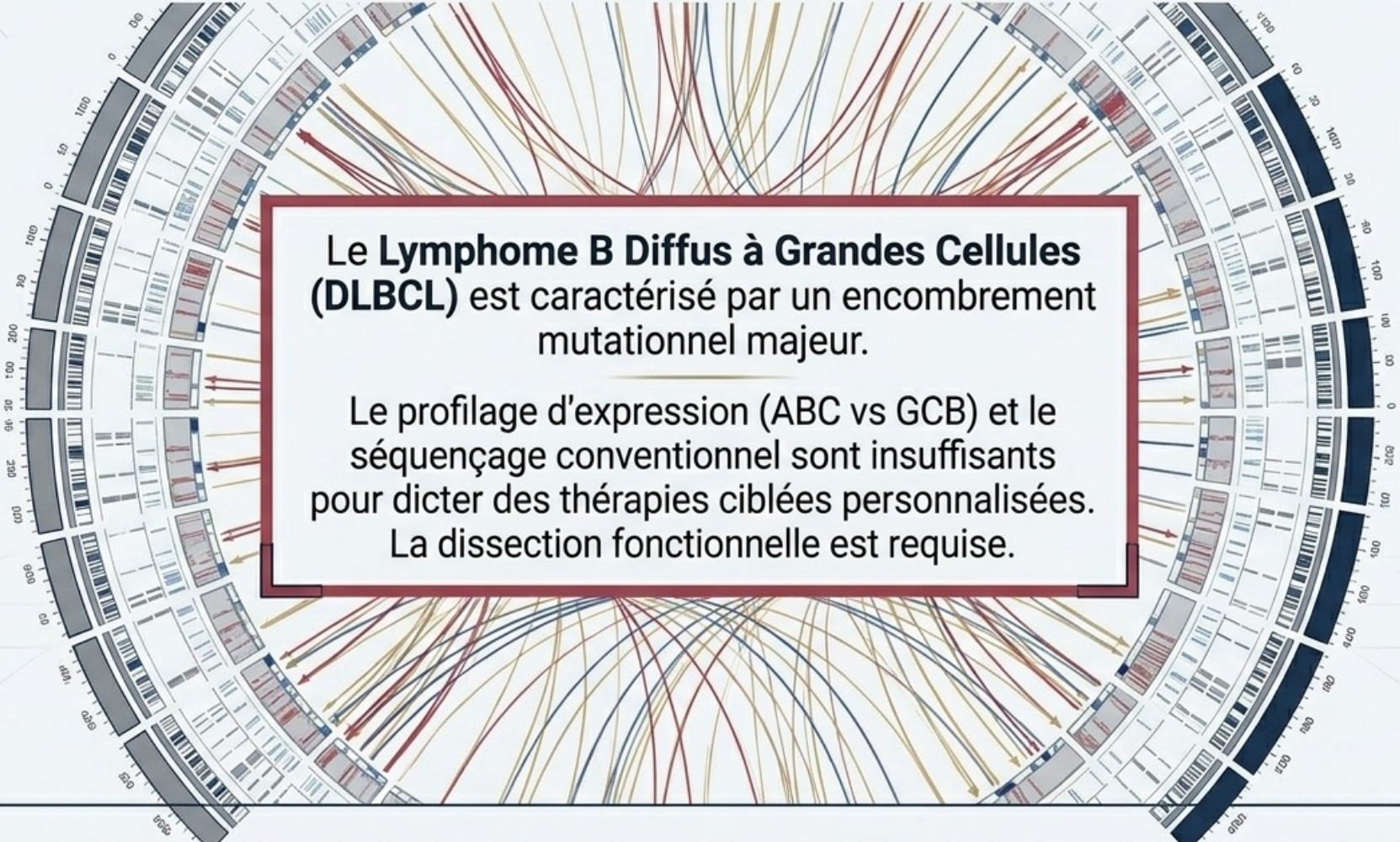
L'avant-garde : CRISPR en cellule unique (scCRISPR-seq)



Méthodes (PERTURB-seq, CROP-seq, ECCITE-seq) : Le vecteur est modifié pour que le transcrit du sgRNA soit polyadénylé et capturé.

Résultat révolutionnaire : Au lieu d'un simple signal binaire (mort/vivant), nous cartographions le transcriptome complet résultant de CHAQUE perturbation individuelle.

Application clinique : Le paysage génétique complexe du DLBCL

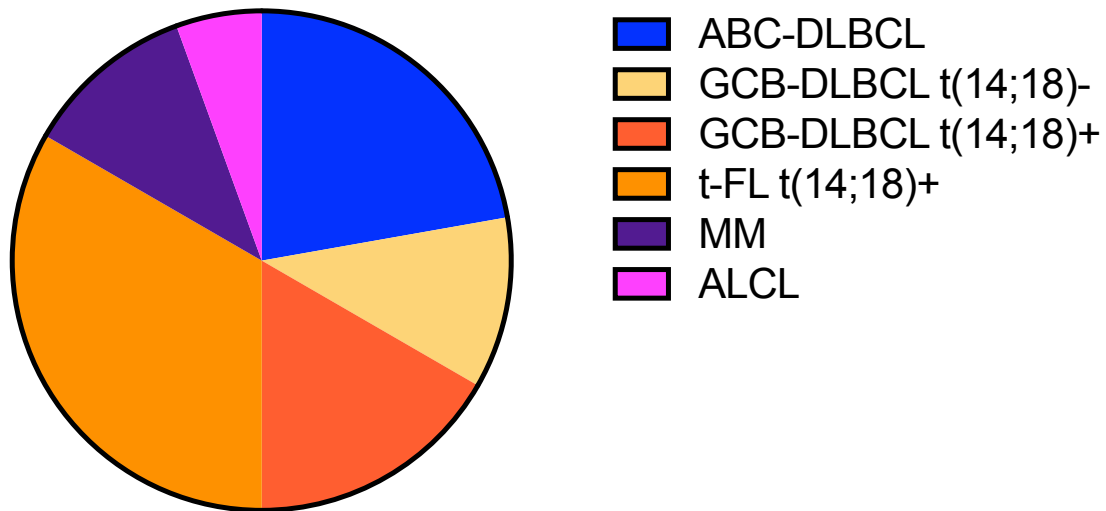
A circular genomic plot representing the genetic landscape of DLBCL. The plot is divided into segments representing chromosomes, with numerical labels (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, X, Y) around the perimeter. Numerous colored lines (red, orange, yellow, green, blue) connect different segments, indicating complex genomic rearrangements and interactions. A central text box is overlaid on the plot.

Le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL) est caractérisé par un encombrement mutationnel majeur.

Le profilage d'expression (ABC vs GCB) et le séquençage conventionnel sont insuffisants pour dicter des thérapies ciblées personnalisées. La dissection fonctionnelle est requise.

CRISPR/Cas9

> 25 cell lines screened



Broad Institute
BRUNELLO library

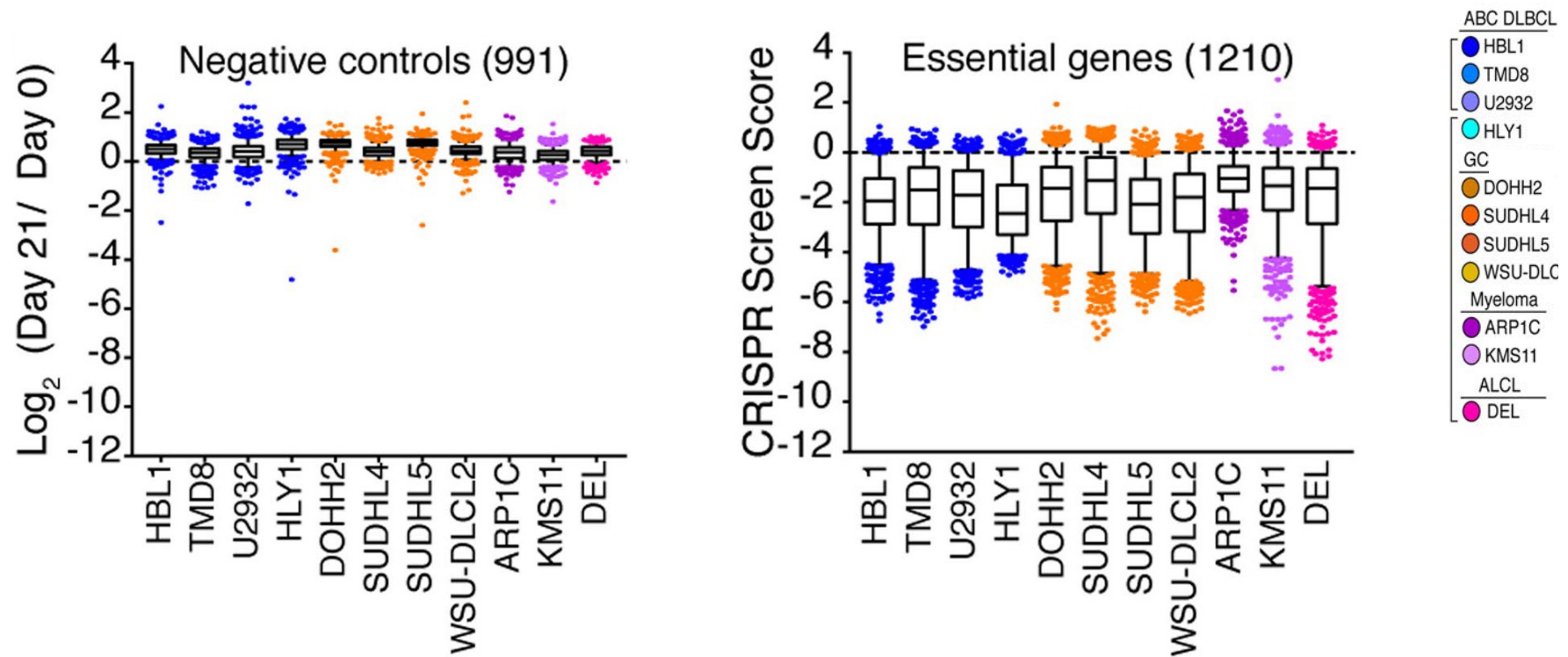
>75,000 CRISPR sgRNA

19,000 protein-coding genes

4 unique guides per gene

Phelan JD et al. Nature, 2018

CRISPR/Cas9



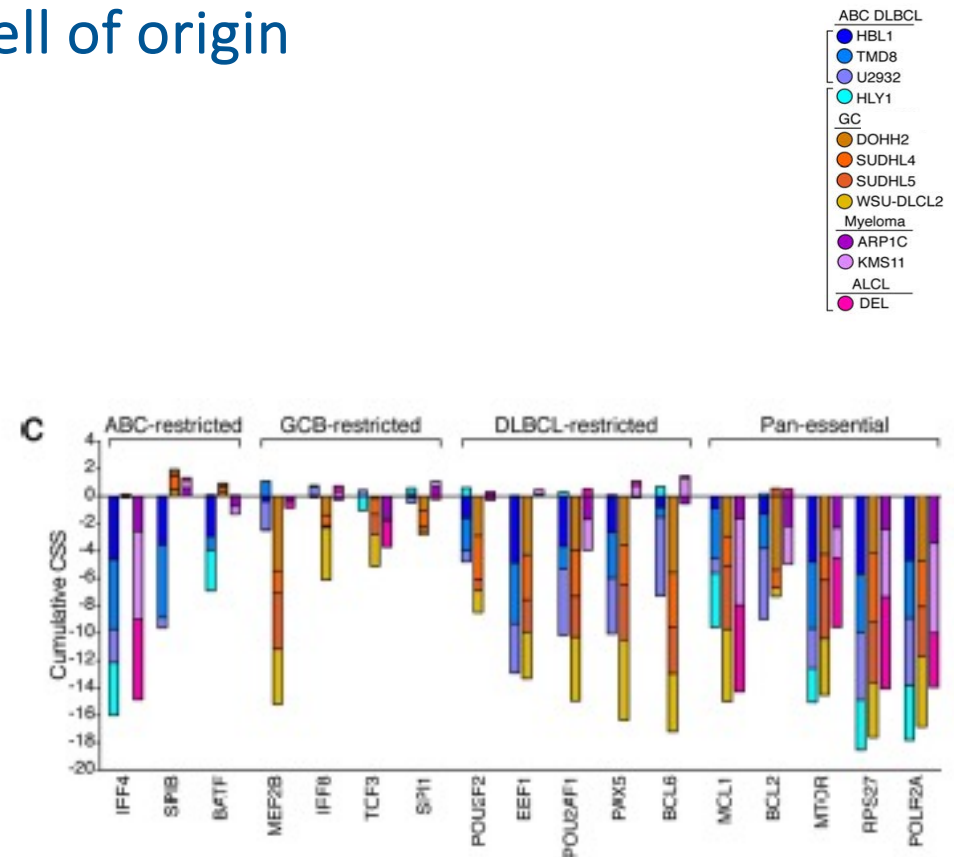
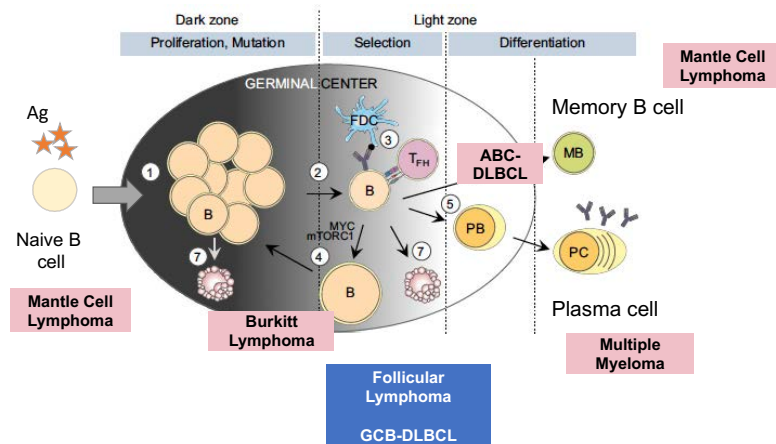
Phelan JD et al. Nature, 2018

Le crible CRIPR/Cas9 permet d'identifier des gènes essentiels dans le DLBCL avec très peu d'effets off-target

CRISPR/Cas9

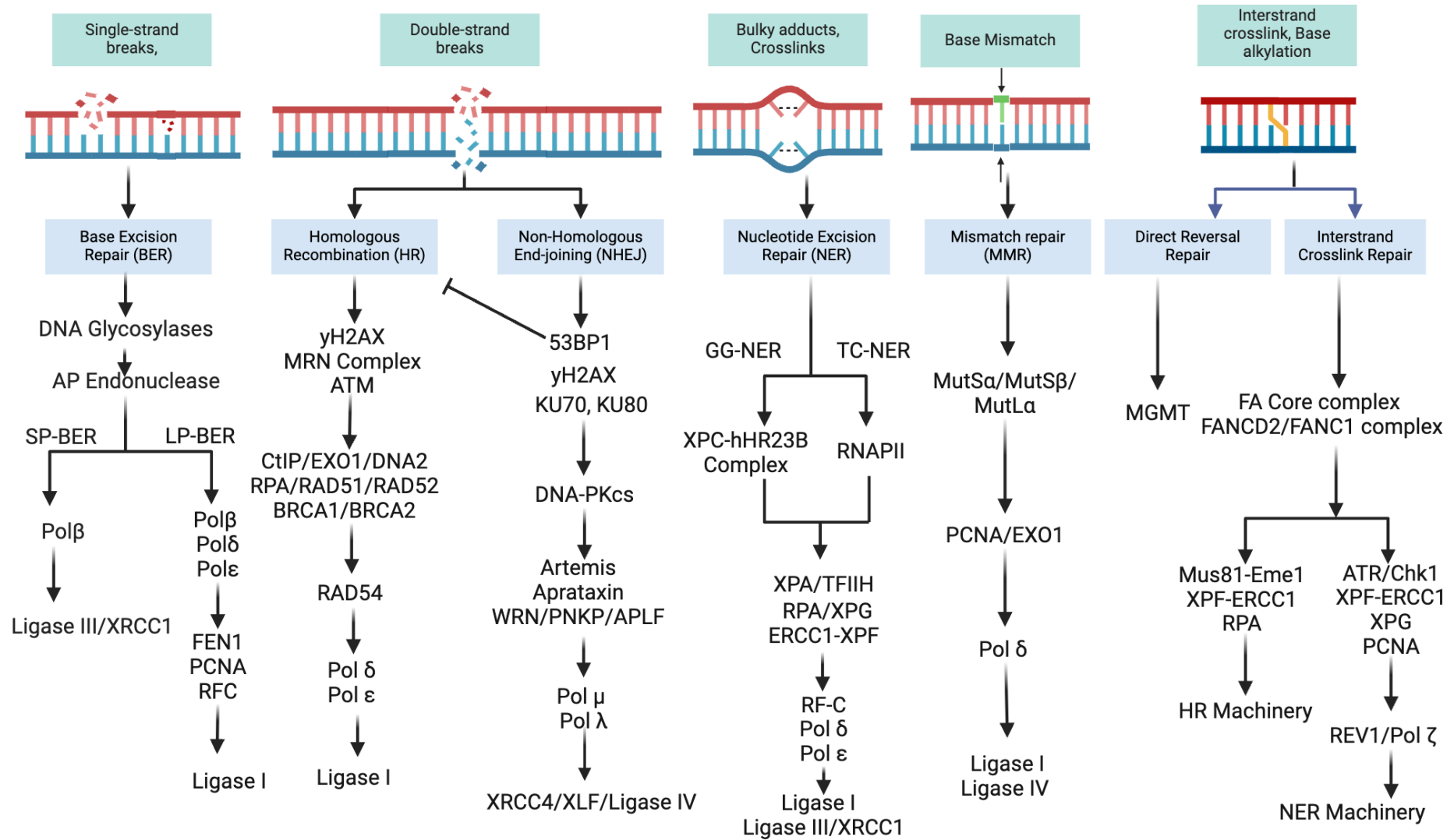
CRISPR screens identify genes selectively essential in cells with a distinct cell of origin

B cell lymphoma subtypes reflect the origin from B cells at different stages of B cell differentiation : The Cell of Origin (COO)



Phelan JD et al. Nature, 2018

CRISPR/Cas9

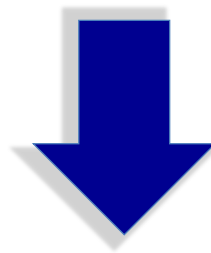


Réparation de l'ADN et cancer

Dérégulation des mécanismes de réparation de l'ADN :

-création d'un **contexte cellulaire favorable à la tumorigénèse** :

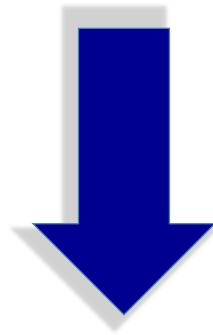
- **tolérance** face à des **lésions conférant un avantage** à la cellule cancéreuse
instabilité génomique prédisposant à la mutagénèse
répertoire de réparation en théorie réduit par rapport aux cellules saines
- **réparation de lésions défavorables** à la croissance tumorale



Mécanismes de réparation = cibles thérapeutiques potentielles

Concept de létalité synthétique

Principe : exploiter un défaut de réparation de l'ADN de la cellule cancéreuse en inhibant une voie de réparation complémentaire



altération de la viabilité des cellules cancéreuses
tout en préservant théoriquement les cellules saines environnantes

Identify synthetic lethal combination in MM

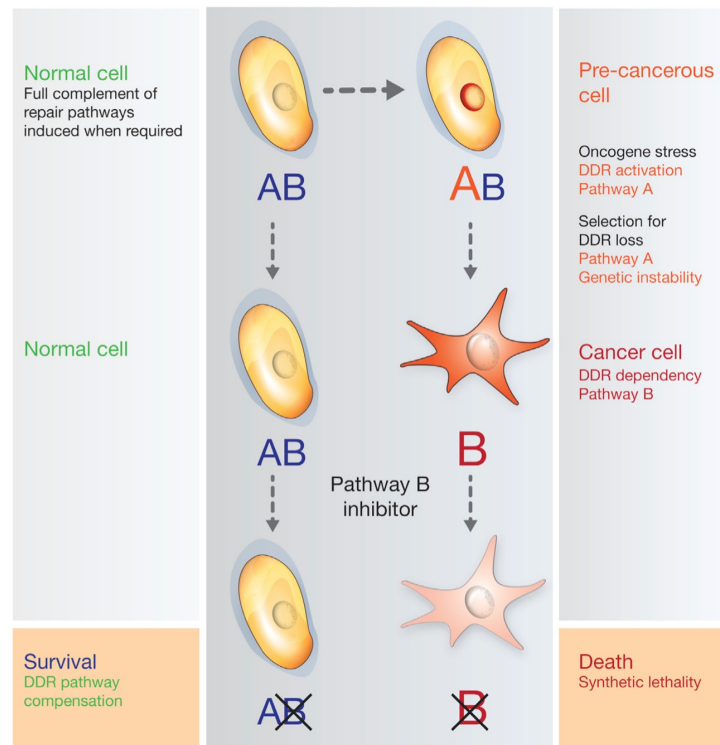


Figure 3. Loss of DDR Pathways during Tumorigenesis Results in DDR Dependencies that Can Be Targeted in the Resulting Cancer

With a full complement of repair pathways, normal cells can compensate for the loss of individual DDR pathways. However, loss of one or more DDR pathway(s) in response to oncogenic stress can leave cancer cells vulnerable to inhibition of remaining pathways and induce cancer-specific cell death through the process of synthetic lethality.

O'Connor et al. Mol Cell 2015

Réparation de l'ADN et DLBCL

DLBCL = lymphome B diffus à grandes cellules

Le plus fréquent des LNH

Hétérogénéité moléculaire et pronostique : sous-groupes ABC et GCB

Prise en charge thérapeutique :

Rituximab

Cyclophosphamide

Agent alkylant (ICLs)

H doxorubicine hydrochloride

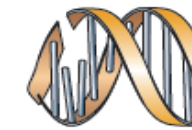
Agent intercalant (DSB)

Oncovin (vincristine)

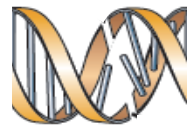
Alcaloïde poison du fuseau

Prednisone

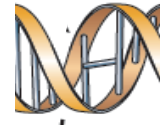
**Domage
Endogène
ou exogène
de l'ADN**



**Lésion
simple brin**



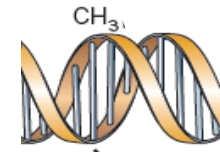
**Lésion
double brin**



Adduits



**Insertions,
délétions,
mismatch**



**Alkylation
des bases**

Détection de la lésion

Transduction

Action des effecteurs

Modulation du cycle, apoptose, modulation de la transcription, réparation de l'ADN :

**Base
Excision
Repair**

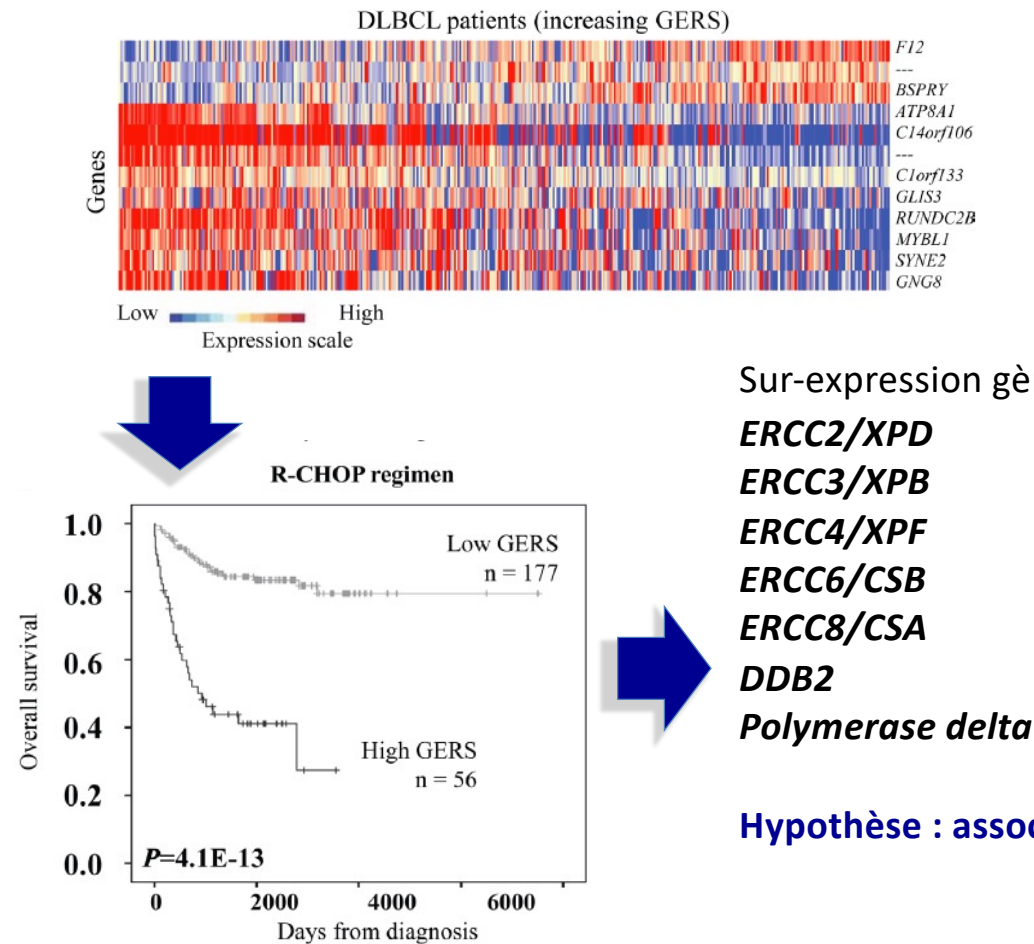
**Recombinaison
homologue -
NHEJ**

**Nucleotide
Excision
Repair**

**Mismatch
Repair**

**Direct
reversal**

Dérégulation des voies de réparation au cours du DLBCL



Sur-expression gènes du **NER** :

ERCC2/XPD

ERCC3/XPB

ERCC4/XPF

ERCC6/CSB

ERCC8/CSA

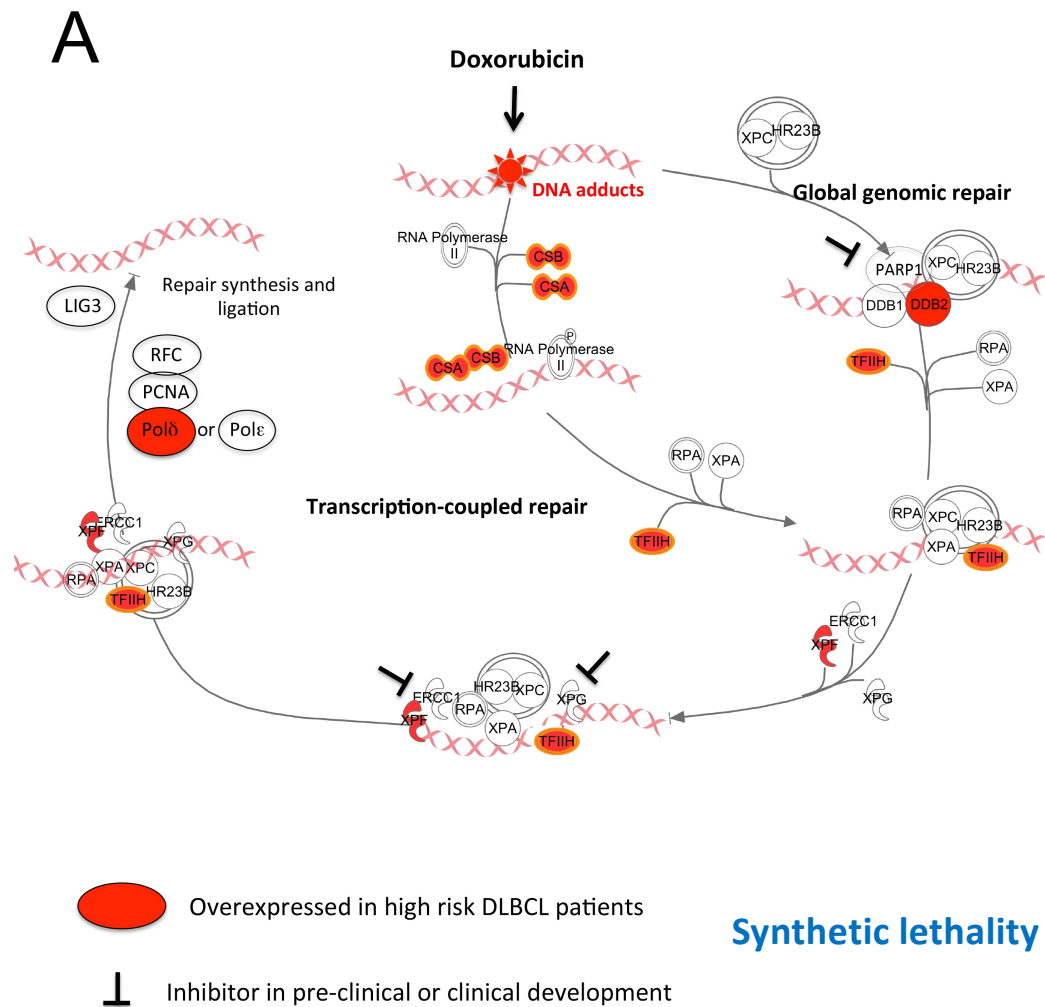
DDB2

Polymerase delta

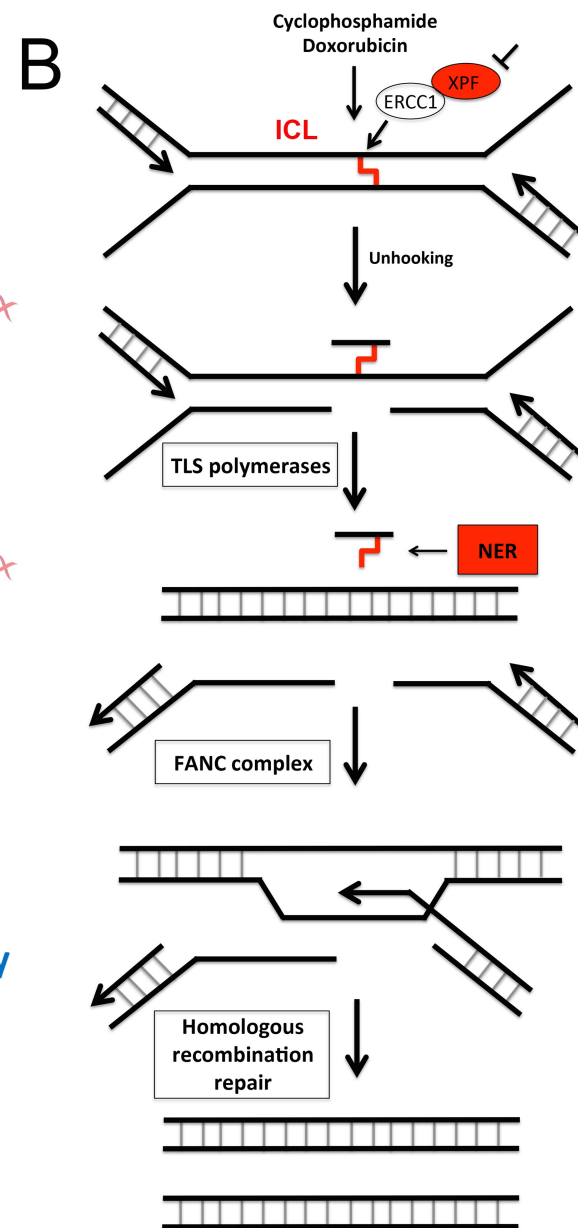
Hypothèse : association NER/chimiorésistance

Bret C et al. Oncotarget 2012

Bret C. Cell cycle 2013



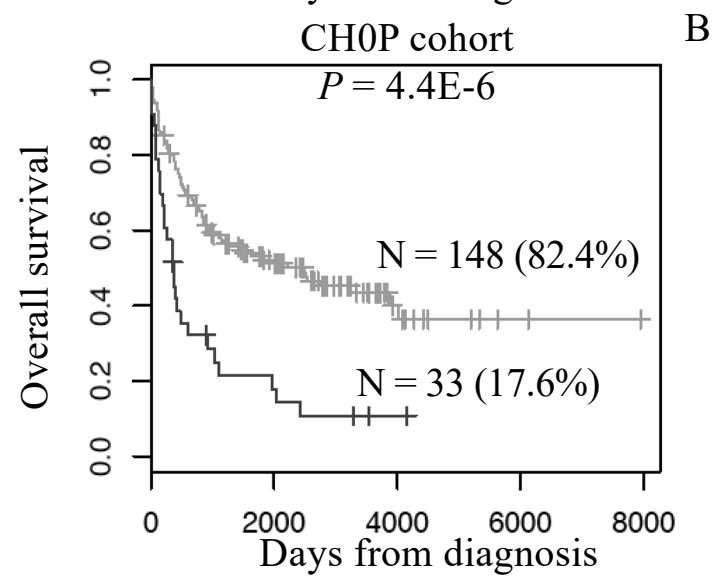
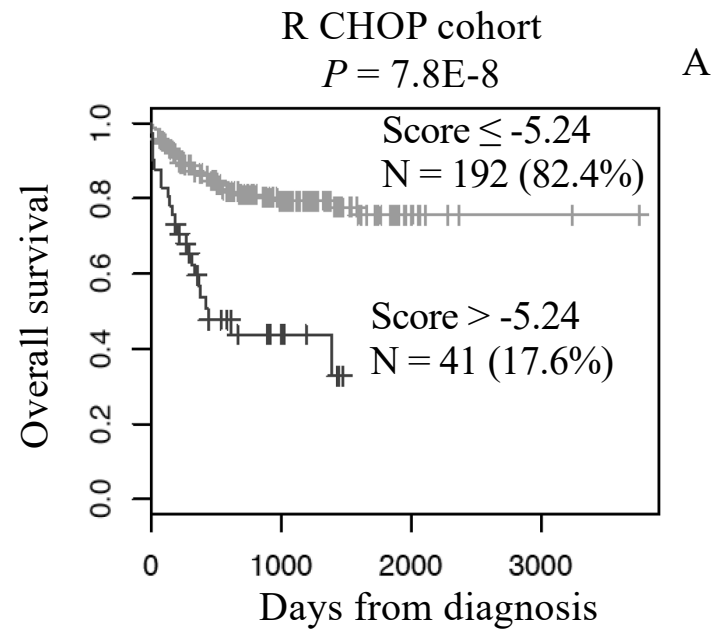
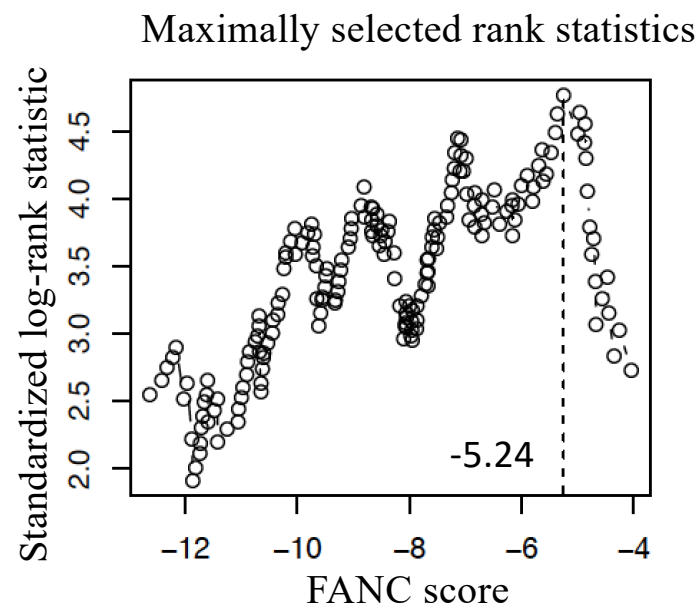
Synthetic lethality

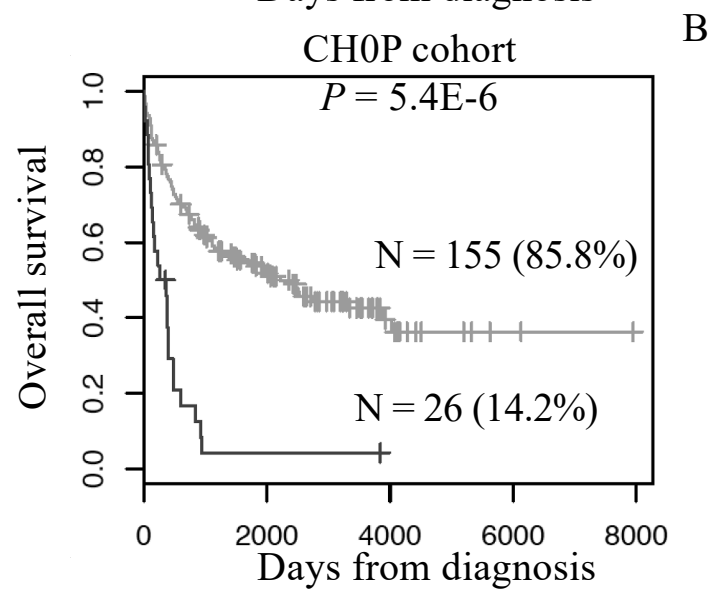
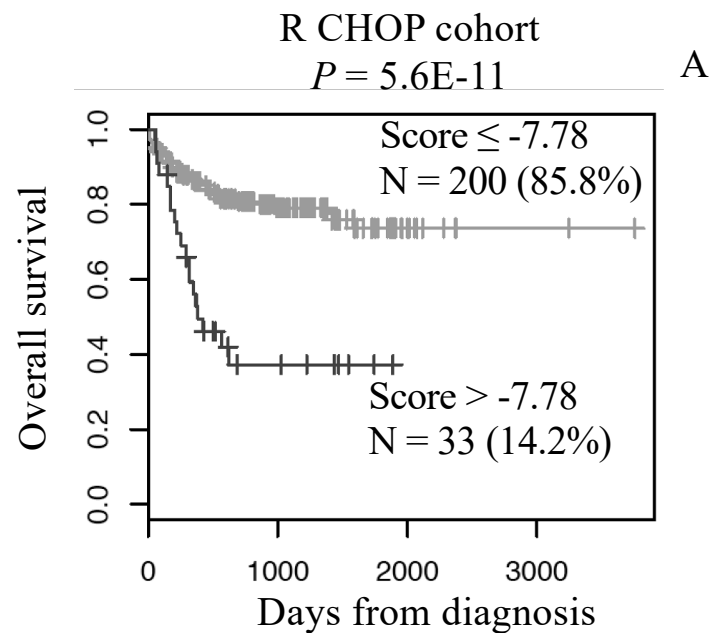
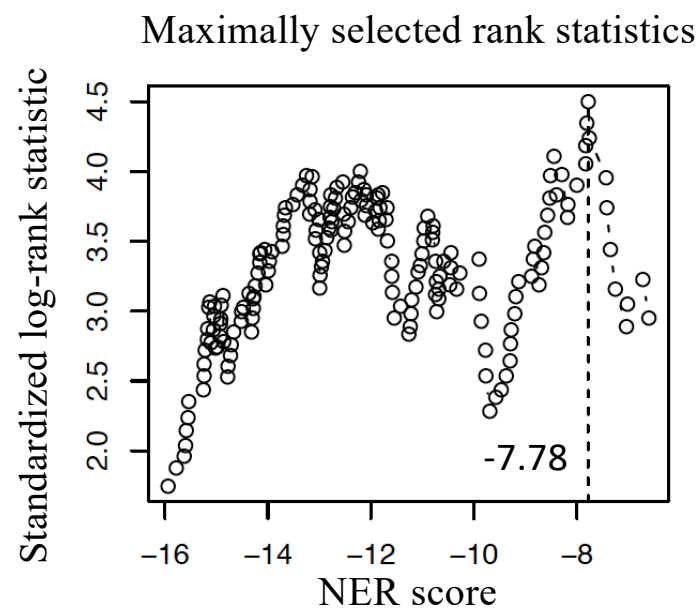


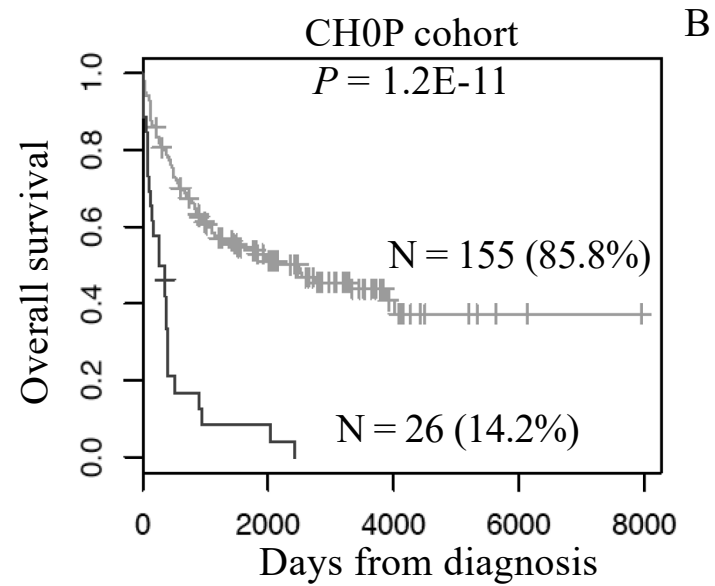
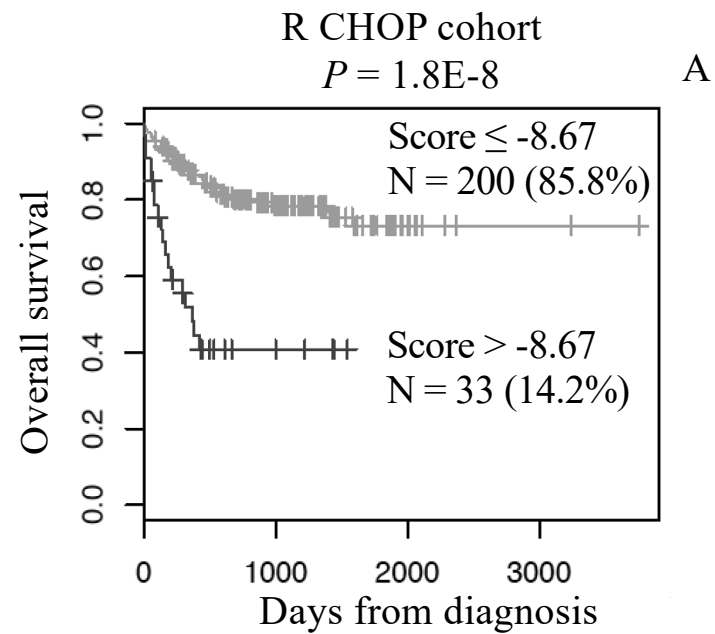
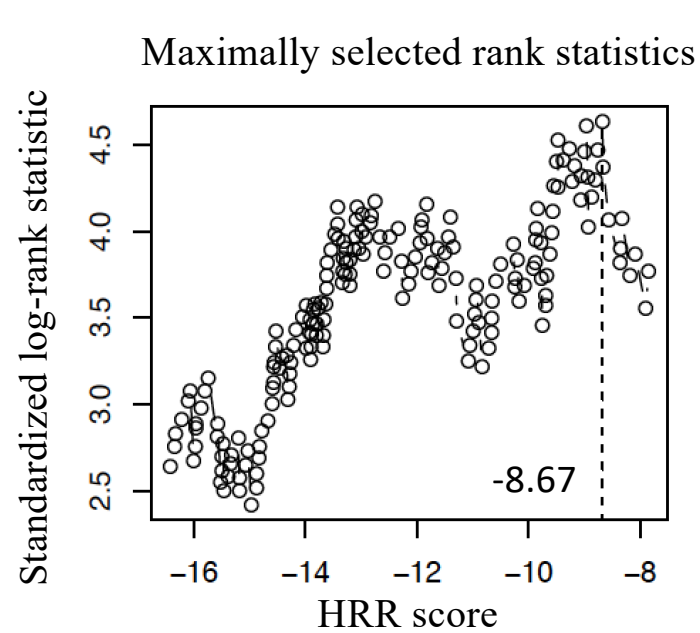
Bret C et al. Oncotarget 2012

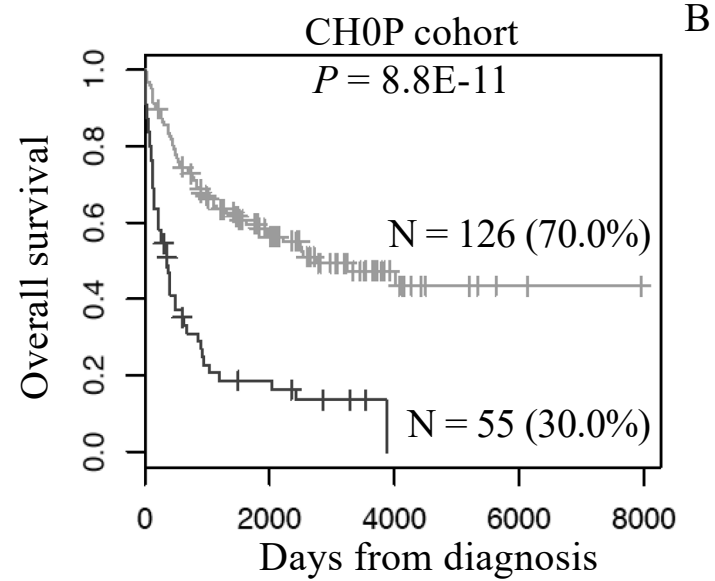
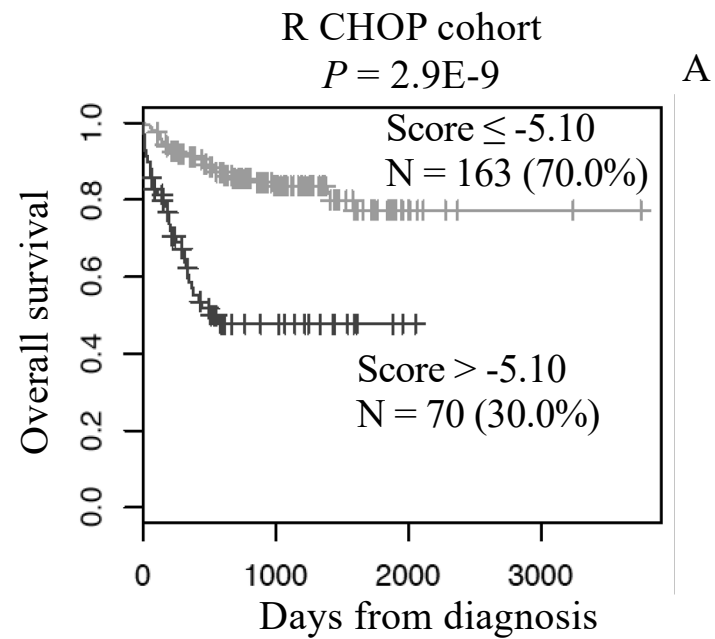
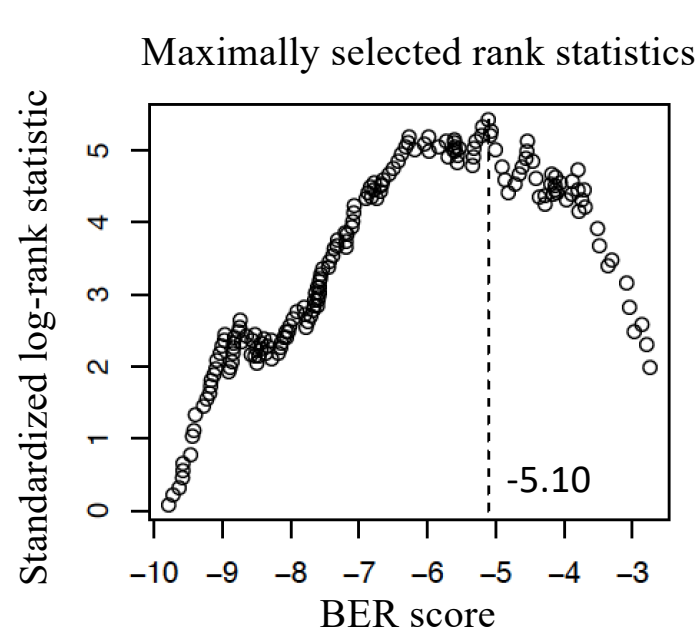
Bret C. Cell cycle 2013

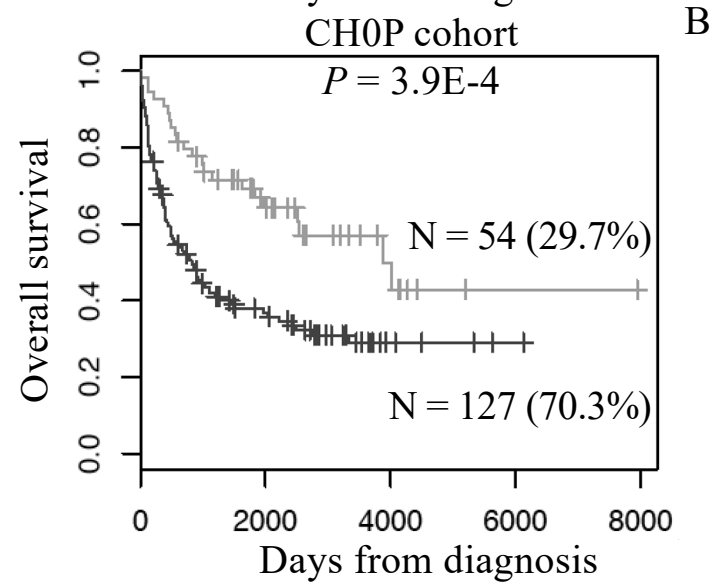
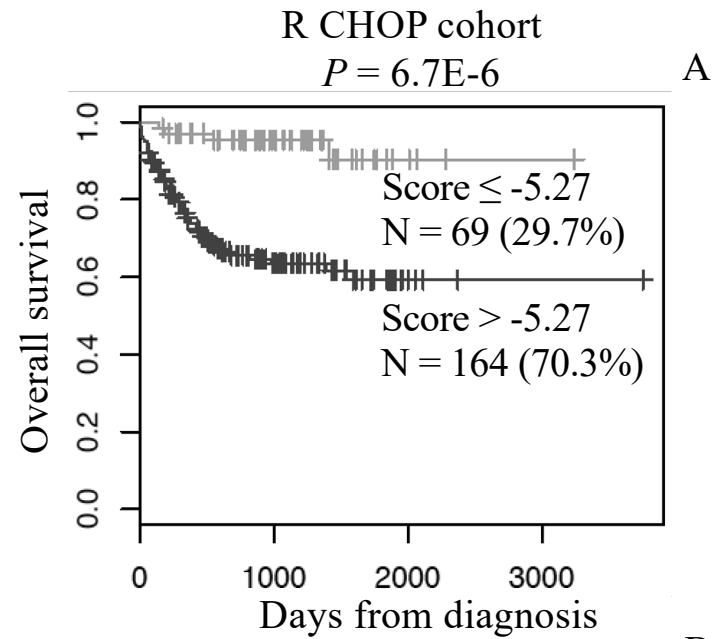
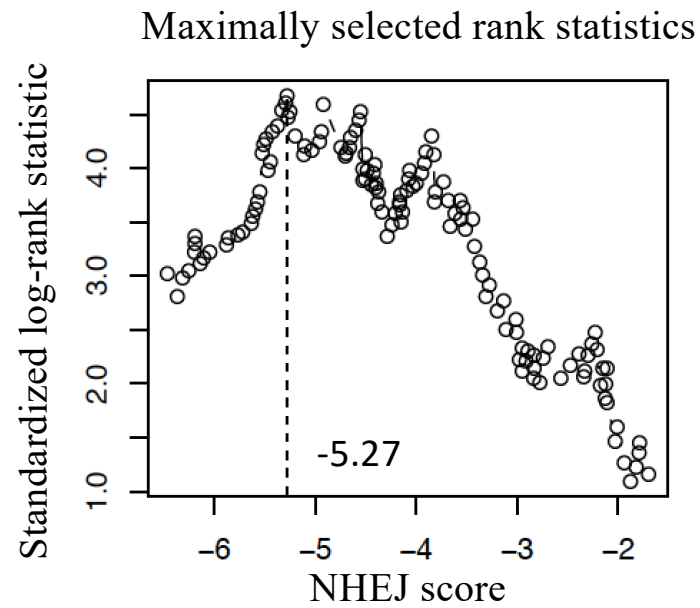
Bret C. BJH 2015

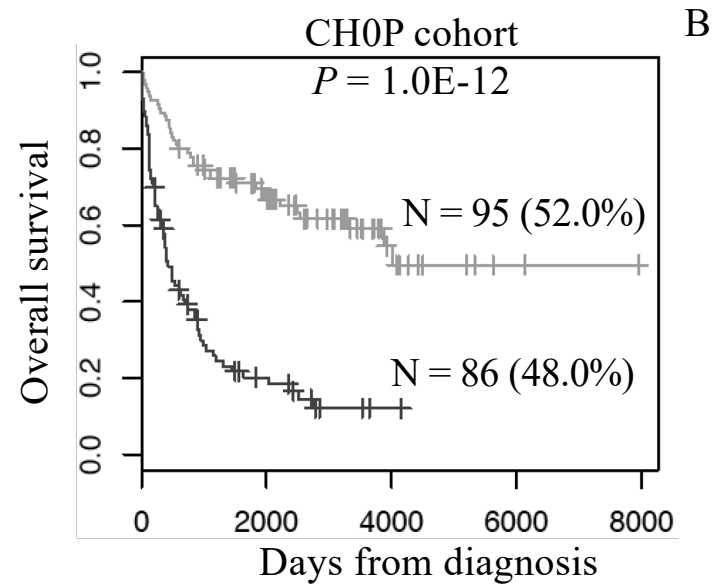
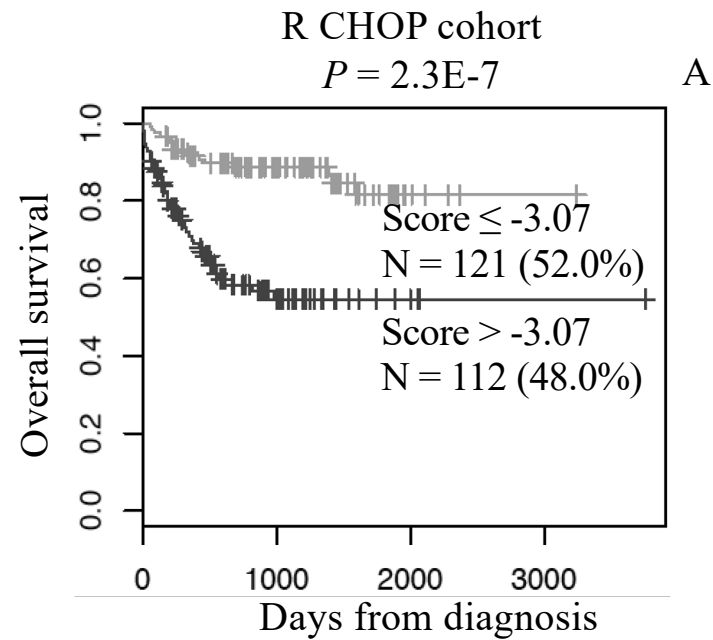
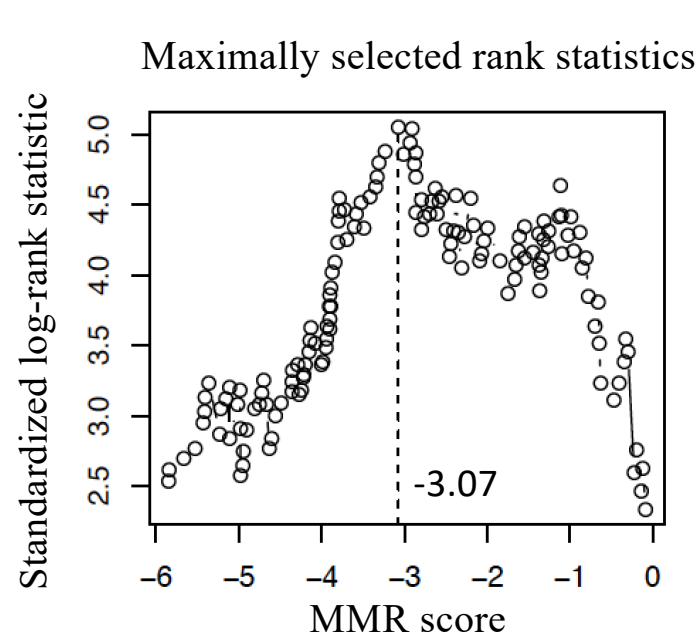






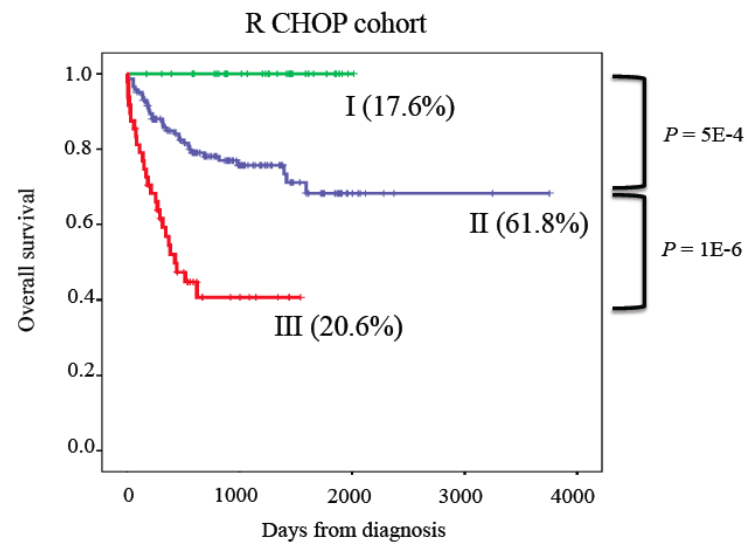






Score pronostique « DNA repair » du DLBCL

176 gènes considérés : 126 gènes associés
au pronostic (92 mauvais/34 bons)

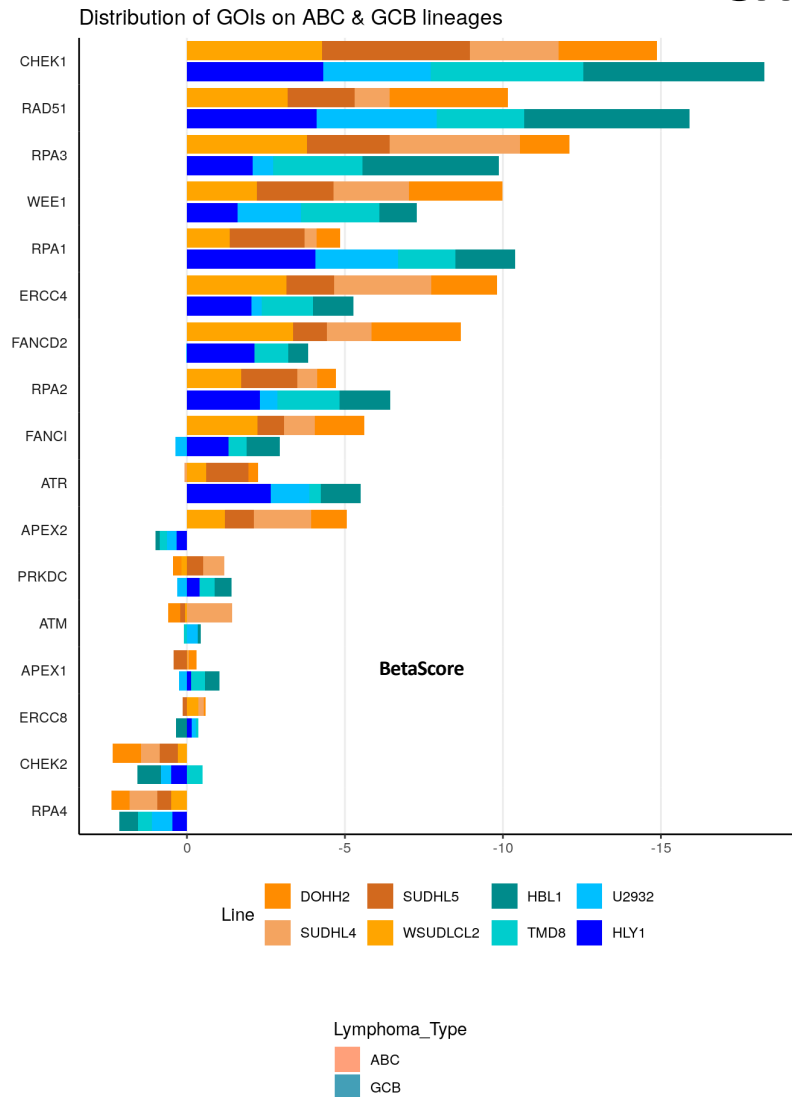


Scores d'orientation thérapeutique
Vers des approches de létalité
synthétique dans le DLBCL

Bret C et al. BJH 2015

Patent EP14306201.6 and EP2015/067174

Cribles CRISPR/Cas9 pour définir des approches de létalités synthétiques dans le DLBCL



DEPMAP Portal

Cribles CRISPR/Cas9 sur toutes les lignées de cancer

depmap portal Search for a gene, cell line, compound, lineage, or file

Welcome to the DepMap Portal

The goal of the Dependency Map (DepMap) portal is to empower the research community to make discoveries related to cancer vulnerabilities by providing open access to key cancer dependencies, analytical, and visualization tools.

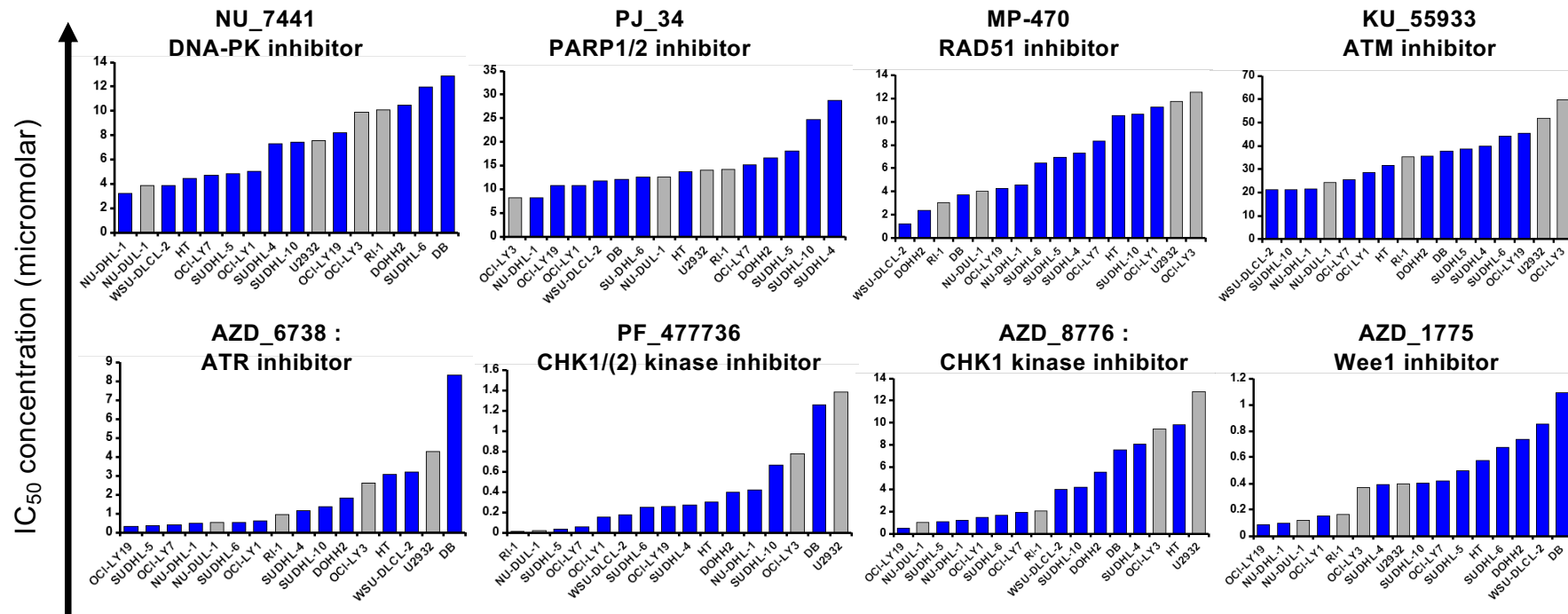
[Learn more about DepMap](#) [Learn more about PedDep](#)

DepMap is part of a public-private partnership called the DepMap Consortium. [Learn more about becoming a member of the DepMap Consortium.](#)

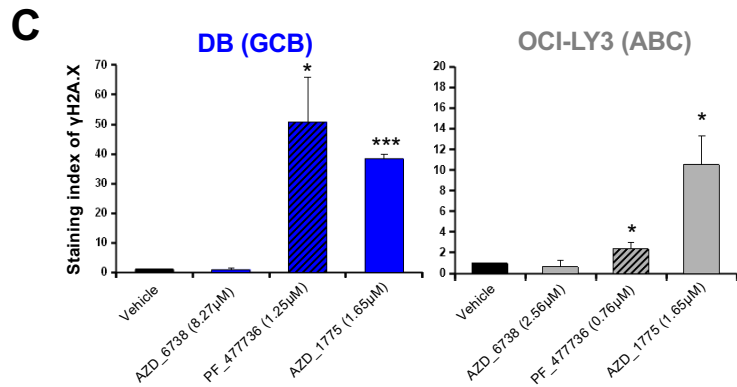
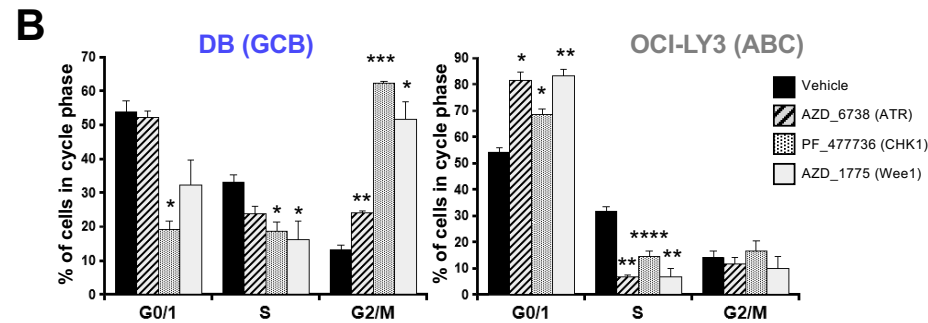
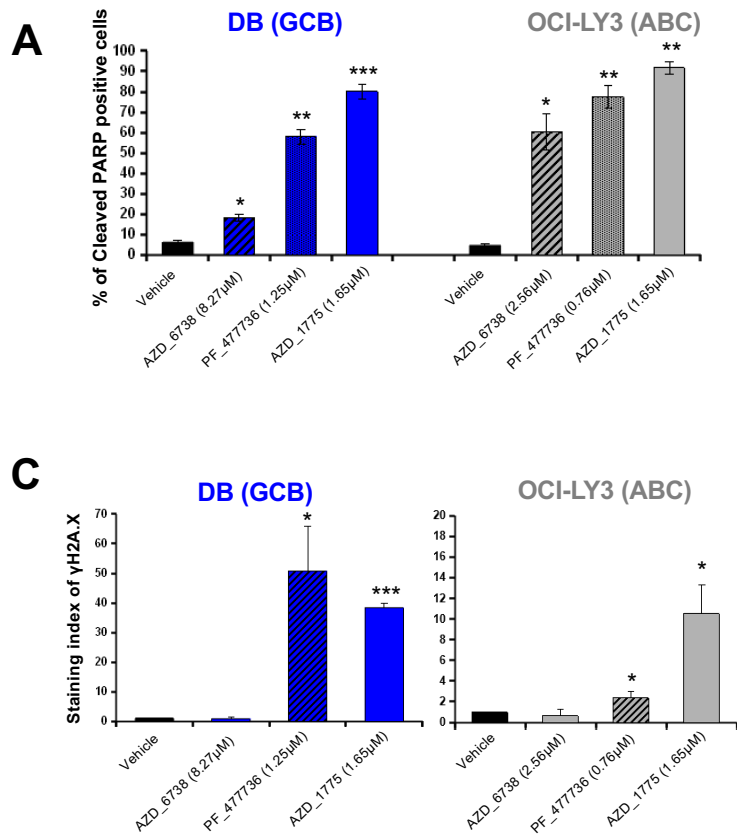
Type in a gene, compound, cell line, lineage to access its information page

Ovejero S et al. Hematological Oncology 2025

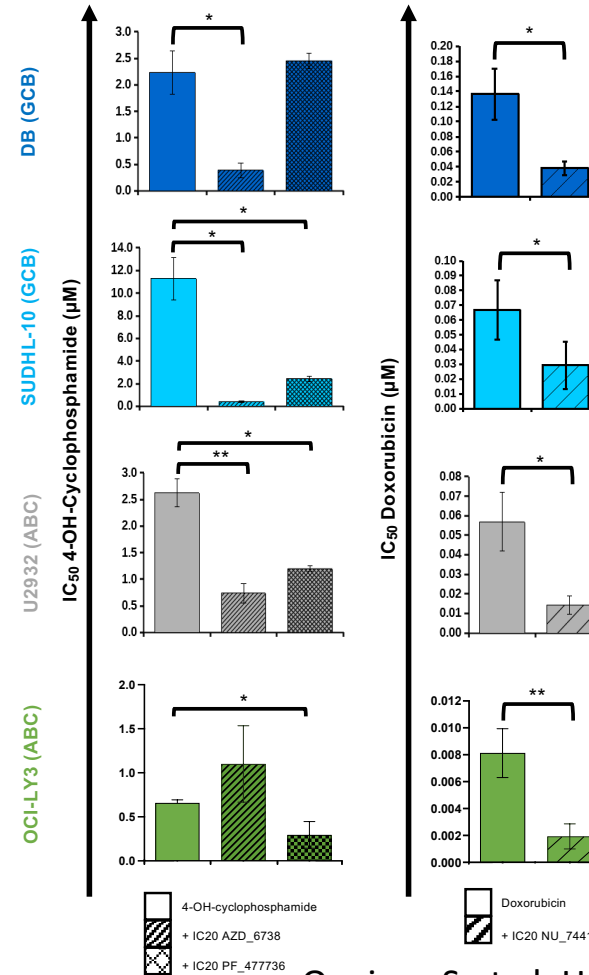
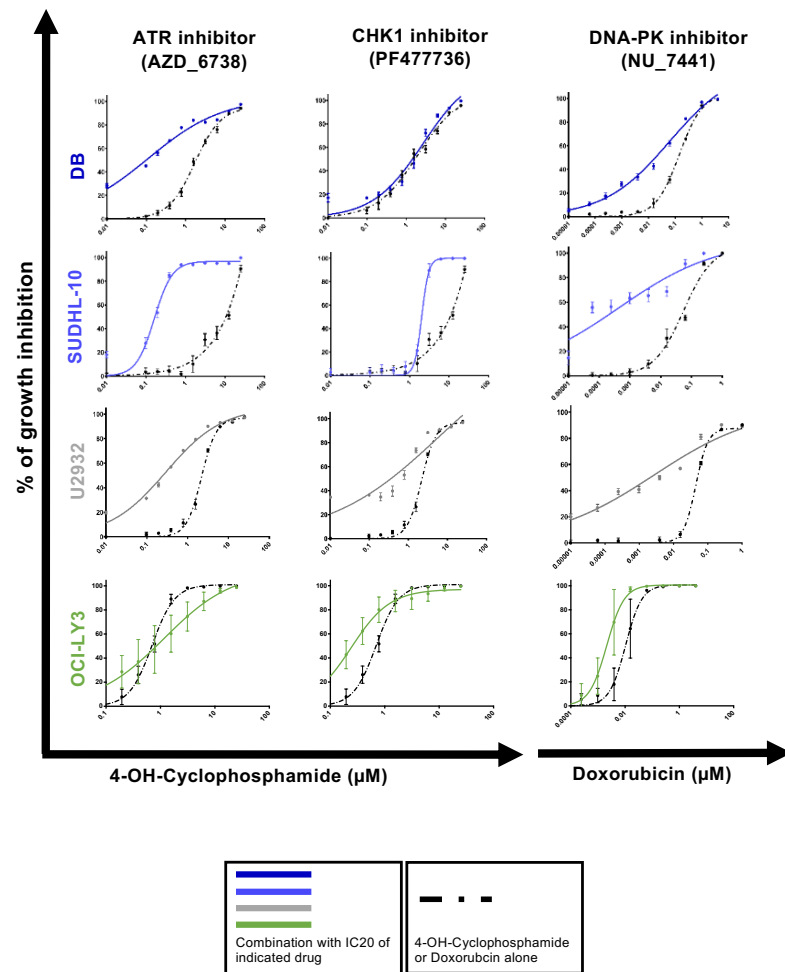
Cribles CRISPR/Cas9 pour définir des approches de létalités synthétiques dans le DLBCL



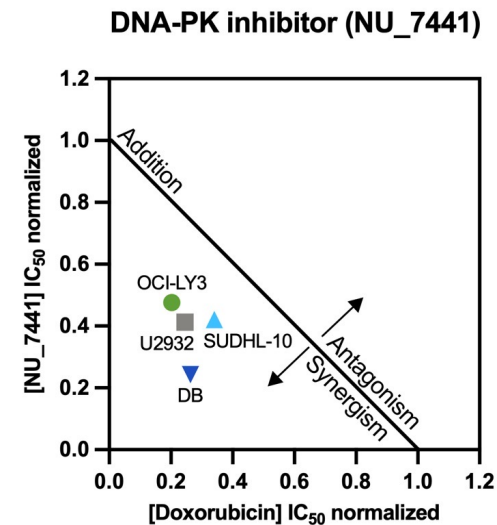
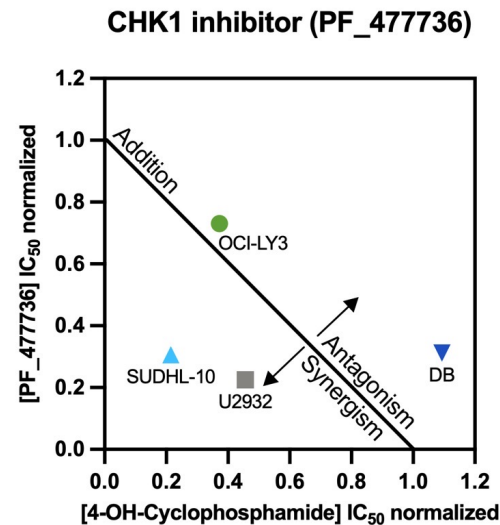
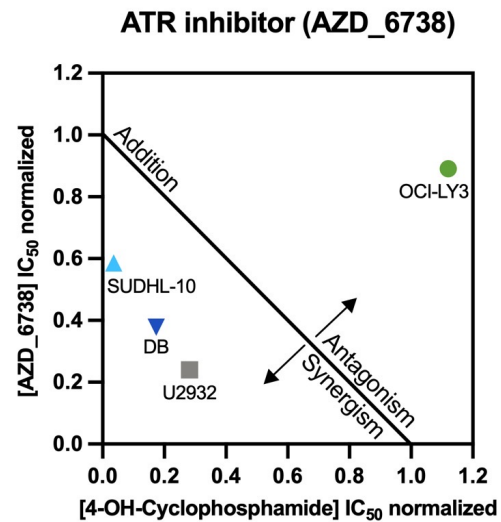
Cribles CRISPR/Cas9 pour définir des approches de létalités synthétiques dans le DLBCL

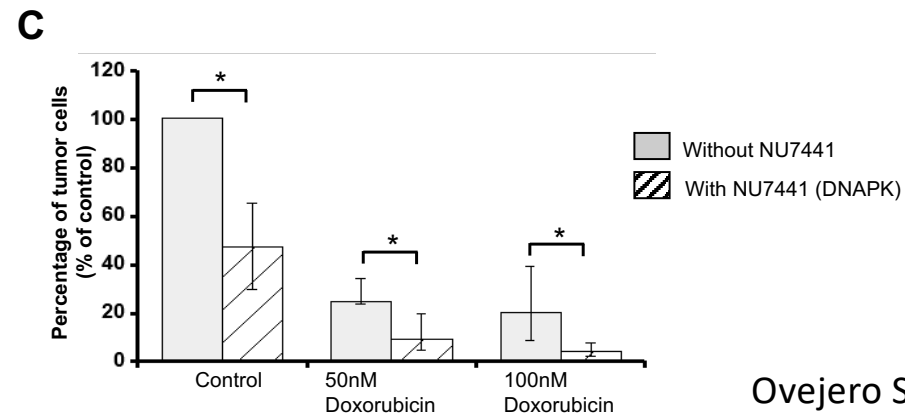
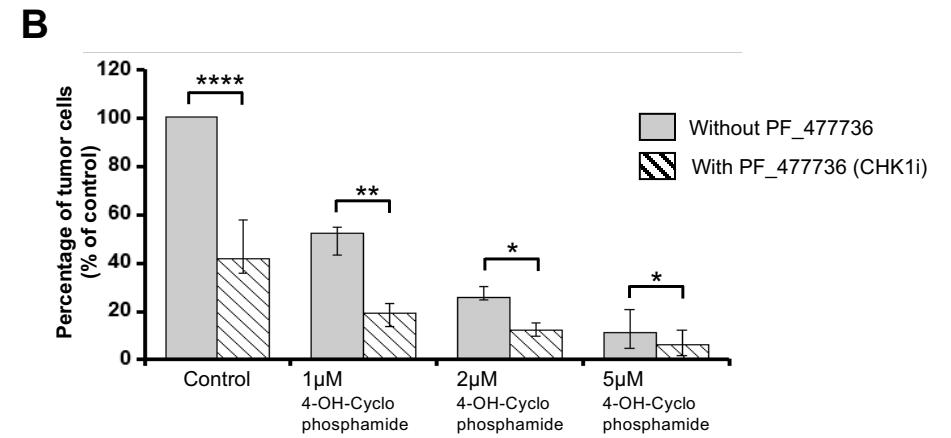
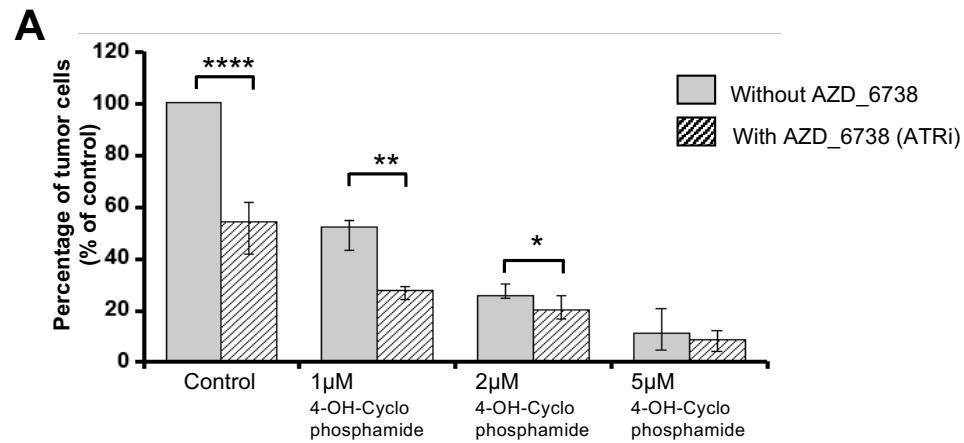


Cribles CRISPR/Cas9 pour définir des approches de létalités synthétiques dans le DLBCL



Cribles CRISPR/Cas9 pour définir des approches de létalités synthétiques dans le DLBCL



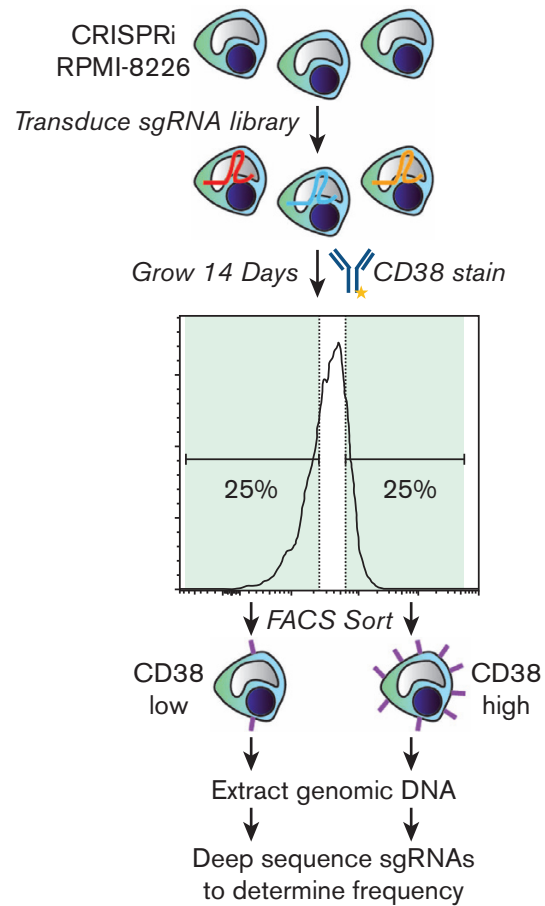


Functional multiomics reveals genetic and pharmacologic regulation of surface CD38 in multiple myeloma

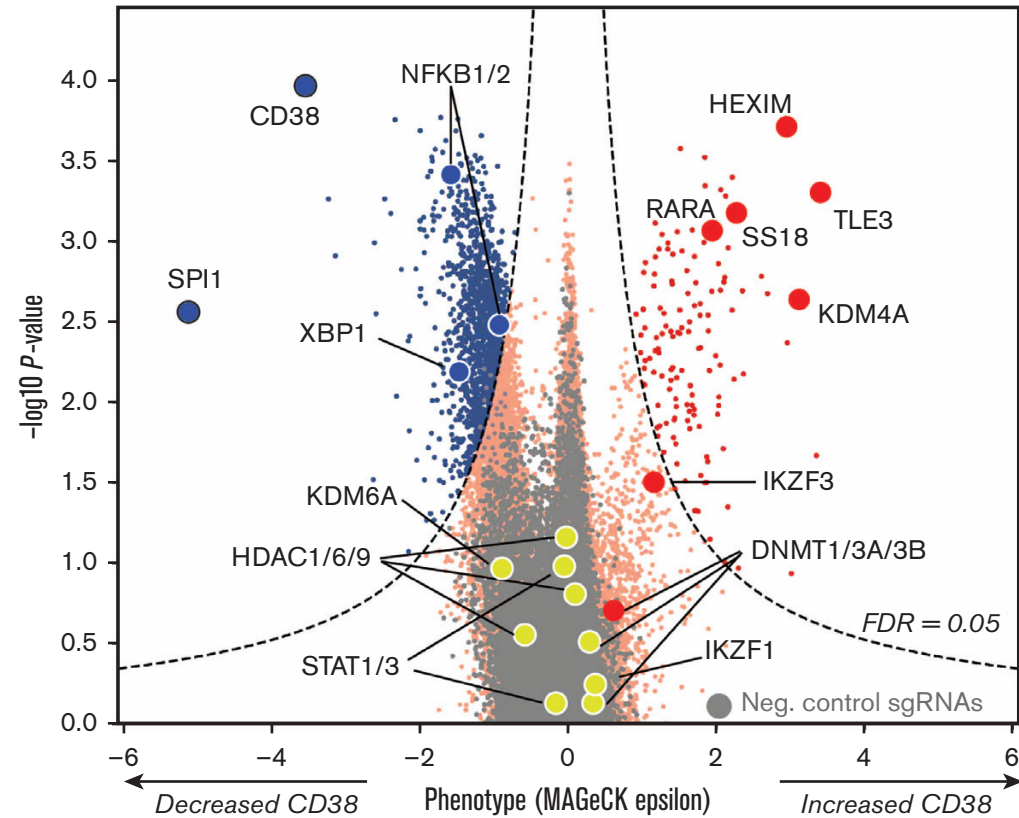
Priya Choudhry,¹ Corynn Kasap,^{2,*} Bonell Patiño-Escobar,^{1,*} Olivia Gugliemini,¹ Huimin Geng,¹ Vishesh Sarin,¹ Amrik Kang,^{1,†} Audrey Kishishita,^{1,†} Sham Rampersaud,^{1,†} Letitia Sarah,³ Yu-Hsiu T. Lin,¹ Neha Paranjape,¹ Poornima Ramkumar,⁴ Jonathan C. Patton,⁵ Makeba Marcoulis,¹ Donghui Wang,⁶ Paul Phojanakong,⁶ Veronica Steri,⁶ Byron Hann,⁶ Benjamin G. Barwick,⁵ Martin Kampmann,^{4,7,8} and Arun P. Wiita^{1,6,8,9}

Résistance aux anticorps anti-CD38

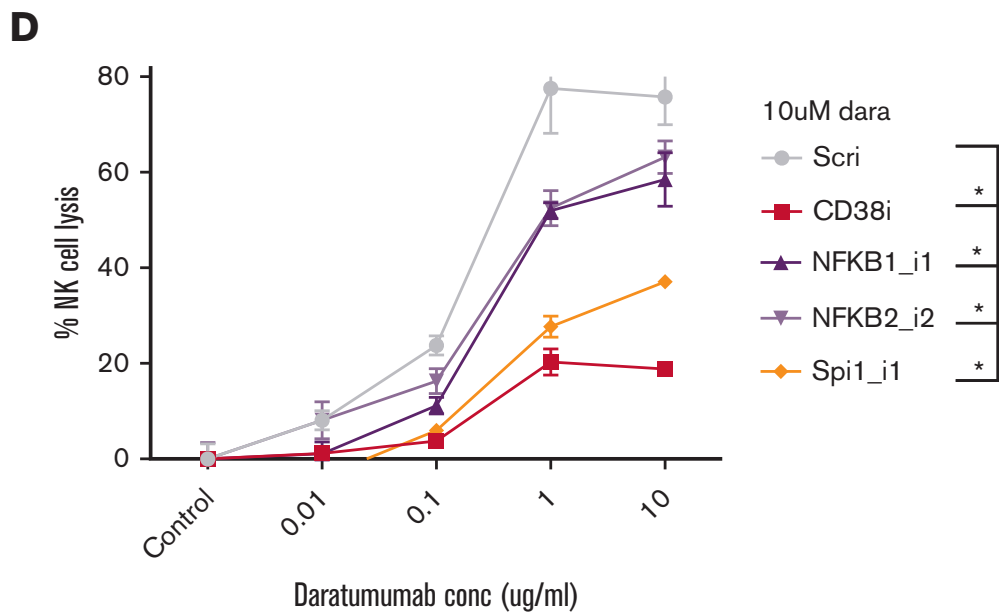
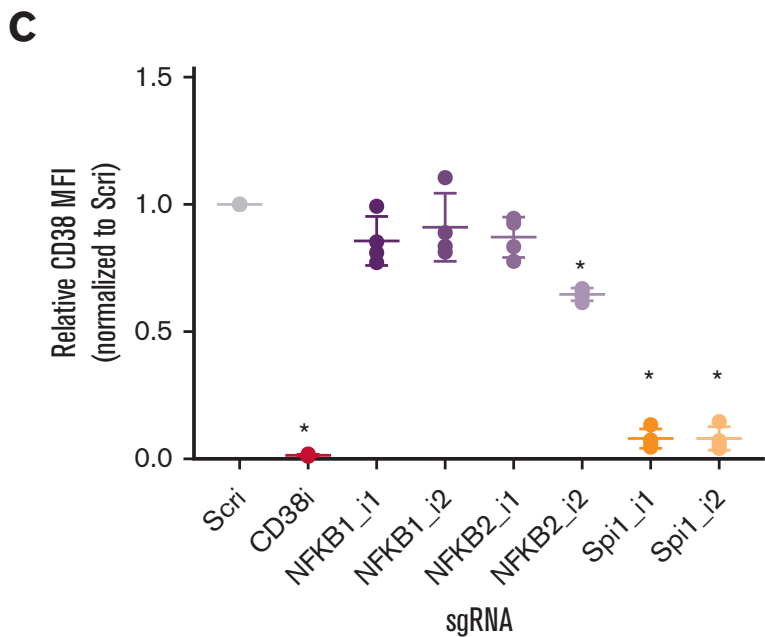
A



B



Résistance aux anticorps anti-CD38



Résistance aux anticorps anti-CD38

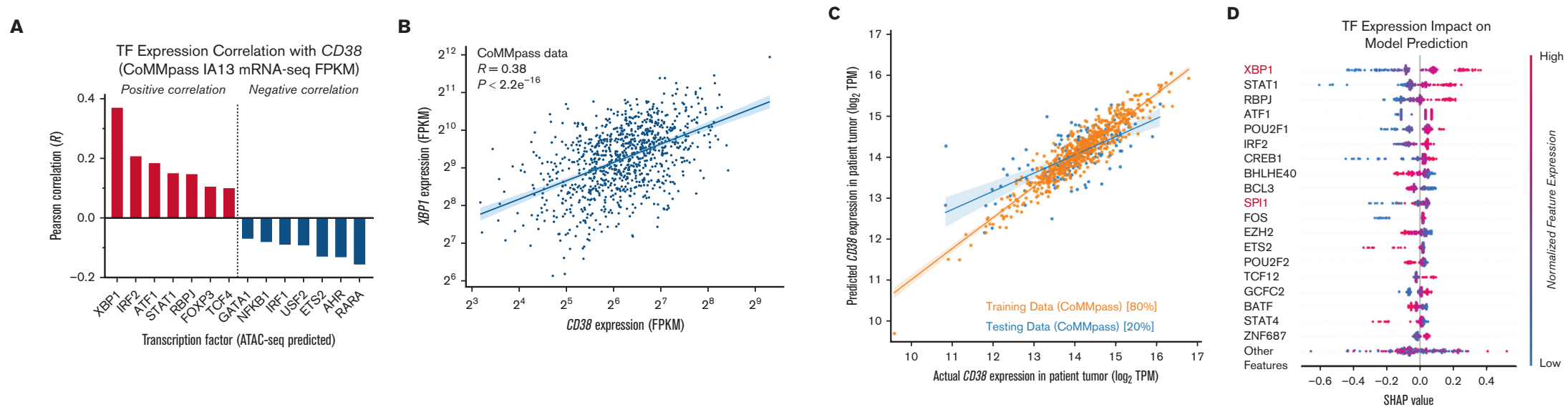


Figure 3. Patient-centered epigenetic analysis and machine learning predicts the most potent transcriptional regulators of *CD38*. (A) A total of 46 transcription factors predicted to bind to the *CD38* locus were derived from motif analysis of published ATAC-seq data (see supplemental Figure 3). Gene expression of each transcription factor (TF) was correlated with *CD38* expression in the Multiple Myeloma Research Foundation (MMRF) CoMMpass database (release IA13), with RNA-seq data from *CD138*⁺ enriched tumor cells at diagnosis (n = 664 patients). Top predicted positive and negative regulators are shown based on Pearson correlation (*R*). (B) CoMMpass RNA-seq data illustrate strong positive correlation between *XBP1* and *CD38* expression. (C) XGBoost machine learning model was used to extract features of TF gene expression that best model *CD38* expression in CoMMpass tumors (shown in log₂ TPM [transcripts per million]); 80% of data were used as test set, with 20% left out as a training set. Coefficient of variation (*R*²) for predictive model = 0.49 after five-fold cross-validation. (D) Shapley additive explanations (SHAP) analysis indicates transcription factors whose expression most strongly affects *CD38* expression levels in CoMMpass tumors. FPKM, fragments per kilobase million; TPM, transcripts per million.

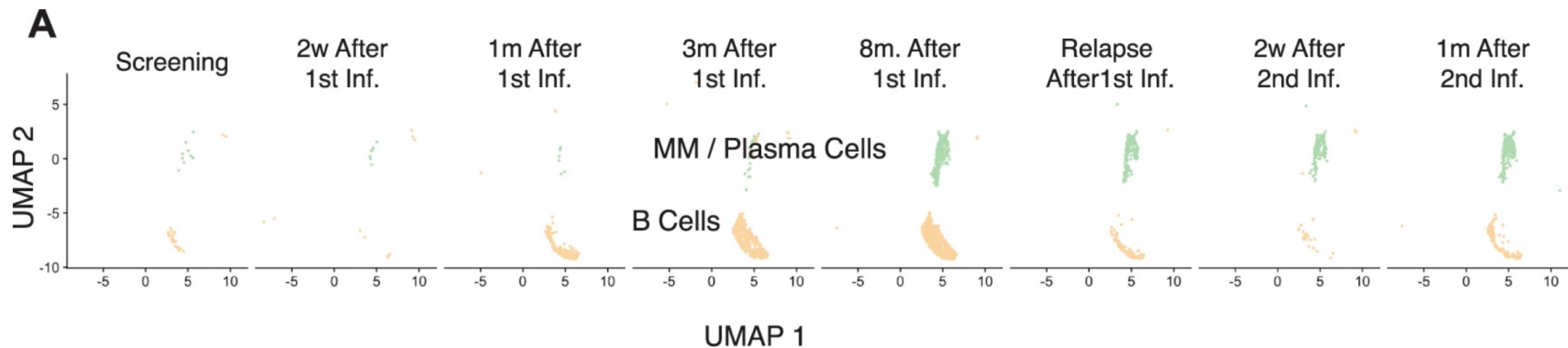
Resistance mechanisms = Immune based therapies

Article | [Open access](#) | Published: 08 February 2021

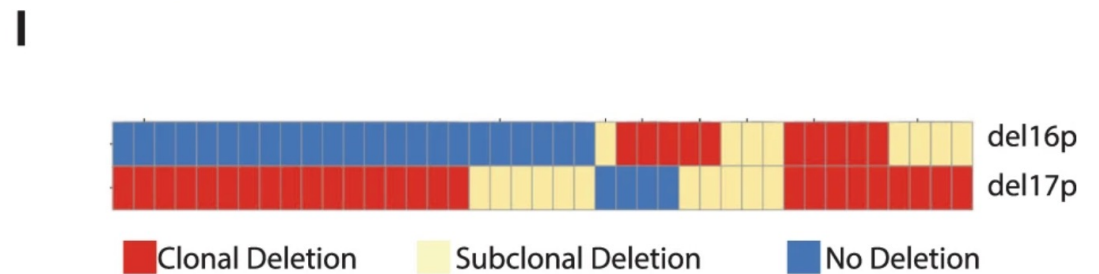
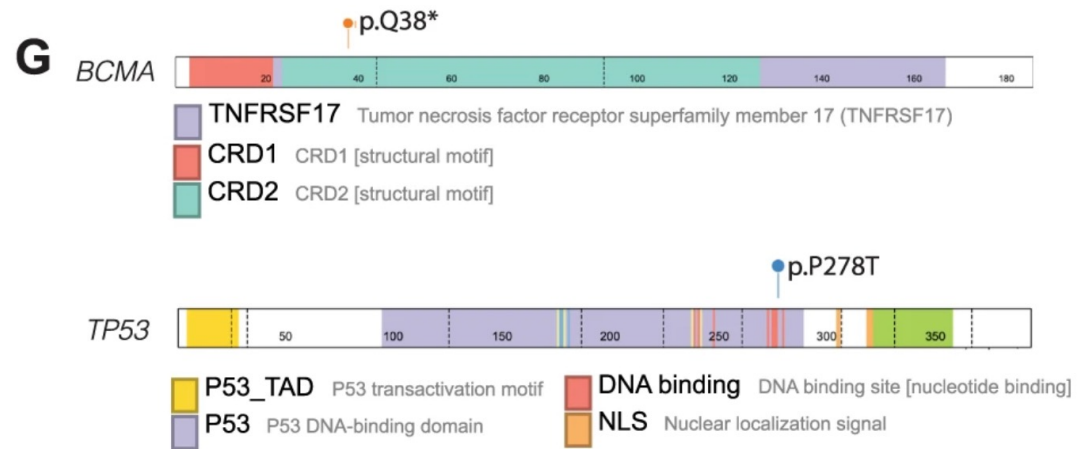
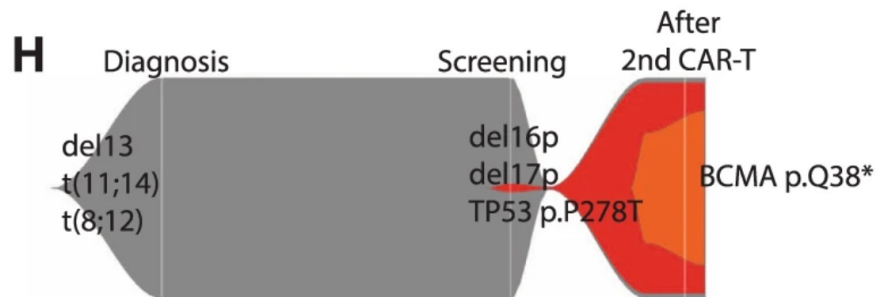
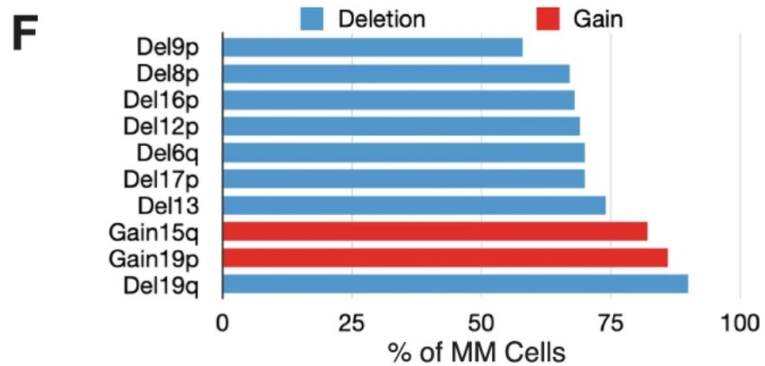
Biallelic loss of BCMA as a resistance mechanism to CAR T cell therapy in a patient with multiple myeloma

[Mehmet Kemal Samur](#) , [Mariateresa Fulciniti](#), [Anil Aktas Samur](#), [Abdul Hamid Bazarbachi](#), [Yu-Tzu Tai](#),
[Rao Prabhala](#), [Alejandro Alonso](#), [Adam S. Sperling](#), [Timothy Campbell](#), [Fabio Petrocchi](#), [Kristen Hege](#),
[Shari Kaiser](#), [Hervé Avet Loiseau](#), [Kenneth C. Anderson](#) & [Nikhil C. Munshi](#) 

[Nature Communications](#) **12**, Article number: 868 (2021) | [Cite this article](#)



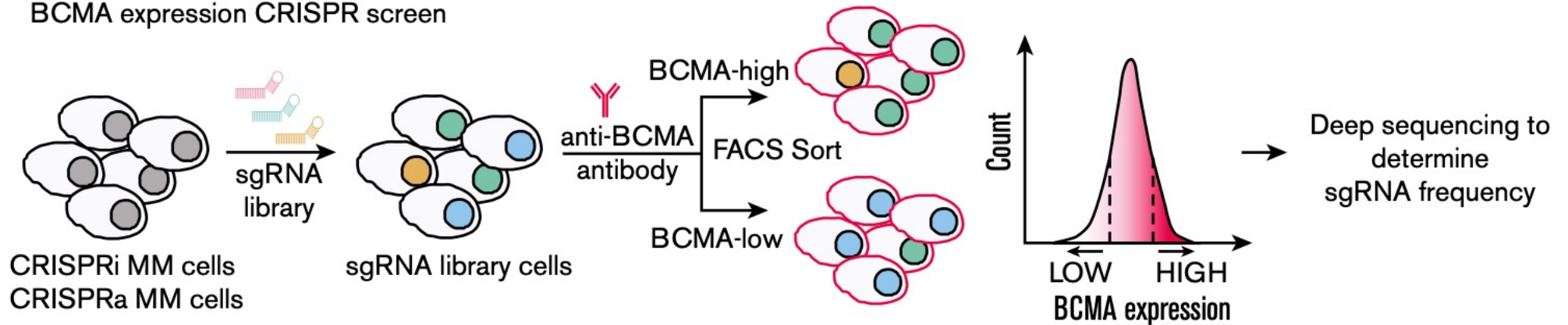
Biallelic loss of BCMA in MM patients



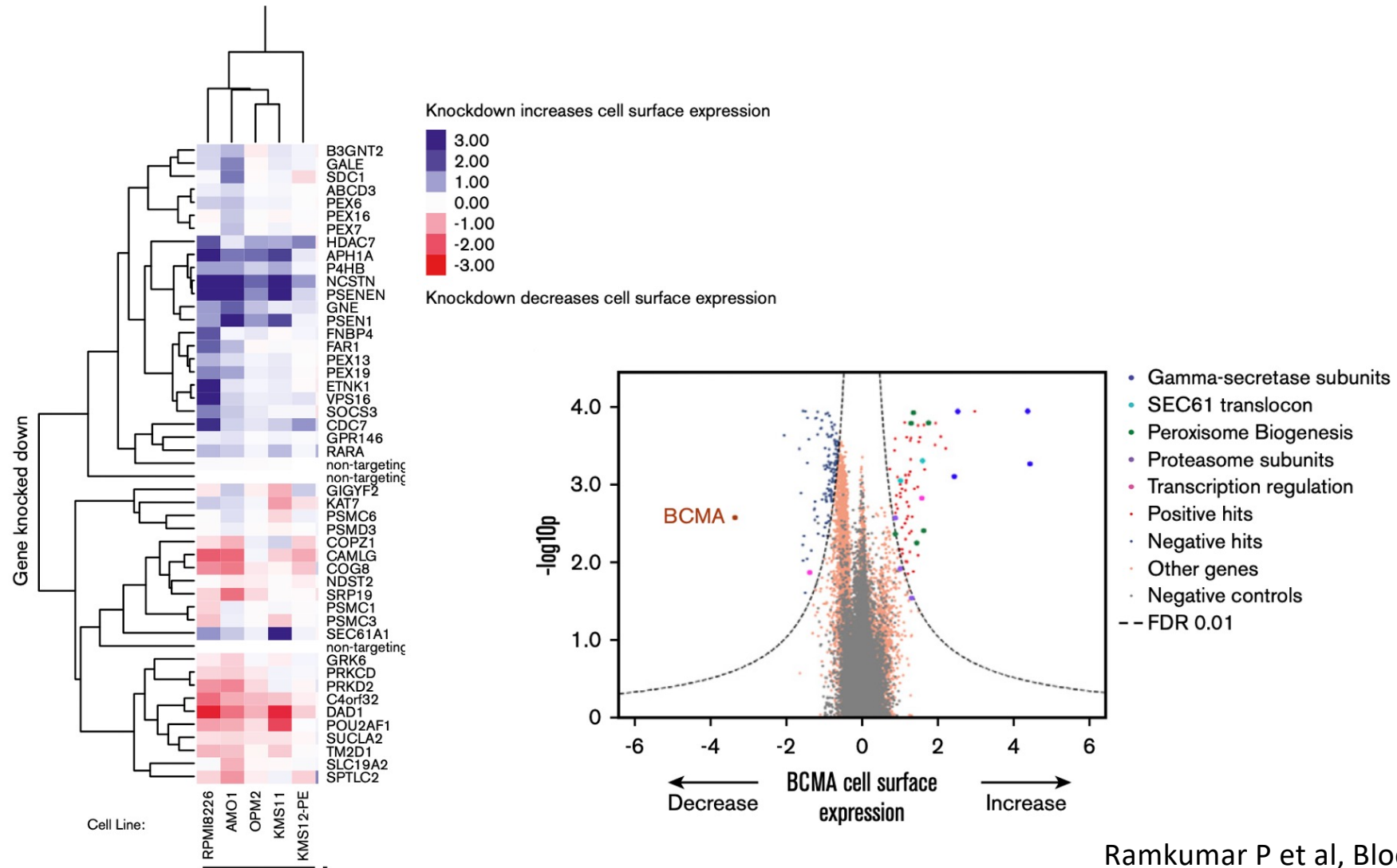
CRISPR/Cas9 => résistance aux immunothérapies

A

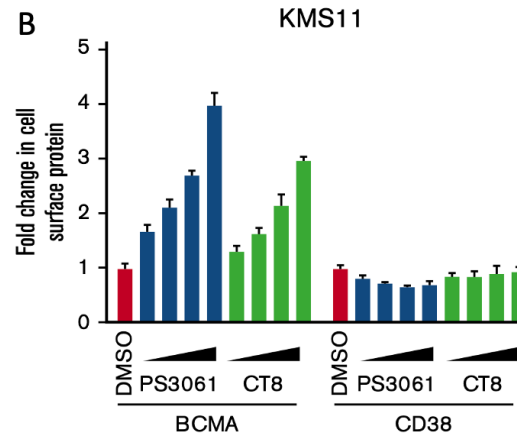
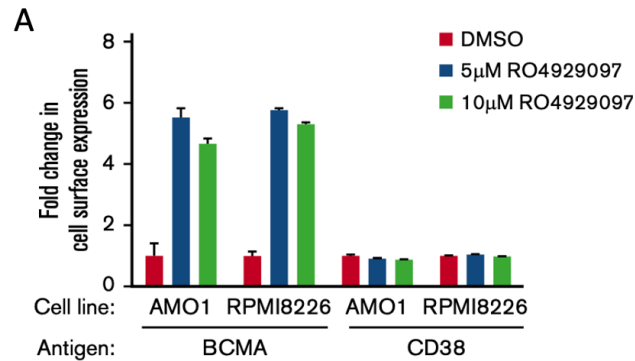
BCMA expression CRISPR screen



CRISPR/Cas9 => résistance aux immunothérapies



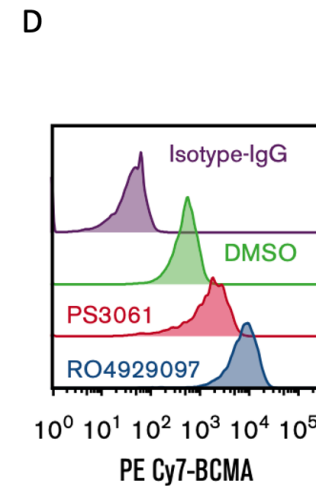
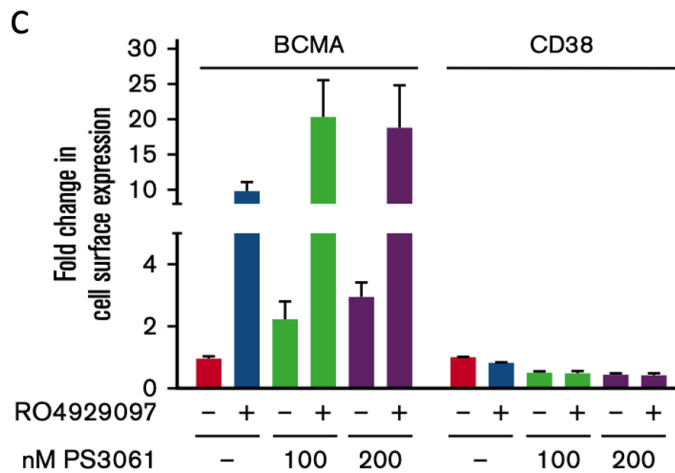
CRISPR/Cas9 => résistance aux immunothérapies



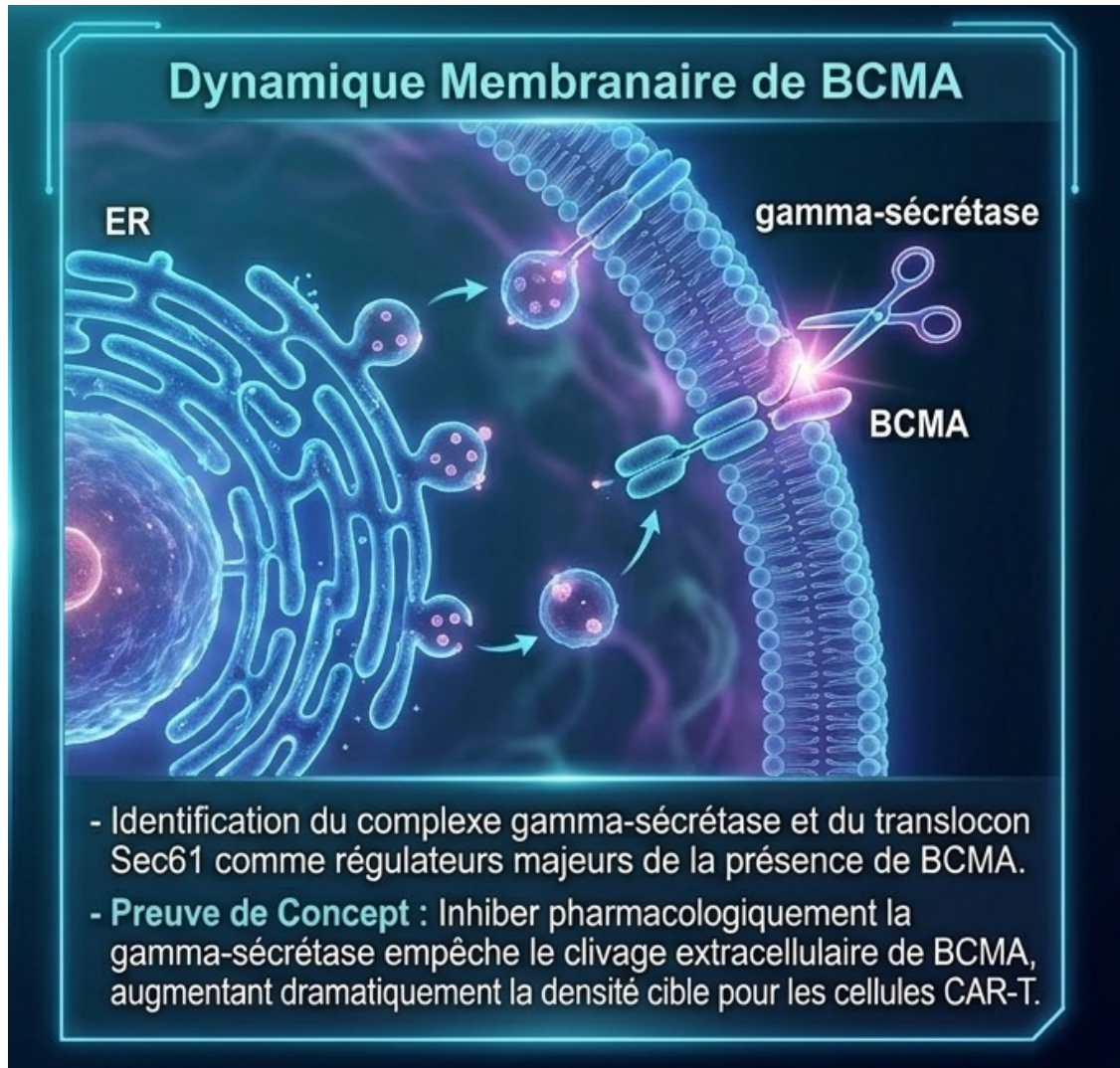
RO4929097 : Gamma secretase inhibitor

PS3061 & CT8 : Sec61 inhibitors

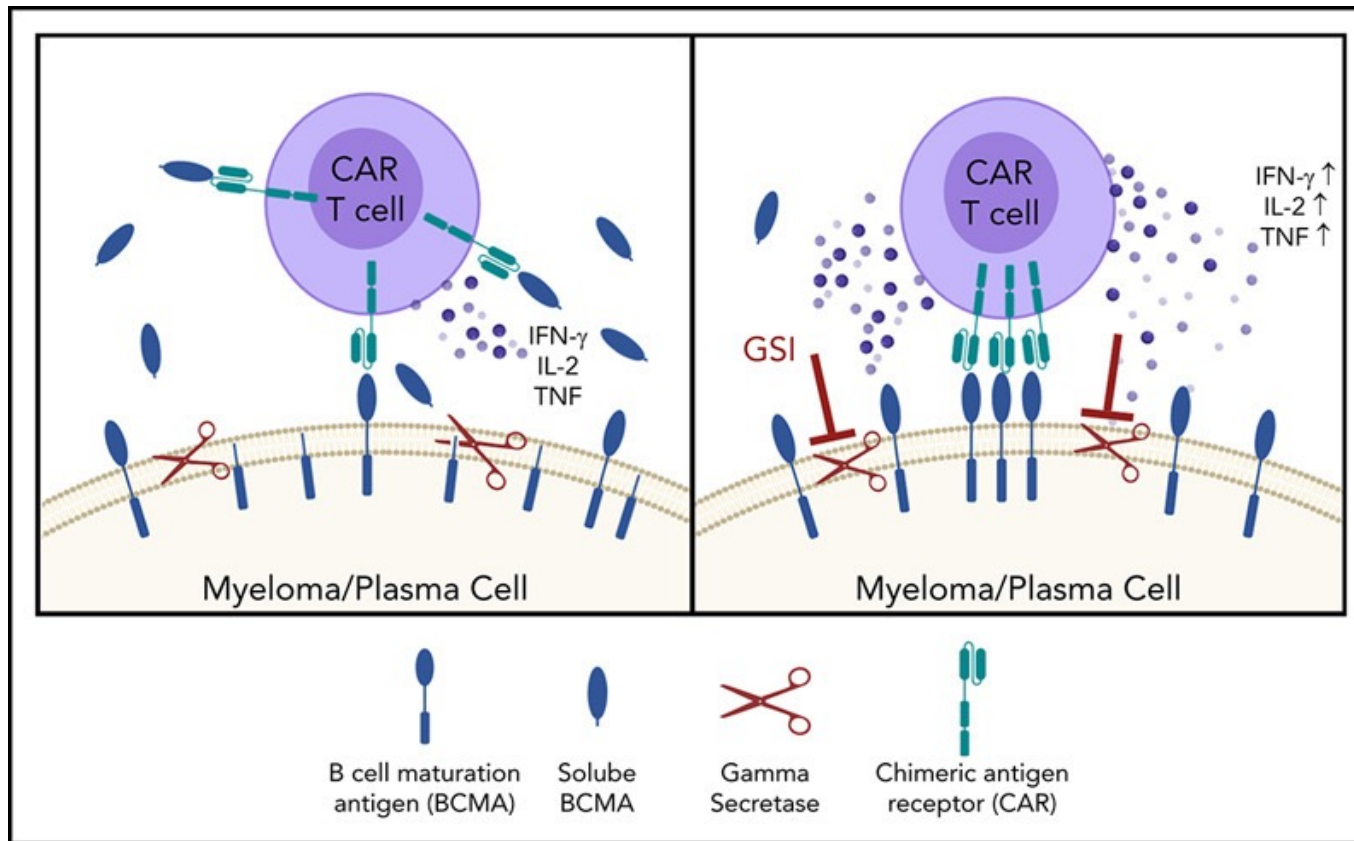
Information to understand the figure: Most integral plasma membrane proteins are inserted into membranes via the Sec61 translocon. It has been shown that inhibition of Sec61 affects correct localization of a subset of membrane proteins.



CRISPR/Cas9 => résistance aux immunothérapies



Soluble BCMA



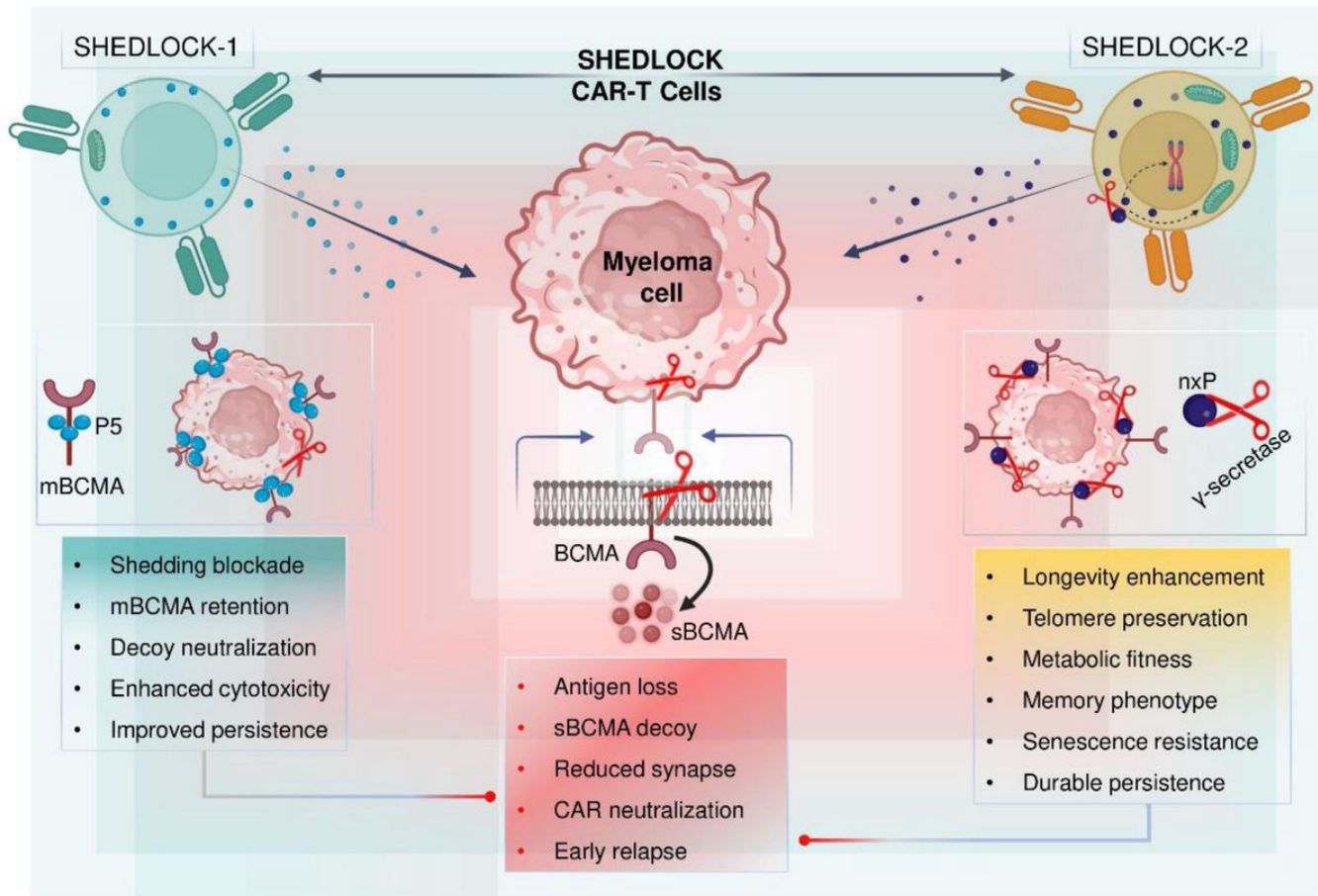
Clinical trials with Gamma secretase inhibitors

Pont MJ et al. Blood 2019

Cowan AJ et al. Lancet Oncology 2023

Overcome resistance

Peptide qui bloque le cleavage de BCMA par les gamma-sécrétases.



Peptide qui engage le site catalytique des gamma-sécrétases.

Augmente la longévité des CAR-T.