HAL
open science

Rôle des anomalies de TET2 dans la transformation tumorale lymphoïde et myéloïde

Lucile Couronné

To cite this version:

Lucile Couronné. Rôle des anomalies de TET2 dans la transformation tumorale lymphoïde et myéloïde. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T059 . tel-00766575

HAL Id: tel-00766575

https://theses.hal.science/tel-00766575

Submitted on 18 Dec 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

2012 N°…..

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Ecole doctorale : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Champ disciplinaire : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Lucile COURONNÉ

Le 15 octobre 2012

Rôle des anomalies de *TET2* dans la transformation tumorale lymphoïde et myéloïde

Directeur de thèse : Dr Olivier BERNARD

JURY

Président : Pr Eric SOLARY

Rapporteur : Pr Karen LEROY

Rapporteur : Dr Jean-Pierre DE VILLARTAY

Examinateur : Pr Philippe GAULARD

Examinateur : Dr Christian BASTARD

Directeur de thèse : Dr Olivier BERNARD

Mes sincères remerciements

A Olivier, mon directeur de thèse, qui m'a guidée tout au long de ces trois années passées ensemble, m'a appris la rigueur du raisonnement scientifique, m'a aidée à concrétiser mon projet professionnel et peut être le plus important, m'a donné envie de continuer la recherche, ici ou ailleurs …

Aux membres de mon Jury,

A Monsieur le Professeur Eric Solary pour avoir accepté d'en être le président,

A mes rapporteurs, Madame le Professeur Karen Leroy et Monsieur le Docteur Jean-Pierre De Villartay, pour avoir lu avec attention mon travail de thèse et m'avoir donné de précieux conseils,

A Monsieur le Professeur Philippe Gaulard qui m'a fait partager son expérience et ses connaissances dans le domaine si complexe des lymphomes,

A Monsieur le Docteur Christian Bastard, qui me connaît depuis que je suis « toute petite » et représente tout l'attachement que je porte à Rouen, en particulier à l'équipe du centre Henri Becquerel. Merci de m'avoir fait découvrir le monde de la biologie moléculaire et de l'oncogénétique et de m'avoir ainsi mis un pied à l'étrier !

Pour continuer sur les Rouennais, un grand merci à Messieurs les Professeurs Hervé Tilly et Fabrice Jardin ainsi qu'au Docteur Philippe Ruminy, qui chacun à leur façon, m'on fait apprécier et aimer l'hématologie adulte… ce qui n'était pas gagné pour une pédiatre !

Je remercie également chaleureusement toutes les personnes qui m'ont accompagnée dans cette aventure depuis deux ans,

Tout d'abord les Docteurs Virginie Pénard-Lacronique et Thomas Mercher pour leurs conseils avisés. Thomas, je m'excuse pour toutes les fois où je suis venue te poser des questions mais c'est un peu de ta faute, tu as toujours réponse à tout !

Les locataires du « bureau des étudiants », Vinciane, Paola, Clarisse, Frederik, Elena et Cyril, et aussi Sébastien : merci pour tous les bons moments passés ensemble et désolée pour mes « râleries » concernant le ménage et le rangement du labo !

Enfin les filles de l' « aquarium » : Cécile pour tes raccourcis dans les protocoles, ta bonne humeur communicative, et surtout ton rire reconnaissable entre tous , Laurianne, ma « petite sœur » de thèse pour ton aide au quotidien et toutes nos discussions au dessus des planches à dissection, et bien sûr Véronique, toujours là, toujours disponible, merci de m'avoir épaulée, écoutée, réconfortée parfois, bref d'avoir veillé sur moi tout au long de ces années.

Un dernier mot pour mes proches,

Tout d'abord mes parents, pour leur soutien indéfectible… Après la pédiatrie, c'est finalement l'hématologie ; après la clinique, c'est recherche à plein temps pendant 3 ans ; une thèse j'en ai déjà une mais j'en veux une deuxième … Pas toujours facile de me suivre ! Merci pour avoir toujours respecté mes choix personnels et professionnels. J'espère vous avoir rendu fiers…

Enfin je remercie François, mon marathonien de cœur et d'esprit, qui m'a appris l'importance de ne pas partir trop vite pour ne pas s'essouffler en chemin, d'attendre le bon moment pour attaquer mais aussi de savoir « sprinter » quand la ligne d'arrivée est en vue. Avec toi, pas besoin de « cardio » ni de GPS, je te suis les yeux fermés …et même jusqu'à New York !

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION 1

1.1. Hématopoïèse 1

1.2. Hémopathies myéloïdes 2
1.2.1. Classification 2
1.2.2. Mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes 4
1.2.2.1. Fréquences des mutations *TET2* dans les hémopathies myéloïdes 4
1.2.2.2. Caractéristiques cliniques et biologiques associées aux mutations *TET2* 5
1.2.2.3. Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires associées aux mutations *TET2* 6
1.2.2.4. Impact pronostique des mutations *TET2* 8

1.3. Hémopathies lymphoïdes 9
1.3.1. Classification et généralités 9
1.3.2. Description des principaux PTCL 11
1.3.2.1. ALCL 11
1.3.2.1.1 ALCL ALK+ 11
1.3.2.1.2 ALCL ALK- 12
1.3.2.2. AITL 13
1.3.2.2.1 Aspects clinico-biologiques 13
1.3.2.2.2 Aspects histologiques et cytogénétiques 13
1.3.2.2.3 La cellule tumorale d'AITL 13
1.3.2.3. PTCL, NOS 14
1.3.2.3.1 Aspects clinico-biologiques 14
1.3.2.3.2 Aspects histologiques et cytogénétiques 15
1.3.2.3.3 La cellule tumorale de PTCL, NOS 16

1.4. Protéines TET 17
1.4.1. Structure des protéines TET 17
1.4.2. Fonction des protéines TET : l'hydroxylation des méthylcytosines 18
1.4.3. Rôle des protéines Tet dans les cellules ES murines 20
1.4.3.1. Rôle de Tet1 dans les cellules ES murines 20
1.4.3.2. Rôle de Tet2 dans les cellules ES murines 24
1.4.4. Rôle de Tet3 dans le zygote 25
1.4.5. Rôle de TET2 dans l'hématopoïèse 27
1.4.5.1. Expression des *Tet* au cours de l'hématopoïèse murine 27
1.4.5.2. Analyse *in vitro* par des approches de RNA interférence 28
1.4.5.3. Analyse *in vivo* par des modèles murins d'invalidation de *Tet2* 28
1.4.5.4. Conséquences des mutations *TET2* chez les patients 30

1.5. DNMT3A 31
1.5.1. Mutations du gène *DNMT3A* dans les hémopathies myéloïdes 32
1.5.1.1. Description des mutations *DNMT3A* 32
1.5.1.2. Conséquences des mutations *DNMT3A* 32
1.5.2. Rôle de Dnmt3a dans l'hématopoïèse 33
1.5.3. Conséquences de la méthylation dnmt3a-dépendante sur l'expression des gènes 35

2. OBJECTIFS **37**

3. RESULTATS **38**

3.1. Article 1 : Analyses of *TET2* mutations in post myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias 38

3.2. Article 2 : *TET2* inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis..... 43

3.2.1. L'inactivation de *Tet2* entraîne des anomalies de l'hématopoïèse chez la souris 43

3.2.2. L'inactivation de *TET2* constitue un événement récurrent durant la lymphomagenèse humaine 44

3.3. Article 3 : Recurrent *TET2* mutations in peripheral T-Cell lymphoma correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters 79

3.4. Article 4 : *TET2* and *DNMT3A* mutations in human T-cell lymphoma..... 91

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES **101**

4.1. Implication de la CSH au cours de la pathogenèse des hémopathies lymphoïdes 101

4.1.1. CSH et LLC 101

4.1.2. CSH et lymphomes 103

4.1.3. Gènes mutés dans les hémopathies myéloïdes et lymphoïdes 104

4.2. Hétérogénéité tumorale 105

4.2.1. Hétérogénéité intratumorale..... 105

4.2.2. Hétérogénéité intertumorale..... 107

4.3. Poursuite du travail..... 107

4.3.1. Modélisation du processus de lymphomagenèse *in vivo* 107

4.3.2. Modélisation de la coopération oncogénique *TET2-DNMT3A* 109

4.3.3. Analyse du rôle de Tet2 dans la différenciation lymphoïde 110

4.4. Identification des mutations de *TET2* chez les patients : perspectives..... 110

4.4.1. Perspectives diagnostiques 110

4.4.2. Perspectives thérapeutiques..... 110

4.4.3. Association des mutations *TET2, IDH2* et *DNMT3A* 111

5. CONCLUSION **114**

6. BIBLIOGRAPHIE **115**

ABRÉVIATIONS

a.a : acide aminé

ChIP-seq : Chromatin ImmunoPrecipitation-sequencing

EBV : Epstein-Barr Virus

EFS : event-free survival

IGH : chaîne lourde d'immunoglobuline

Kb : kilobase

KO : knock out

LDH : lactate déshydrogénase

OS : overall survival

PCR : polymerase chain reaction

PFS : progression-free survival

RC : rémission complète

Sh RNA : small hairpin RNA

Si RNA : small interfering RNA

TCR : T-cell receptor

1. INTRODUCTION

1.1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse se définit par l'ensemble des mécanismes qui assurent la production constante et régulée des différentes cellules sanguines. Elle constitue un système décrit de façon hiérarchique qui, à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes, engendre des progéniteurs, des précurseurs et enfin des cellules différenciées matures. Selon le modèle « classique » de différenciation, les lignages lymphoïde d'une part et myéloïde d'autre part se développent à partir d'un même progéniteur dit multipotent (MPP) (Figure 1, modèle A).[1] Depuis, d'autres types de progéniteurs ont été identifiés chez la souris, tels que le progéniteur LMPP (lymphoid-myeloid prime progenitor) capable de se différencier en progéniteurs lymphoides communs (CLP) mais aussi en progéniteurs des granulocytes-macrophages (GMP) (Figure 1, modèle B).[2,3] Des voies alternatives ont également été proposées en particulier pour la lignée mégacaryocytaire qui pourrait dériver directement d'une cellule souche hématopoïétique (Figure 1, modèle B).[4]

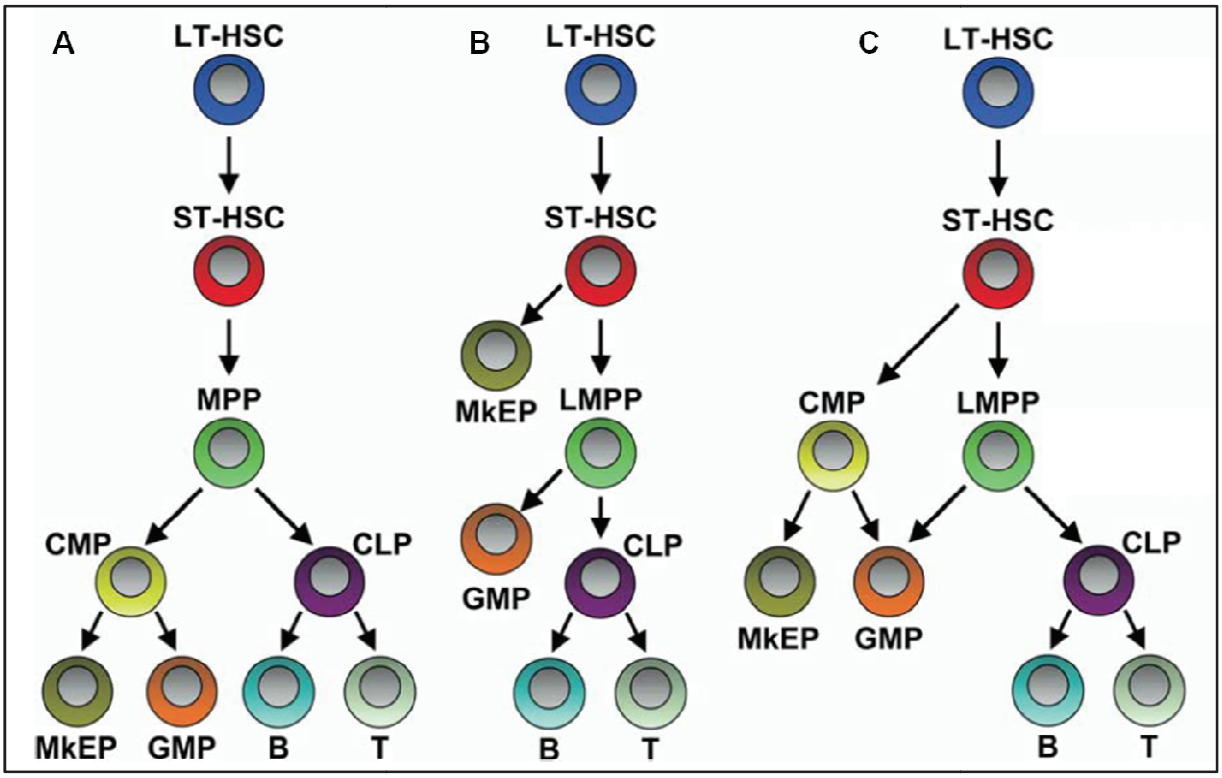


Figure 1 : Modèles de différenciation hématopoïétique.[3]
A : Modèle classique. B et C : Modèles alternatifs.
LT-HSC : long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC : short-term hematopoietic stem cell; MPP : multipotent progenitor; LMPP : lymphoid primed multipotent progenitor; CLP : common lymphoid progenitor; CMP : common myeloid progenitor; GMP : granulocyte/macrophage progenitor; MkEP : megakaryocyte/erythroid progenitor; B : B-cell; T : T-cell.

Les mécanismes contrôlant les fonctions des CSH et l'équilibre entre différenciation et autorenouvellement font intervenir de nombreux facteurs de transcription, des facteurs de croissance et également le microenvironnement des CSH. De nombreux gènes mutés ou remaniés au cours des processus tumoraux codent pour des protéines qui participent au contrôle de la différenciation hématopoïétique normale. Une des approches pour découvrir de nouveaux gènes dont les produits sont impliqués dans le contrôle de l'hématopoïèse normale et pathologique, consiste donc en l'analyse du génome des cellules tumorales des hémopathies malignes.

1.2. Hémopathies myéloïdes

1.2.1. Classification

Les hémopathies malignes humaines se répartissent en deux groupes, selon la voie de différenciation qui est affectée : les hémopathies myéloïdes d'une part et les hémopathies lymphoïdes d'autre part. Au sein des pathologies myéloïdes, la classification 2008 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les syndromes myélodysplasiques (SMD), les syndromes myéloprolifératifs (SMP), les formes « frontières » myélodysplasiques-myéloprolifératives (SMD / SMP) qui comprennent les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) et les hémopathies myéloïdes associées à une éosinophilie.[5]

Selon l'OMS, les LAM se définissent par la présence de plus de 20% de blastes dans la moelle osseuse. Ces entités se caractérisent par une prolifération et un blocage de la différenciation. Elles proviennent de la transformation d'un progéniteur myéloïde ou d'une CSH. On distingue les LAM *de novo* des LAM secondaires se développant à la suite d'un traitement ou correspondant à des transformations de SMP ou de SMD. Six groupes ont été individualisés : les LAM avec anomalies génétiques récurrentes (réarrangements des gènes *RUNX1*, *CBFB, RARA, MLL*, mutations de *NPM1, CEBPA*), les LAM avec dysplasie multilignée, les LAM post chimiothérapies, les proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down (trisomie 21), les leucémies à cellules dendritiques et des LAM « non classées » qui comprennent en particulier certaines érythroleucémies et leucémies aiguës mégacaryoblastiques.[6]

Le groupe hétérogène des SMD est considéré comme dérivant d'une anomalie clonale de la CSH qui entraîne une dysplasie d'une ou plusieurs lignées associée à une apoptose intramédullaire.[7] Une cytopénie périphérique est observée du fait de l'inefficacité de l'hématopoïèse. Certaines anomalies moléculaires ont été décrites dans les SMD, soit associées à certains sous-types (5q-) soit à la transformation aiguë (mutations de *RUNX1*,

N-RAS, *JAK2*, *KIT).*[8] Hormis les mutations de gènes dont les produits interviennent dans la régulation épigénétique de la structure chromatinienne et que je présenterai plus loin, il a été rapporté très récemment un nouveau groupe de mutations affectant les gènes codant pour des protéines du complexe du spliceosome (*SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1, U2AF35*). Ces mutations sont observées chez environ 35 à 40% des patients atteints de SMD.[9-13]

Les SMP résultent de l'expansion clonale d'un progéniteur myéloïde avec une relative préservation de la différenciation et regroupent : les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), les polyglobulies primitives (PV), les thrombocytémies essentielles (TE) et les splénomégalies myéloïdes ou myélofibroses primitives (MFP).

Les LMC sont définies par le chromosome Philadelphie qui résulte d'une translocation t(9;22)(q34;q11). Cette translocation fusionne les gènes *BCR* et *ABL1*[14] et aboutit à l'activation constitutive de l'activité tyrosine kinase d'ABL1.[15]

Les PV, TE et MFP sont les trois principaux SMP *BCR-ABL1* négatifs. Des mutations activatrices du gène *JAK2* sont observées dans la majorité de ces SMP, la plus fréquente étant la mutation *JAK2*V617F.[16-18] Des mutations du gène codant pour le récepteur à la thrombopoïétine *MPL* ont aussi été décrites.[19]

Ces SMP peuvent évoluer vers une leucémie myéloïde aiguë ou vers une myélofibrose (MF). La découverte de la mutation *JAK2*V617F a permis de mieux comprendre leur pathogenèse.[16] Cette mutation est en effet observée dans plus de 95% des PV et dans la majorité des TE (60%) et des PMF (50%).[20] De plus, différents modèles de souris montrent que l'expression de *JAK2*V617F suffit à reproduire une maladie de type PV qui peut évoluer vers une myélofibrose.[16,21]

Dans la majorité des cas de PV et de PMF, la mutation *JAK2*V617F est observée sous forme homozygote ; ceci résulte le plus souvent d'une recombinaison mitotique aboutissant à la perte de la copie sauvage et à la duplication de la copie mutée. A l'opposé, dans les TE, la mutation est le plus souvent hétérozygote.[22] Ces observations suggèrent un lien entre la « quantité » de *JAK2*V617F et le phénotype clinique.

Cependant, dans certains cas de SMP, des anomalies cytogénétiques peuvent être observées en plus large proportion que la mutation *JAK2*V617F elle-même.[23] Certains patients avec un SMP *JAK2*V617F positif ne présentent plus la mutation lors de la transformation aiguë.[24] Ces constatations suggèrent fortement l'existence de mutations somatiques précoces « pré*JAK2* ».[23,24]

Les mutations récemment décrites du gène Ten-Eleven-Translocation (*TET)2* dans les SMP, les SMD, et les LAM primaires et secondaires[25-31] constituent un exemple de mutation pré-*JAK2* dans certains SMP.

1.2.2. Mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes

Le gène *TET2* fait partie d'une famille de 3 membres. Le membre fondateur *TET1*, situé en 10q21, a été identifié en tant que partenaire de *MLL* dans une translocation (10;11) (q22;q23) présente dans des leucémies aiguës ;[32,33] *TET2* et *TET3* sont respectivement situés en 4q24 et 2p13. Le gène *TET2* comprend 11 exons et s'étend sur plus de 150 kb. La protéine TET2 est codée par les exons 3 à 11 et comporte 2002 acides aminés.
Des mutations inactivatrices de ce gène ont été décrites dans différentes pathologies myéloïdes avec des fréquences variables.

1.2.2.1. *Fréquences des mutations TET2 dans les hémopathies myéloïdes*

Les mutations de *TET2* affectent toutes les régions du gène. Tous les types de mutations sont observés : insertions ou délétions avec décalage du cadre de lecture (frameshift), mutations affectant les sites d'épissage, mutations faux-sens et mutations non-sens. La présence de mutations entraînant un décalage du cadre de lecture et/ou l'apparition d'un codon stop suggère que les anomalies de *TET2* conduisent à l'inactivation du gène. L'observation de deux mutations de *TET2* chez la moitié des cas mutés[31] suggère que les deux copies de *TET2* pourraient être inactivées, aboutissant à une perte totale de fonction. Néanmoins, la présence d'une seule mutation chez l'autre moitié des patients indique également un effet d'haplo-insuffisance.[30,31,34]

L'ensemble de ces données permet d'envisager *TET2* comme un nouveau gène suppresseur de tumeur[35] régulant l'hématopoïèse physiologique, et ses anomalies comme des évènements génétiques précoces dans les pathologies myéloïdes.

La grande majorité des mutations *TET2* est acquise. Dans les SMP familiaux, les mutations de *TET2* observées sont toutes somatiques. Un seul cas de mutation germinale a été formellement identifié[36] mais l'analyse d'un tissu constitutionnel ne pouvant être réalisée chez tous les patients, les mutations germinales de *TET2* sont probablement sous-estimées.

Les mutations de *TET2* ont tout d'abord été identifiées dans des pathologies myéloïdes de l'adulte. Elles sont observées avec une fréquence globale de 18%, allant de 3% pour les LMC jusqu'à 43% pour les LMMC. (Tableau 1)

Pathologie	Taux de mutations	Moyenne	Références
SMD	6-26%	17%	27,29-31,37,38
LMMC	20-50%	43%	25,27,29,31,38-41
SMD / SMP autres que LMMC	31-33%	31%	27,29
PV	10-16%	13%	25,28,31
TE	4-11%	7%	25,28,31
MFP	8-25%	17%	25,28,31
MF post SMP	14-33%	17%	28,31
LMC	2-4%	3%	42,43
Mastocytose	29%	29%	26
LAM *de novo*	12-23%	15%	25,27,44-47
LAM 2aires post SMD ou SMD / SMP	22-43%	24%	29
LAM 2aires post SMP	17-32%	26%	28,48
LAM 2aires post traitement	9%	9%	49

Tableau 1 : Fréquence des mutations de *TET2* dans diverses pathologies myéloïdes.

Concernant les patients pédiatriques, peu d'études ont été réalisées mais il apparaît que les mutations de *TET2* sont des évènements rares dans le processus de transformation tumorale. Aucune mutation de *TET2* n'a été décrite dans les LAL-B pédiatriques[50] et dans les leucémies juvéniles myélomonocytaires.[51,52] Elles ne touchent que 4% des patients atteints de LAM.[50]

1.2.2.2. *Caractéristiques cliniques et biologiques associées aux mutations TET2*

Les caractéristiques cliniques et biologiques au diagnostic des patients mutés pour *TET2* et atteints de pathologies myéloïdes sont résumées dans le Tableau 2.

Globalement, les patients mutés pour *TET2* semblent plus âgés que les patients sauvages.[28,37,38,40,44,45,47,49] Il n'y a pas de prédominance de genre.[37,38,40,44,45,49] Au sein des SMD et formes frontières SMD / SMP telles que les LMMC, aucune différence notable concernant le sous-type selon les classifications FAB ou OMS, le score pronostique IPSS (International Prognostic Scoring System) ou encore le traitement antérieur reçu n'est mise en évidence.[37,38,40]

Concernant les LAM *de novo*, les patients porteurs d'une mutation de *TET2* ont un taux plus élevé de leucocytes et de LDH.[44,45] Au niveau des sous-types cytologiques FAB, il apparaît que les mutations de *TET2* sont rares dans les LAM de type M3.[44,47] En revanche, si l'on exclut les FAB M3, les mutations de *TET2* touchent tous les sous-types sans différence significative.[44] Il n'existe pas de différence sur les critères cliniques et biologiques au diagnostic que le patient soit porteur d'une ou de deux mutations.[44]

Pathologie	Caractéristique	Impact	Références
SMP	Age	plus élevé	28
SMD	Age	controversé	37,38
	Taux de blastes	controversé	30,37
	Cytopénies	controversé	29,30,37,53
	Sexe	non	37,38
	Classification FAB	non	37
	Classification OMS	non	37,53
	IPSS	non	37,38,53
	Traitement antérieur	non	37,38,53
LMMC	Age	controversé	38,40
	Sexe	non	40
	Cytopénies	non	40
	Taux de blastes	non	40
	Classification FAB	non	40
	Classification OMS	non	40
LAM 2aires post SMD et post traitement	Age	plus élevé	49
	Taux de leucocytes	plus élevé	49
	Taux de monocytes	plus élevé	49
	Taux de plaquettes	moins élevé	49
	Sexe	non	49
	Traitement antérieur	non	49
	Taux d'hémoglobine	non	49
	Taux de blastes	non	49
LAM *de novo*	Age	plus élevé	44,45,47
	Taux de leucocytes	plus élevé	44,45
	FAB M3	moins fréquent	44,47
	Taux de blastes	controversé	44,45
	Sexe	non	44,45
	Taux d'hémoglobine et de plaquettes	non	44,45
	Classification FAB hors M3	non	44

Tableau 2 : Paramètres cliniques et biologiques analysés dans la littérature chez les patients mutés pour *TET2.*

1.2.2.3. *Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires associées aux mutations TET2*

L'association éventuelle des mutations *TET2* à des aspects cytogénétiques ou moléculaires particuliers dans les pathologies myéloïdes est reportée dans le Tableau 3.

Brièvement, dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) et leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC), les mutations de *TET2* ne sont pas associées à une

cytogénétique spécifique.[29,37,38 ,40] En revanche, dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), qu'elles soient secondaires ou *de novo*, on observe une association significative entre la présence de mutations *TET2* et un caryotype normal.[44,45,47,49]

Au sein des LAM *de novo*, les mutations de *TET2* ne sont pas associées aux mutations de *FLT3*, *CEBPA, MLL, AML 1, KIT, WT1, N* ou *Kras*.[25,44,45,47] Une étude rapporterait une co-occurrence des mutations de *TET2* avec des mutations d'*ASXL1*.[44] Les mutations de *TET2* et d'*IDH1-IDH2* sont quasi mutuellement exclusives.[44,45,47] Enfin, elles seraient associées au sous groupe « risque favorable » chez les patients avec LAM à caryotype normal.[45]

Pathologie	Caractéristique	Impact	Références
SMD	Cytogénétique	non	29,37,38
LMMC	Mutations *CBL*	association aux mutations *CBL*	39
	Cytogénétique	non	40
LAM 2aires post SMD et post traitement	Cytogénétique	association à un caryotype normal	49
	Mutations *FLT3*	non	49
	Mutations *NPM1*	non	49
	Mutations *Kit*	non	49
	Mutations *N ou K ras*	non	49
	Mutations *WT1*	non	49
LAM *de novo*	Cytogénétique	association à un caryotype normal	44,45,47
	Caryotype normal	association au risque favorable	45
	Mutations *ASXL1*	association aux mutations *ASXL1*	44
	Mutations *IDH1/2*	mutuellement exclusives	44,45,47,54
	Mutations *NPM1*	controversé	25,44,45,47
	Mutations *CEBPA*	non	25,44,47
	Mutations *FTLT3*	non	25,44,45,47
	Mutations *MLL*	non	25,45
	Mutations *AML1*	non	44
	Mutations *Kit*	non	44
	Mutations *WT1*	non	44,45
	Mutations *N* ou *K ras*	non	44

Tableau 3 : Caractéristiques cytogénétiques et moléculaires analysées dans la littérature chez les patients mutés pour *TET2.*

1.2.2.4. *Impact pronostique des mutations TET2*

L'observation de mutations fréquentes du gène *TET2* a conduit à se poser la question de leur impact pronostique (Tableau 4).

Pour les PV, les MFP et les mastocytoses, la présence de mutations *TET2* ne semble pas influer sur le pronostic.[26,28] Concernant les LMMC, Kohlmann *et al*[39] rapportent une meilleure OS chez les patients mutés contrairement à l'étude de Kosmider *et al*[40] qui montre une moins bonne survie des patients *TET2* mutés avec LMMC-1. Pour les SMD, les données publiées montrent aussi des discordances, avec une étude retrouvant une moins bonne OS chez les patients mutés pour *TET2*[37] et une autre ne mettant pas en évidence d'impact pronostique.[38]

Chez les patients avec LAM *de novo*, il ne semble pas y avoir d'impact des mutations *TET2* sur le pronostic.[44,46,47] Aucune différence de survie n'est mise en évidence entre les patients porteurs d'une mutation *TET2* et ceux porteurs de deux.[44] Le groupe du CALGB a montré qu'au sein d'un sous-groupe particulier de LAM *de novo*, les LAM à caryotype normal risque favorable, l'observation de mutations de *TET2* impacte la survie globale, la DFS et le taux de RC.[45] Au sein des LAM à cytogénétique intermédiaire, Chou *et al*[44] ont identifié 3 groupes de patients : les *TET2* mutés / *FLT3* mutés qui ont un mauvais pronostic, les *TET2* sauvages / *FLT3* sauvages qui ont un bon pronostic, et les *TET2* mutés / *FLT3* sauvages ou *TET2* sauvages / *FLT3* mutés qui ont une survie intermédiaire. Par ailleurs les auteurs montrent que la présence de mutations de *TET2* n'influence pas la survie dans le groupe avec marqueurs moléculaires de bon pronostic (*CEBPA* muté ou *NPM1* muté / *FLT3* sauvage). En revanche, en l'absence de ces derniers, elle grève le pronostic.[44] En tenant compte de la présence ou non de mutations *FLT3, NPM1, CEBPA* et *TET2*, Chou *et al* ont proposé un score corrélé au devenir pour les LAM à cytogénétique intermédiaire.

Pathologie	Impact pronostique	Références	Nombre de patients analysés
SMD	controversé	37 38	96 320
LMMC	controversé	39 40	81 88
PV	non	28	89
MFP	non	28	60
Mastocytose	non	26	42
LAM 2aires post SMD ou post traitement	non	49	247
LAM *de novo*	non	44 46 47	486 147 605
LAM *de novo* à caryotype normal	moins bonnes DFS, OS et moins bon taux de RC pour les « risque favorable »	45	437

Tableau 4 : Impact pronostique des mutations *TET2.*

1.3. Hémopathies lymphoïdes

1.3.1. Classification et généralités

Au sein des hémopathies lymphoïdes matures, la classification OMS 2008 distingue : les proliférations matures B, les proliférations matures T/ NK, les lymphomes de Hodgkin, les néoplasies à histiocytes et cellules dendritiques et enfin les lymphoproliférations post transplantation.[55]

Les lymphoproliférations matures T/ NK comprennent 3 groupes :[56]

- les lymphomes T périphériques (PTCL)
- les lymphomes T primitivement cutanés type Syndrome de Sézary ou mycosis fungoïde
- les leucémies T :
    - leucémies granulaires à cellules T
    - leucémies à cellules NK
    - leucémies prolymphocytaires T

Nous nous sommes focalisés sur le groupe hétérogène des lymphomes T périphériques, qui compte pour moins de 15% de l'ensemble des lymphomes non Hodgkiniens[57] et dont certaines sous-entités sont encore mal caractérisées sur le plan moléculaire. La prévalence des principaux types de PTCL est rapportée dans le Tableau 5. La Figure 2 représente la différenciation normale T et NK et indique de quel type cellulaire pourrait dériver chaque entité de PTCL.

Type	Prévalence
Lymphome T périphérique non spécifié (PTCL, NOS)	26 %
Lymphome T angio-immunoblastique (AITL)	18 %
Lymphome NK / T extra-ganglionnaire de type nasal	10 %
Leucémie / lymphome T de l'adulte HTLV1 +	10 %
Lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL) ALK+	7 %
Lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL) ALK-	5 %
Lymphome T associé à une entéropathie	5 %
Lymphome anaplasique à grandes cellules cutané primitif	2 %
Lymphome T hépatosplénique	1 %
Lymphome T sous-cutané à type de panniculite	1 %
Autres entités et cas non classés	15 %

Tableau 5 : Prévalence des principales entités de PTCL.[57]

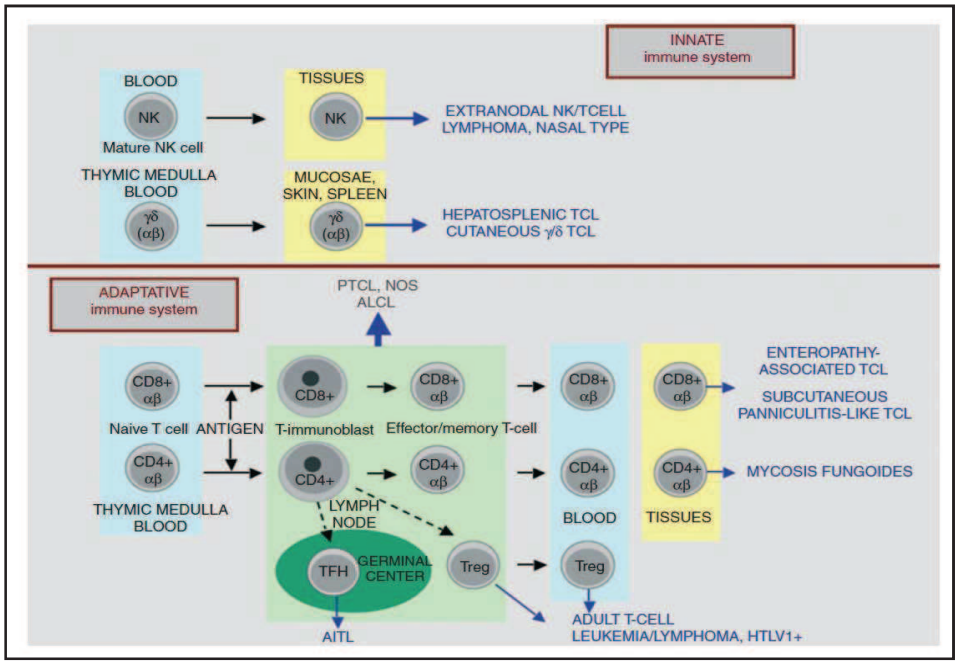


Figure 2 : Vue schématique de la différenciation T et NK et de l'origine cellulaire supposée des principales entités de PTCL.[58]

Si l'on exclut les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK+, les lymphomes T périphériques sont globalement associés à un mauvais pronostic (Figure 3).

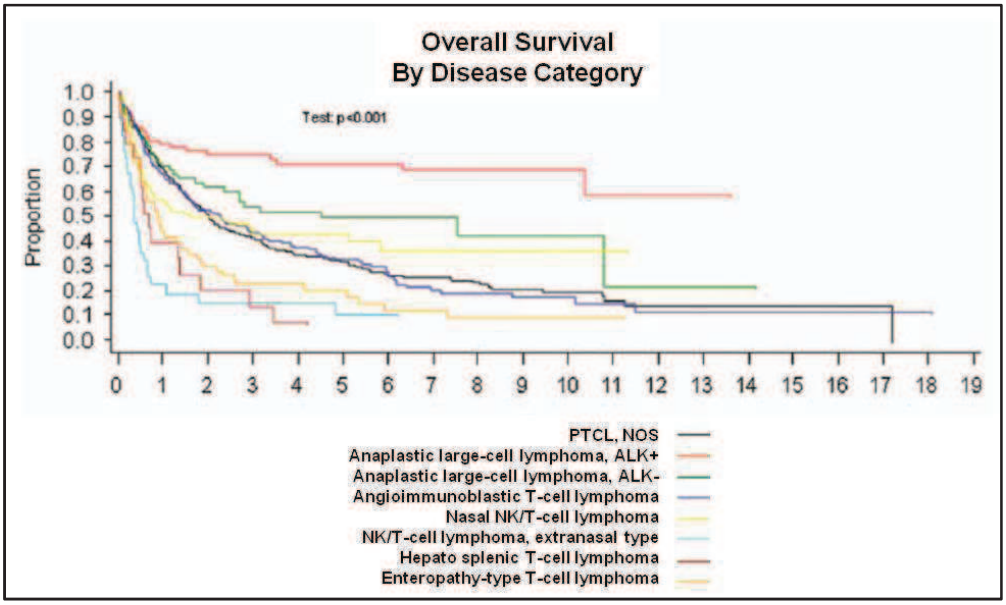


Figure 3 : Courbe de survie des patients atteints de PTCL.[57]

Deux scores pronostiques peuvent être utilisés : l'IPI (International Prognostic Index), applicable à tous les lymphomes non Hodgkiniens et le PIT (Prognostic Index for PTCL-U)[59] spécifique des PTCL et qui tient compte de 4 paramètres : l'âge, le taux de LDH, le « performance status », et la présence d'un envahissement médullaire.

1.3.2. Description des principaux PTCL

Les trois types histologiques de PTCL les plus fréquents en Europe et Amérique du Nord sont le lymphome T périphérique non spécifié (PTCL, NOS), le lymphome T angio-immunoblastique (AITL) et le lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL).

1.3.2.1. *ALCL*

Deux sous-type d'ALCL sont décrits : les ALCL exprimant la protéine ALK (ALK+) et ceux ne l'exprimant pas (ALK-).

1.3.2.1.1 ALCL ALK+

Les ALCL ALK+ touchent principalement des enfants et de jeunes adultes, se caractérisent cliniquement par de nombreuses adénopathies, des atteintes extra-ganglionnaires fréquentes (peau, os et tissus mous), la présence de symptômes B (fièvre), un stade avancé chez la moitié des patients et sont associés à un bon pronostic.[58]

Les cellules tumorales sont ALK+, CD30+, EMA+, CD3- et expriment souvent le CD2, le CD4, le CD45 mais aussi des antigènes de lymphocytes T cytotoxiques comme TIA-1, granzyme B et perforine.[58]

Sur le plan cytogénétique, il est observé une translocation impliquant le gène *ALK* (2p23) qui signe le diagnostic. La première décrite, qui est également la plus fréquente, est la translocation t(2;5)(p23;q35) qui fusionne le gène *ALK* au gène *NPM1.*[60,61] D'autres partenaires d'*ALK* ont par la suite été rapportés (Tableau 6). Dans tous les cas, la fusion entraîne une activation constitutive de la tyrosine kinase ALK.[62]

Translocation	Gène partenaire	Fréquence
t(2;5)(p23;q35)	*Nucleophosmin (NPM1)*	75%
t(1;2)(q25;p23)	*Tropomyosin 3 (TPM3)*	10-20%
t(2;3)(p23;q11)	*TRK fused gene (TFG)*	2-5%
inv(2)(p23q35)	*ATIC (Pur H gene)*	2-5%
t(2;17)(p23;q23)	*Clathrin heavy chain (CLTC)*	2-5%
t(2;22)(p23;q11.2)	*Myosin heavy chain (MYH9)*	rare
t(2;17)(p23;q23)	*ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17 (ALO17)*	rare
t(2;19)(p23;p13.1)	*Tropomyosin 4 (TPM4)*	rare
t(2;X)(p23;q11–12)	*Moesin (MSN)*	rare

Tableau 6 : Translocations impliquant le gène *ALK* rapportées chez les patients avec ALCL.[62]

1.3.2.1.2 ALCL ALK-

Les ALCL ALK- affectent des individus plus âgés, avec de moins fréquentes atteintes extra-ganglionnaires. Le pronostic des ALCL ALK- est moins bon que celui des ALCL ALK+ mais reste meilleur que celui des PTCL, NOS.

Les cellules tumorales sont ALK- CD30+. Les antigènes pan-T sont plus souvent exprimés dans les tumeurs ALK- que les tumeurs ALK+, contrairement aux marqueurs cytotoxiques et à l'antigène EMA qui le sont moins. Les ALCL ALK- peuvent être difficiles à distinguer de certains PTCL, NOS exprimant fortement le CD30+.[58]

Récemment il a été décrit un réarrangement récurrent du locus 6p25 présent chez environ 25% des patients atteints d'ALCL ALK-, qu'ils soient de type systémique ou cutané. Cette translocation affecte dans 1/3 des cas le gène *IRF4* et dans 2/3 des cas le gène *DUSP22*.[63-66] Le facteur de transcription IRF4/MUM1 est connu pour être un important régulateur de la différenciation lymphoïde normale, fortement exprimé dans les plasmocytes et les lymphocytes T activés.[67] Dans la majorité des translocations impliquant *IRF4*, le partenaire n'est pas identifié et l'expression d'*IRF4* ne semble pas dérégulée.[63] En revanche, quand le gène affecté en 6p25 est *DUSP22*, son partenaire se situe dans plus de la moitié des cas en 7q32.3 à proximité du site fragile *FRA7H* et du gène codant pour le miRNA MIR29. La translocation (6;7)(p25.3;q32.3) conduit à la sous-expression de *DUSP22* et à la surexpression de *MIR29*.[63]
Les réarrangements du locus 6p25 ne surviennent qu'occasionnellement dans les autres entités de PTCL[63-66] et leur détection peut donc aider au diagnostic différentiel, en particulier pour certaines lymphoproliférations CD30+ de la peau. Une translocation impliquant le locus 6p25, la t(6;14)(p25;q11.2) a tout de même été rapportée chez deux patients atteints de PTCL, NOS avec phénotype « cytotoxique » et dans ce cas, fusionnait le gène *IRF4* au locus du *TCR*.[64]

Des aberrations chromosomiques sont détectées dans deux tiers des cas et diffèrent de celles observées chez les patients ALK+.[68] Les analyses transcriptomiques révèlent une signature moléculaire commune aux ALCL ALK+ et ALK- mais identifient également un set de gènes spécifiques dont l'expression diffère entre les deux sous-types.[69,70]

1.3.2.2. *AITL*

Les lymphomes T angio-immunoblastiques (AITL) représentent par ordre de fréquence le deuxième lymphome T périphérique (PTCL) au monde et le premier en Europe et Amérique du Nord (25 à 30% des PTCL).

1.3.2.2.1 Aspects clinico-biologiques

Les AITL sont principalement observés chez les patients de 60-70 ans et se présentent cliniquement par des adénopathies généralisées, une hépatosplénomégalie, et des symptômes B (fièvre, perte de poids, éruption cutanée, arthralgies). Sur le plan biologique, une hypergammaglobulinémie polyclonale et une anémie hémolytique auto-immune sont fréquemment retrouvées.[58] La survie globale des AITL est proche de celle des PTCL, NOS, d'environ 30% à 5 ans et leur médiane de survie ne dépasse pas 3 ans.[71]

1.3.2.2.2 Aspects histologiques et cytogénétiques

Sur le plan histologique, les AITL se caractérisent par :[72]

- un infiltrat polymorphe associant en proportions variables des cellules tumorales T de taille moyenne avec noyau rond ou légèrement irrégulier et cytoplasme clair, de petits lymphocytes, des histiocytes, des cellules épithélioïdes, des immunoblastes, des éosinophiles et des plasmocytes
- une hyperplasie vasculaire avec vaisseaux ramifiés
- une prolifération périvasculaire de cellules folliculaires dendritiques
- la présence de grandes cellules B souvent infectées par l'EBV, qui ressemblent aux cellules de Reed Sternberg. L'abondance de ces cellules B ne corrèle pas avec le pronostic[71] mais avec la détection chez un tiers des patients d'une clonalité ou oligoclonalité B.[73]

Le compartiment tumoral est souvent moins représenté que l'infiltrat réactionnel.

Des aberrations chromosomiques clonales sont observées dans plus de 90% des cas. Il s'agit principalement de trisomies 5, trisomies 21, gain du 3q, 5q et perte du 6q.[74] Il n'est que très peu observé de translocations impliquant le locus du *TCR*.

1.3.2.2.3 La cellule tumorale d'AITL

Les cellules tumorales d'AITL sont généralement CD4+ CD8- αβ + mais dans certains cas n'expriment que faiblement des marqueurs pan -T comme le CD3, le CD4 ou le CD7[58] Elles expriment fréquemment le CD10[75] et BCL6[76], des marqueurs du centre germinatif. Elles expriment également des marqueurs caractéristiques des lymphocytes T follicular

helpers (TFH), tels que CXCL13, PD1, ICOS, PD200, SAP, et CMAF.[77-80] Les TFH sont des cellules CD4+CD57+CXCR5+CCR7- qui se situent dans les centres germinatifs des ganglions au sein desquels ils aident les cellules B au cours des dernières étapes de leur maturation en induisant l'expression d'AID.[81]

Les analyses immunohistochimiques ont par la suite été complétées par des études transcriptomiques. Celles-ci confirment que la contrepartie « normale » des cellules tumorales d'AITL correspond bien aux lymphocytes TFH. Il existe en effet une signature moléculaire commune entre les cellules d'AITL et les TFH.[82,83]

L'ensemble de ces données a permis d'aider au diagnostic et à la classification. En effet, des marqueurs TFH comme CXCL13 ou PD1 ont été validés en tant que nouveaux biomarqueurs dans le diagnostic immunohistochimique des AITL et permettent en particulier de faire le diagnostic différentiel avec d'autres entités de PTCL.[62]

Le fait que les cellules tumorales d'AITL dérivent très probablement de TFH normaux est un premier pas vers la compréhension de la pathogenèse des ces maladies. Néanmoins, les altérations moléculaires à l'origine de la transformation des TFH en cellules tumorales d'AITL ne sont pour l'instant pas connues. D'autres mécanismes interviennent très probablement au cours du développement des AITL.[72] Le microenvironnement tumoral semble jouer un rôle important puisque près de 90% de la signature moléculaire des AITL sont dus aux cellules non tumorales.[82] Par des boucles de régulation autocrines et/ou paracrines, celui-ci est très probablement à l'origine du syndrome inflammatoire et des manifestations cliniques et biologiques dysimmunes observées chez les patients. Les virus EBV et HHV6B sont souvent retrouvés dans les cellules B réactionnelles. Ces observations suggèrent qu'ils ne sont pas directement responsables de la transformation tumorale T mais qu'ils peuvent, via la modulation de production de certaines cytokines, chémokines, récepteurs de membrane, jouer un rôle dans le développement du microenvironnement et ainsi favoriser la progression tumorale.

1.3.2.3. *PTCL, NOS*

Les lymphomes T périphériques non spécifiés (PTCL, NOS) sont les plus fréquents mais aussi les plus hétérogènes des PTCL. Le diagnostic des PTCL, NOS est en réalité un diagnostic d'exclusion des autres PTCL.

1.3.2.3.1 Aspects clinico-biologiques

Les PTCL, NOS concernent souvent des patients de plus de 70 ans et se caractérisent cliniquement par des adénopathies généralisées avec des stades avancés dans 65% des

cas, mais aussi un envahissement extra-ganglionnaire fréquent. Biologiquement, on peut observer une éosinophilie et un syndrome d'activation macrophagique.[58] Le pronostic des PTCL, NOS n'est pas très bon, avec une survie globale à 5 ans d'environ 25-30%.[58]

1.3.2.3.2 Aspects histologiques et cytogénétiques

Les cellules tumorales de PTCL, NOS sont des cellules à cytoplasme clair CD4+ CD8-. Les autres antigènes T sont variablement exprimés avec une perte fréquente du CD7 et plus rarement une perte du CD2, CD3 ou CD5. L'EBV peut être détecté dans une proportion variable de cellules tumorales mais également dans des cellules B adjacentes. Sur le plan histologique, une augmentation de la vascularisation et une éosinophilie peuvent être observées.[58,72] Des variants morphologiques ont été décrits :

- le PTCL, NOS lymphoépithélioïde (lymphome de Lennert) caractérisé par un infiltrat d'histiocytes et de petits lymphocytes cytotoxiques le plus souvent CD8+
- le PTCL, NOS folliculaire avec une structure architecturale mimant celle du lymphome B folliculaire

La cytogénétique retrouve fréquemment des caryotypes complexes. La première translocation décrite dans les PTCL, NOS est la translocation (5;9)(q33;q22) qui fusionne le gène IL-2-inducible T-cell kinase (*ITK*) situé sur le chromosome 5 avec le gène spleen tyrosine kinase (*SYK*) localisé sur le chromosome 9.[84] Cette translocation semble associée à un sous-groupe particulier, le PTCL, NOS folliculaire puisqu'elle est observée chez 20% des patients présentant ce sous-type.[85] Elle n'est jamais détectée dans les AITL. La protéine de fusion résultante est une tyrosine kinase active et son rôle oncogénique a été établi *in vivo*. En effet, les souris surexprimant la fusion *ITK-SYK* développent des lymphomes qui ressemblent aux PTCL, NOS.[86,87] Une étude avait observé et ce, en dehors de toute translocation, une phosphorylation et une activation de SYK dans plus de 90% des cas de PTCL tous confondus[88] mais cette fréquence n'a pas été retrouvée par d'autres groupes.[89,90] A l'instar des AITL, les translocations impliquant le locus du *TCR* sont très rares dans les PTCL, NOS.[62]

Les déséquilibres observés en CGH diffèrent de ceux retrouvés dans les AITL ou les ALCL. Il s'agit de gains récurrents des 1q, 3p, 5p ,7q, 8q, 17q et 22q et des pertes du 6q, 10p et 13q.[74,91,92]

Au total, si l'on exclut les cas particuliers des PTCL, NOS folliculaires avec translocation *ITK-SYK,* aucune anomalie moléculaire récurrente n'est pour l'instant décrite chez la plupart des patients avec PTCL, NOS.

1.3.2.3.3 La cellule tumorale de PTCL, NOS

Sur le plan du profil d'expression, les cellules des PTCL, NOS semblent se rapprocher des cellules CD4+ ou CD8+ activées et se caractérisent par une sous-expression de gènes associés à la prolifération, à l'apoptose, à l'adhésion cellulaire et au remodelage de la matrice et par une surexpression de la voie PDGFRα.[93] Certains profils semblent corrélés à la survie : la surexpression de la voie NFkappa B est associée à un bon pronostic,[94] contrairement à la surexpression d'une signature de prolifération qui elle, est associée à un mauvais pronostic.[95] Les analyses transcriptomiques ont permis également d'identifier un sous type particulier de PTCL, NOS qui présente un profil d'expression proche de celui des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et qui est associé à un moins bon pronostic.[96]
Enfin, il semble exister des formes frontières entre les PTCL, NOS et les AITL, sur le plan histologique mais aussi moléculaire. En effet, on retrouve chez certains PTCL, NOS CD30- une signature TFH.[82]

Le Tableau 7 résume les caractéristiques moléculaires principales des PTCL, NOS, AITL et ALCL.

Entité de PTCL	Aspects génétiques et moléculaires	Implications diagnostiques et thérapeutiques
PTCL, NOS	t(5;9)(q33;q22) (*SYK-ITK*) (variant folliculaire)	Inhibiteurs de SYK et PDGFRA
	activation de SYK	
	activation de PDGFRα	
AITL	signature TFH	Utilisation des marqueurs TFH pour le diagnostic
ALCL, ALK+	t(2;v)(p23;v)	Possibilité d'utiliser des petites molécules inhibitrices dirigées contre les protéines de fusion ALK
ALCL, ALK-	réarrangement du locus *IRF4*	Valeur de la FISH *IRF4* pour le diagnostic différentiel entre ALCL cutanés et autres lymphoproliférations primitives cutanées CD30+

Tableau 7 : Principaux aspects génétiques et moléculaires des 3 entités les plus fréquentes de PTCL avec leurs potentielles implications diagnostiques et thérapeutiques.[62]

1.4. Protéines TET

1.4.1. Structure des protéines TET

Les protéines TET comportent 3 membres : TET1 (2136 a.a), TET2 (2002 a.a), et TET3 (1660 a.a).[97] La protéine TET2 s'exprime de manière ubiquitaire, contrairement à TET1 et TET3 dont l'expression est tissu-spécifique. Elles sont apparentées aux enzymes JBP (J-binding protein) 1 et 2 qui catalysent la conversion des thymines en hydroxymethyluraciles (hmU) chez les trypanosomes. Structurellement, elles appartiennent à la superfamille des oxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate (2OG) et du Fe(II).[98]

En plus de leur domaine catalytique constitué de feuillets β (double-stranded β-helix ou DSBH), les protéines TET ont en commun une région riche en cystéine. Toutes comportent 3 sites de liaison au Fe(II), (TET1 : a.a 1672, 1674, 2028 ; TET2 : a.a 1382, 1384, 1884 ; TET3 : a.a 942, 944, 1538) et un site de liaison au 2-oxoglutarate (TET1 : a.a 2043, TET2 : a.a 1896, TET3 : a.a 1553).[97]

La séquence protéique de TET1 révèle la présence de 3 signaux de localisation nucléaire (Figure 4).[98] La protéine TET1 présente également un domaine CXXC situé en N-terminal, qui est absent des protéines TET2 et TET3.[97,99] Les domaines CXXC sont des domaines de liaison à l'ADN, en particulier au niveau des îlots CpG déméthylés.[100] La particularité du domaine CXXC de TET1 est qu'il se lie à la fois aux cytosines non modifiées mais également aux cytosines méthylées et hydroxyméthylées.[101,102]

La protéine TET2 ne comporte pas de domaine CXXC. Cependant, le gène *CXXC4* est situé également en 4q24 à environ 650 kb en amont du gène *TET2*. On peut donc supposer qu'une inversion chromosomique ancestrale aurait détaché le domaine CXXC de *TET2* pour en faire un gène distinct. Selon Iyer *et al*, l'interaction entre les protéines CXXC4 et TET2 au sein d'un même complexe conduirait à une fonction correcte de TET2.[103]

En résumé, TET1 semble se lier directement à l'ADN via son domaine CXXC, ce qui lui permettrait d'exercer son activité enzymatique dans des régions spécifiques du génome. En revanche, les données actuelles concernant TET2 et TET3 ne sont pas aussi claires et l'on peut supposer que ces deux protéines se fixent de manière indirecte à l'ADN au sein de complexes dont les différents membres n'ont pour l'instant pas été identifiés.

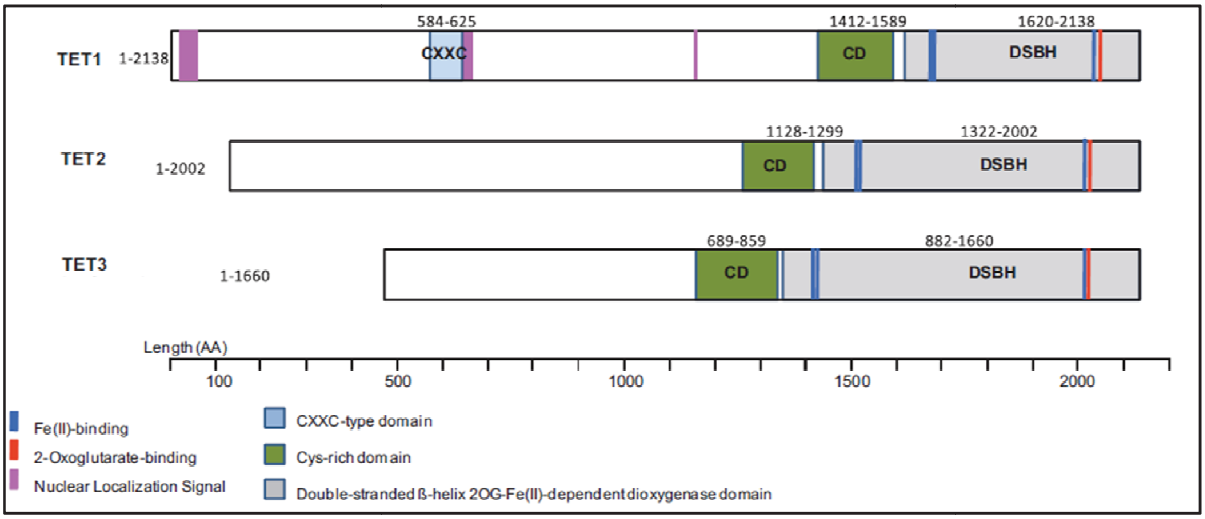


Figure 4 : Représentation schématique de la structure des protéines TET.[97]

1.4.2. Fonction des protéines TET : l'hydroxylation des méthylcytosines

Durant le développement, les cellules souches et les progéniteurs se différencient en diverses cellules dont le profil d'expression génique est régulé au moins en partie par des modifications spécifiques de l'ADN et de leurs histones appelées modifications épigénétiques. Celles-ci sont largement responsables du fait que des cellules ayant exactement le même génome présentent des phénotypes tout à fait distincts.

Chez le trypanosome, les enzymes JBP1 et JBP2 catalysent l'hydroxylation des thymidines, qui sont ensuite glycosylées. Ces thymidines modifiées (bases J) seraient impliquées dans la répression transcriptionnelle des gènes codant pour les antigènes du parasite.[104] Les protéines de la famille TET ne sont pas actives sur les thymidines mais permettent l'hydroxylation des 5-méthylcytosines (5mC) ce qui conduit à la formation de 5-hydroxyméthylcytosines (5hmC).[98,105]

Les 5hmC ont été identifiées comme une nouvelle marque épigénétique. Elles comptent pour 0,17% de l'ensemble des bases des cellules embryonnaires eucaryotes[106] et sont présentes dans 0,6% du génome des cellules de Purkinje murines.[107] Ce pourcentage, bien que faible, est à rapporter à celui des 5mC qui représentent 1% de l'ensemble des bases du génome chez les mammifères.[108]

La conversion en 5hmC constituerait une étape vers la déméthylation, qu'elle soit active ou passive (Figure 5). Les protéines TET seraient donc impliquées dans la régulation épigénétique de la transcription.

Les 5hmC ne sont pas reconnues par l'enzyme Dnmt1 durant la réplication ;[109] par effet de dilution, les divisions cellulaires conduiraient à la perte progressive des 5mC et donc à une déméthylation passive.

Les protéines Tet jouent également un rôle dans la déméthylation active, et ce par l'intermédiaire de plusieurs voies :

- Outre leur capacité d'hydroxyméthylation des 5mC, il a été récemment montré que les protéines de la famille Tet sont capables de poursuivre l'oxydation des 5hmC en 5 formylcytosines (5fC) et 5 carboxycytosines (5caC).[110,111] Les 5fC et 5caC peuvent ensuite être excisés par des DNA glycosylases comme la thymine DNA glycosylase (TDG), conduisant à la formation d'un site abasique.[112] Ce site est par la suite reconnu par le complexe BER (Base Excision Repair) qui réintroduit une cytosine.
- Les 5hmC peuvent être déaminées par les enzymes de la famille AID / APOBEC pour produire des 5hmU.[113] Le mismatch 5hmU / G est ensuite réparé par l'action successive des DNA glycosylases puis du BER.[114]

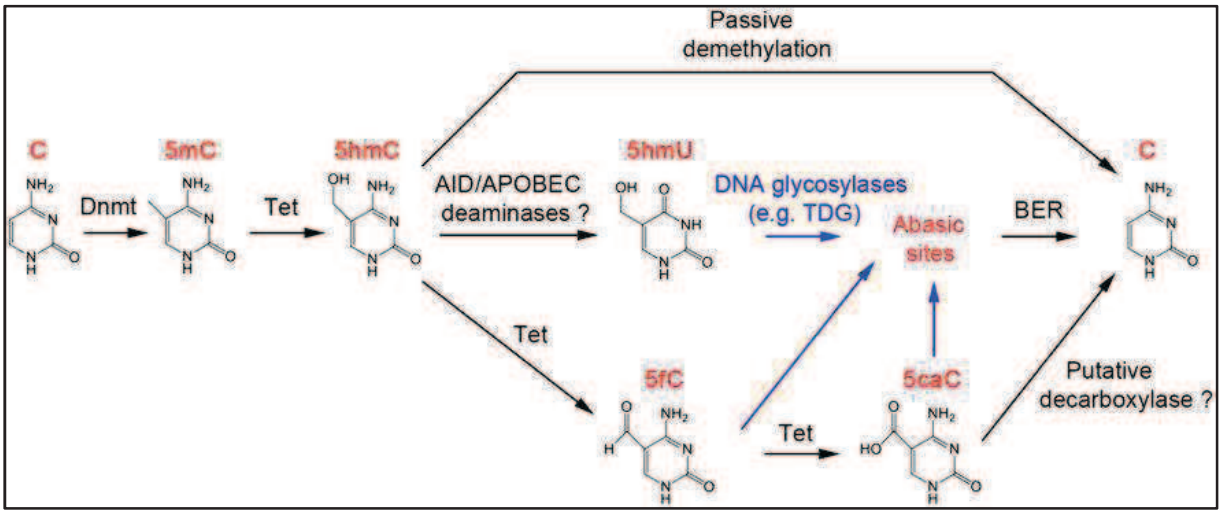


Figure 5 : Représentation des voies possibles de déméthylation active ou passive induites par la conversion des 5mC en 5hmC.[115]

D'autres voies de déméthylation active ont été proposées :

- Une d'entre elles pourrait consister en l'action d'une décarboxylase qui convertirait les 5caC en cytosines.[115]
- On peut également envisager que les 5hmC puissent être excisées par des 5hmC glycosylases spécifiques, qui permettraient ensuite au site abasique d'être reconnu par le BER.[116]
- Le complexe NER (Nucleotide Excision Repair) qui ne reconnaît pas de lésions spécifiques de l'ADN mais plutôt des lésions plus étendues comme par exemple des pontages avec des molécules exogènes, pourrait directement exciser les brins d'ADN contenant les 5hmC et resynthétiser de nouveaux brins avec des cytosines.[116]

Enfin, indépendamment de leur rôle dans le processus de déméthylation, les 5hmC pourraient également avoir un effet propre en empêchant la fixation de certains effecteurs protéiques tels que les « methyl-CpG-binding proteins »[109,117] ou au contraire en recrutant d'autres complexes tels que Uhrf1 ou Mbd3.[118,119]

1.4.3. Rôle des protéines Tet dans les cellules ES murines

Tet1 et *Tet2* sont bien exprimés dans les cellules souches embryonnaires (ES) murines, à la différence de *Tet3*.[98,105,120]

1.4.3.1. *Rôle de Tet1 dans les cellules ES murines*

Un événement caractéristique lors de la différenciation des cellules ES est l'inactivation des gènes de pluripotence tels que *Nanog* et *Oct4*, qui est partiellement due à la méthylation de leurs promoteurs. Les hauts niveaux d'expression de Tet1 et de 5hmC dans les cellules ES en comparaison à ceux des cellules différenciées[98,105,120] suggèrent que Tet1 pourrait agir comme un régulateur de l'autorenouvellement des cellules ES en prévenant la méthylation des gènes de pluripotence par l'hydroxyméthylation.[121]

Par des techniques de ChIP-seq, il a en effet été mis en évidence que Tet1 se situe principalement au niveau des régions promotrices de gènes de pluripotence comme *Nanog*, *Tcl1* et *Esrrb*.[122] Cependant, il ne semble pas y avoir d'effet de l'inactivation de *Tet1* par shRNA sur l'expression des gènes de pluripotence ni sur la morphologie des cellules ES.[120,123,124] Les souris inactivées pour *Tet1* sont viables et fertiles avec tout de même quelques individus de plus petite taille.[123] La perte de *Tet1* n'affecterait donc pas la pluripotence des ES et serait compatible avec un développement embryonnaire et postnatal normal. Néanmoins, une étude rapporte que la réduction de l'expression de *Tet1* dans les cellules ES murines par ShRNA conduit à une augmentation de la méthylation au niveau du promoteur de *Nanog* ce qui entraîne une réduction de son expression et une diminution de l'autorenouvellement des cellules ES.[105] De plus, des analyses de l'expression des gènes spécifiques de lignage et de tératomes montrent que le knock down de Tet1 par ShRNA augmente la différenciation spontanée des cellules ES vers le trophoectoderme et le mésoendoderme.[120,124,125]

En résumé, la contribution de Tet1 à la maintenance et à la différenciation des cellules ES murines nécessite d'être clarifiée.

Plusieurs équipes ont tenté de déterminer où se localisent les 5hmC dans le génome des cellules ES et où se fixe préférentiellement la protéine Tet1.

Il est à noter que l'approche classique d'étude de la méthylation par « bisulfite genomic sequencing » ne permet pas de distinguer les 5mC de ses dérivés oxydatifs (5hmC, 5caC, 5fC). Des techniques plus précises de détection des 5mC et 5hmC ont donc été développées (TLC (thin-layer chromatography) assay, spectroscopie de masse, anticorps dirigés contre les 5mC ou 5hmC, Tet-assisted bisulfite sequencing…)[106,115] mais il n'existe pas encore de consensus clair sur la méthode à choisir. Ceci peut expliquer un manque de cohérence des résultats entre les différentes études.
Globalement, à la différence des 5mC, les 5hmC sont peu retrouvées dans les régions d'hétérochromatine comme les séquences répétées mais sont principalement observées dans les régions promotrices des gènes et au niveau des séquences régulatrices distales.[101,106,124-127]

La réduction de l'expression de *Tet1* dans les cellules ES murines par une approche de RNA interférence entraîne une diminution du niveau global de 5hmC de 30 à 50%[105,123] et une diminution de 20 à 40% de 5hmC pour les gènes associés à Tet1.[101,124] Les effets sont plus modestes concernant la méthylation globale de l'ADN puisque que la perte de *Tet1* n'entraîne qu'une légère augmentation du niveau global de 5mC. Néanmoins certaines études rapportent des augmentations du niveau de 5mC après knock down de *Tet1* au niveau de certains gènes.[101,120,123,124,128] Ces résultats peuvent s'expliquer de deux façons : soit d'autres voies sont impliquées pour réguler les niveaux de 5hmC-5mC dans les cellules ES, soit l'activité de déméthylation de Tet1 ne s'exerce pas globalement sur l'ensemble du génome mais plutôt sur des loci spécifiques.

Dans les cellules ES, les promoteurs riches en îlots CpG se caractérisent par un niveau élevé de 5hmC[101,124-126,128] et par la présence de Tet1.[101,124,128] Deux catégories de gènes sur lesquels se fixe Tet1 peuvent schématiquement être décrits :[101,108,124,127,128]

- Les gènes dont l'expression dépend directement de l'absence ou de la présence de Tet1, c'est-à-dire que leur expression varie lorsqu'on inhibe Tet1 par des techniques de RNA interférence. Ils sont de deux types :
    - Les gènes réprimés par Tet1 se caractérisent par une région promotrice riche en îlots CpG, des niveaux élevés de 5hmC au niveau du site initial de transcription, une triméthylation de H3K4 (H3K4me3) et H3K27 (H3K27me3), et l'association au complexe répresseur Polycomb PRC2. Ces gènes sont essentiellement des gènes « bivalents » régulant la différenciation et le développement.

- Les gènes activés par Tet1 se caractérisent par une région promotrice riche en îlots CpG, des niveaux élevés de 5hmC au niveau des corps des gènes et une triméthylation de H3K4 et H3K36 (H3K36me3). Il s'agit plutôt de gènes de ménage.

- Les gènes dont l'expression est indépendante de l'absence ou de la présence de Tet1. Dans ce cas, leur expression n'est pas modifiée après knock-down de Tet1, suggérant que Tet1 influence l'accessibilité à la chromatine indépendamment de son activité sur la régulation transcriptionnelle. Ils sont également de deux types :
  - Les gènes réprimés se caractérisent par la marque univalente H3K27me3.
  - Les gènes activés sont associés à des niveaux élevés de H3K4me3 et H3K36me3.

Dans les cellules ES murines, il apparaît donc que Tet1 joue un rôle d'activateur mais aussi de répresseur transcriptionnel (Figure 6).

Il réprime un certain nombre de gènes, essentiellement des gènes impliqués dans la différenciation, via deux mécanismes :

- en recrutant le complexe répresseur PRC2. Il existe en effet une superposition entre le set des gènes surexprimés après knock down de *Tet1* et celui des gènes surexprimés dans les cellules inactivées pour *PRC2*. Ces données sont en faveur d'un rôle potentiel de Tet1 dans la répression liée à PRC2.[128] De plus, la capacité à se lier à la chromatine des membres du complexe PRC2 est diminuée dans les cellules inactivées pour *Tet1* suggérant un rôle de Tet1 dans le recrutement de PRC2. Bien qu'aucune interaction stable entre Tet1 et PRC2 n'ait été pour l'instant démontrée,[124,128] on peut supposer que Tet1 facilite indirectement la liaison de PRC2 à la chromatine en diminuant les niveaux de méthylation de l'ADN aux niveaux des gènes associés à PRC2 (Figure 6A).
- en recrutant directement le complexe de co-répression Sin3A.[124] Il a en effet été montré une interaction directe de ces 2 protéines ainsi qu'une superposition entre les gènes surexprimés après knock down de *Tet1* et ceux surexprimés après knock down de *Sin3A* (Figure 6B).

Durant la différenciation des cellules ES, l'expression de *Tet1* diminue, entraînant une levée d'inhibition et la transcription de ces gènes.

Par ailleurs, Tet1 exerce également la fonction d'activateur transcriptionnel pour d'autres gènes. Les effets sur l'activation de la transcription sont moins prononcés que sur la répression. Il n'existe en effet pas de corrélation directe entre les gènes réprimés après knock down de *Tet1* et ceux avec de profondes modifications de leurs niveaux de 5hmC et 5mC.[124] Tet1 semble activer l'expression de deux types de gènes :

- les gènes dits de ménage riches en îlots CpG : Tet1 empêche une hyperméthylation aberrante de leurs îlots CpG pour qu'ils restent à l'état actif aussi bien dans les cellules ES que dans les cellules plus différenciées (Figure 6C).[121]
- les gènes de pluripotence pauvres en îlots CpG : au cours de la différenciation normale, ces gènes subissent une méthylation *de novo* et sont ainsi réprimés (Figure 6D).[115,121] Tet1 les protège de la méthylation dans les cellules ES.

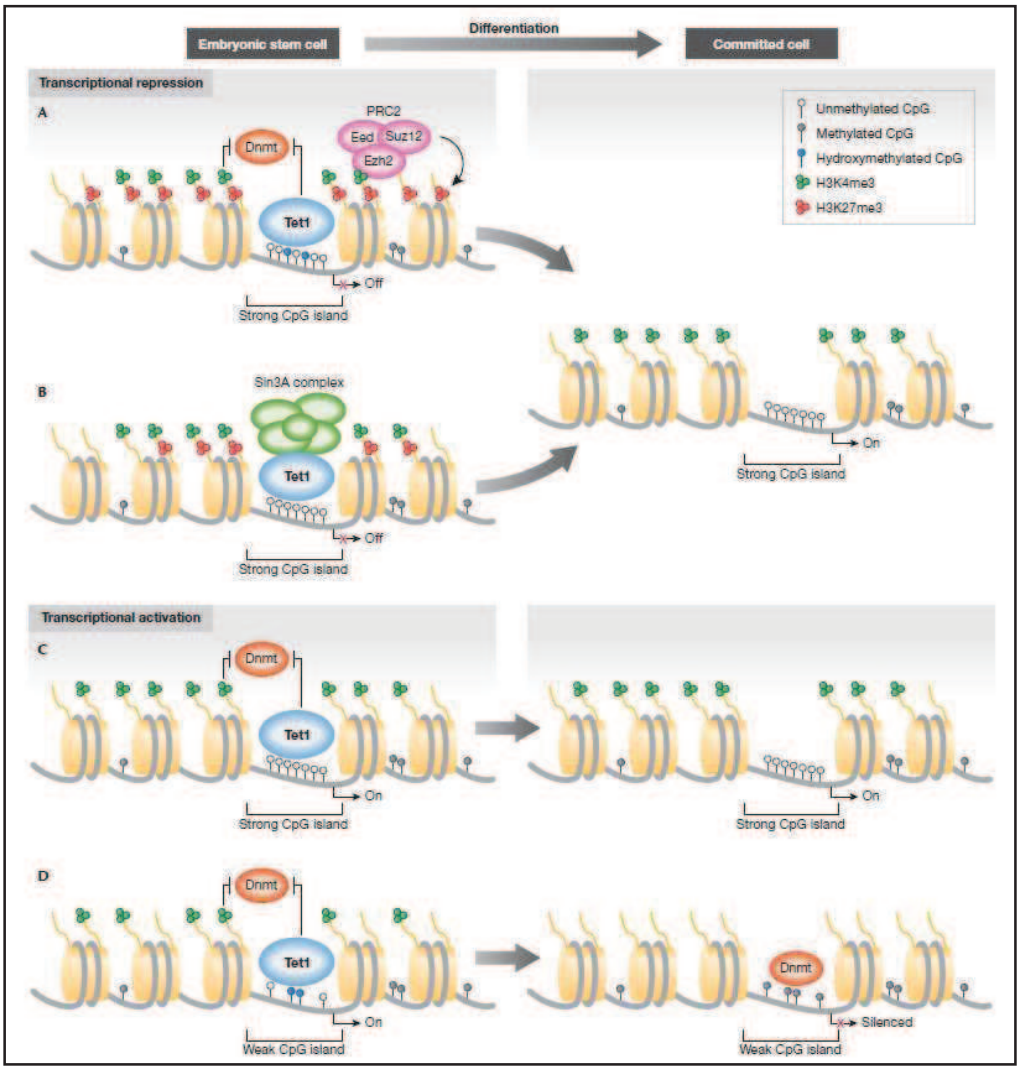


Figure 6 : Rôles potentiels de Tet1 dans la régulation transcriptionnelle des cellules ES murines.[121]

En résumé, Tet1 se lie principalement à des promoteurs riches en îlots CpG qui sont pour la plupart hypométhylés, suggérant que Tet1 joue un rôle important pour maintenir les îlots CpG à l'état déméthylé dans les cellules ES. Les îlots CpG sont en théorie protégés de la méthylation par des niveaux élevés de triméthylation de H3K4 (H3K4me3), connue pour inhiber sélectivement le recrutement des Dnmt *de novo*.[129,130] Néanmoins, la dérégulation de la méthylation de H3K4 ou l'augmentation de l'activité des Dnmt peut entraîner la méthylation aberrante des îlots CpG. Williams *et al* [121] proposent que Tet1 est à l'origine de la conversion des 5mC en 5hmC, puis un mécanisme de déméthylation active ou passive conduit à restaurer l'état déméthylé des îlots CpG. Ainsi la protéine Tet1 serait impliquée dans un processus haute fidélité de régulation de la méthylation de l'ADN en prévenant l'accumulation de méthylation aberrante des îlots CpG (Figure 7).

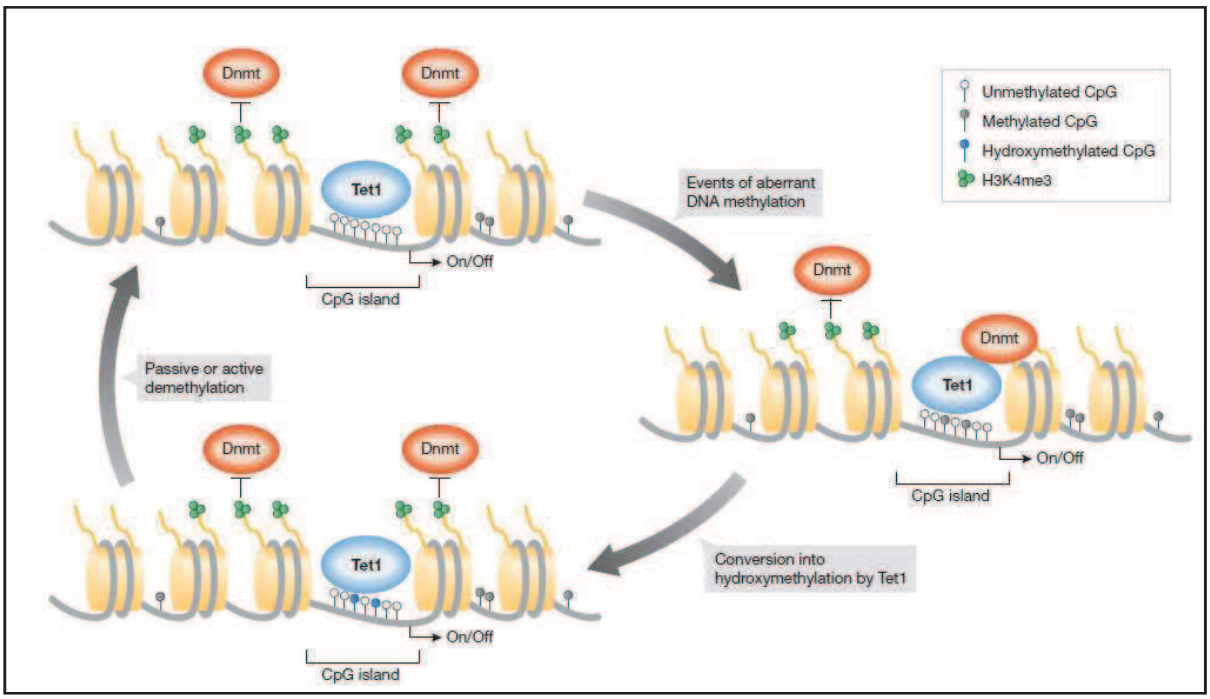


Figure 7 : Rôle de Tet1 dans la maintenance du processus de méthylation/ déméthylation des cellules ES murines.[121]

1.4.3.2. *Rôle de Tet2 dans les cellules ES murines*

Tet1 et *Tet2* sont tous deux exprimés dans les cellules ES.[120] Au cours de la différenciation des cellules ES, leur expression diminue, alors que celle de *Tet3* augmente. Inversement, l'expression de *Tet3* diminue alors que celle de *Tet1* et *Tet2* augmente lors de la reprogrammation de fibroblastes en IPS (Induced Pluripotent Stem cells). Ces données indiquent que Tet1 et Tet2 sont associés à un état de pluripotence.[120]

La diminution de l'expression de *Tet2* par RNA interférence entraîne une diminution du niveau de 5hmC d'environ 40 à 50%, ce qui est comparable à la réduction provoquée par l'inactivation de *Tet1*. La diminution combinée de l'expression de *Tet1* et *Tet2* conduit à une baisse de 75-80% du niveau de 5hmC, indiquant que Tet1 et Tet2 sont à l'origine de la plus grande partie du pool de 5hmC dans les cellules ES.[120]

Seuls 3 groupes ont tenté de préciser le rôle de Tet2 dans les cellules ES. Ito *et al*[105] ont montré que le knock down de *Tet2* ne modifiait pas la morphologie des cellules ES murines. L'analyse par RNA seq de double knock down *Tet1-Tet2* dans des ES murines indique que plusieurs gènes de pluripotence sont réprimés en l'absence des protéines Tet.[125] Enfin, l'inactivation de *Tet2* seule par ShRNA tendrait à biaiser la différenciation des cellules ES vers le neuroectoderme.[120]
Compte tenu du faible nombre d'études, il est difficile de tirer des conclusions. Ces résultats semblent suggérer que la protéine Tet2 n'est pas indispensable à la pluripotence des cellules ES mais pourrait jouer un rôle dans la différenciation normale des cellules ES.
A la différence de Tet1, aucune étude n'a pour l'instant déterminé quels étaient les gènes associés à Tet2 dans le génome des cellules ES et quel pouvait être le rôle de Tet2 (activateur ou répresseur) sur la régulation transcriptionnelle de ces gènes.

1.4.4. Rôle de Tet3 dans le zygote

Tet3 est bien exprimé dans les ovocytes et les zygotes unicellulaires, contrairement à *Tet1* et *Tet2.*[105]

Par des techniques d'immunoprécipitation utilisant des anticorps spécifiques des 5mC et 5hmC, il a été montré que le niveau de 5mC du pronucleus paternel diminue rapidement juste avant la première division[131,132] alors que le niveau de 5hmC augmente au moment de la première division.[133,134] Ce phénomène semble du à l'activité de Tet3, dont l'expression est forte dans les ovocytes et les zygotes unicellulaires mais rapidement en diminution après le stade « 2 cellules ». Des analyses en immunofluorescence confirment en effet que juste après la fécondation, Tet3 se déplace du cytoplasme zygotique vers le pronucleus paternel[135] où il y convertirait les 5mC en 5hmC (Figure 8).
Le génome maternel est quant à lui protégé de la déméthylation et conserve un haut niveau de 5mC[136] jusqu'à la première division. Son niveau de 5hmC reste bas durant les premières divisions et jusqu'au stade « blastocyste » (Figure 8).[133,134]
Après la première division, les 5mC du génome maternel et les 5hmC du génome paternel sont progressivement perdues par un phénomène de dilution liée à la réplication.[115,137] Puis

les profils de méthylation sont rétablis par l'activité des DNA méthyltransférases *de novo* Dnmt3a et Dnmt3b (Figure 8).[138]

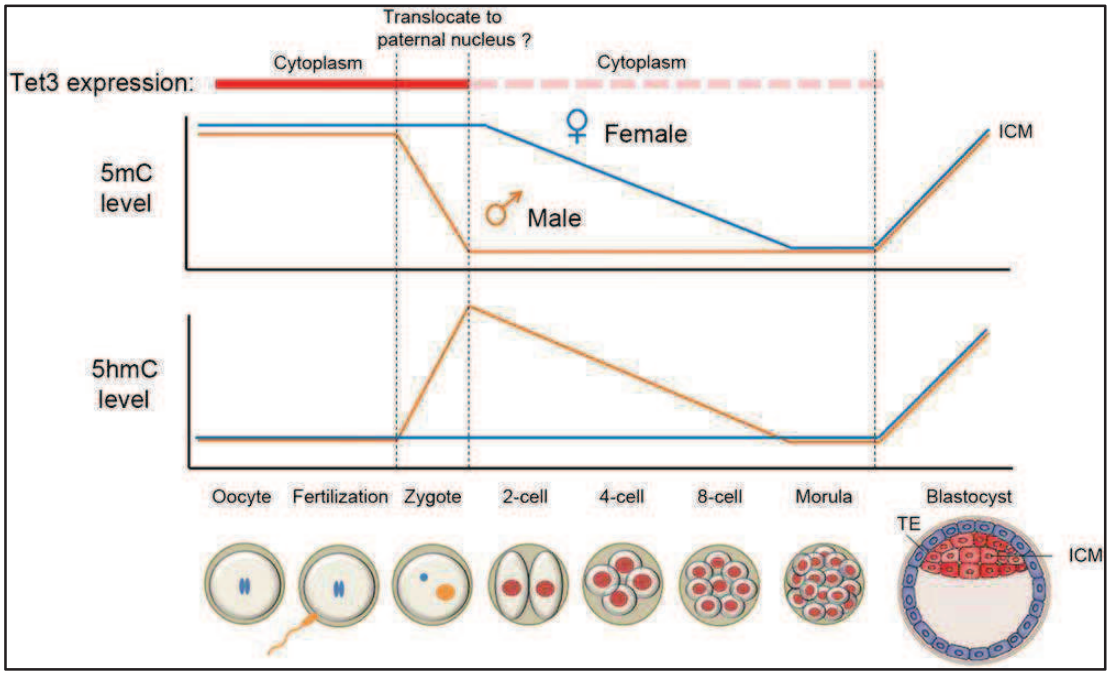


Figure 8 : Evolution des niveaux de 5mC et 5hmC des génomes maternel et paternel durant le développement pré-implantatoire.[115] TE : trophoectoderm. ICM : inner cell mass.

Afin de mieux caractériser le rôle de Tet3, le groupe de Gu *et al*[135] a développé un modèle conditionnel d'invalidation hétérozygote, la délétion homozygote étant létale au stade néonatal. L'inactivation de l'allèle maternel de *Tet3* conduit chez le zygote à une réduction de la déméthylation de loci spécifiques du génome paternel comme les transposons Line1 et certains gènes de pluripotence (*Oct4 et Nanog*).[135] L'inactivation de *Tet3* ne semble pas avoir d'effet sur la maturation des cellules germinales maternelles, sur la fécondation ou la pré-implantation. Néanmoins la délétion de *Tet3* dans des cellules primordiales germinales maternelles ou dans des ovocytes en croissance entraine après fécondation, des anomalies du développement embryonnaire. Ces résultats suggèrent que la perte du *Tet3* maternel retarde l'activation de l'allèle paternel de gènes importants pour le développement et plus globalement bloque la reprogrammation du génome paternel.[135]

Au total, Tet3 joue donc un rôle critique dans la reprogrammation épigénétique du zygote en initiant la conversion des 5mC en 5hmC.

1.4.5. Rôle de TET2 dans l'hématopoïèse

1.4.5.1. *Expression des Tet au cours de l'hématopoïèse murine*

Les 3 gènes *Tet* sont exprimés au cours de l'hématopoïèse mais à des degrés variables. De façon globale, *Tet2* est plus exprimé que *Tet1* et *Tet3* (Figure 9).

Si l'on s'intéresse plus précisément aux différents lignages, *Tet2* est bien exprimé dans les progéniteurs immatures LSK (Lin-Sca+Ckit+) ; son expression se maintient dans les progéniteurs myéloïdes ; elle reste élevée dans les monocytes mais diminue dans les granulocytes matures. *Tet2* s'exprime dans les progéniteurs lymphoïdes communs ; son expression augmente dans les précurseurs B précoces de la moelle osseuse puis diminue dans les cellules B matures. L'expression de *Tet2* diminue durant le développement précoce des progéniteurs T doubles négatifs du stade DN1 à DN4 puis son expression augmente dans les doubles positifs CD4+CD8+ et simples positifs CD4+, elle tend à diminuer dans les simples positifs CD8+ (Figure 9).[139]

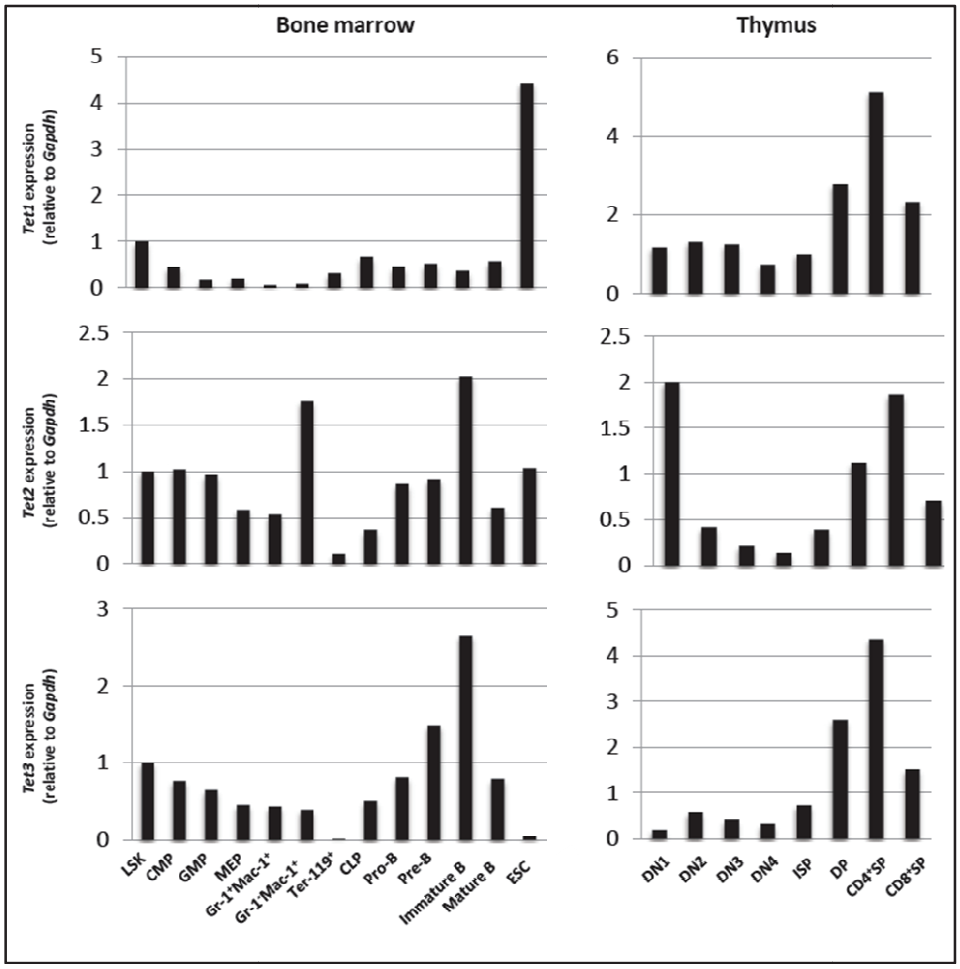


Figure 9 : Expression des membres de la famille Tet au cours de l'hématopoïèse murine selon une méthode de RT-PCR quantitative.[139] LSK : Lin-Sca+Ckit+ ; CMP : common myeloid progenitor ; GMP : granulocyte-monocyte progenitor; MEP : megakaryocyte-erythroid progenitor; CLP : common lymphoid progenitor ; ESC : embryonic stem cell ; DN : double negative ; ISP : immature simple positive ; DP : CD4+CD8+ double positive; CD4+SP : CD4+ simple positive; CD8+SP : CD8+ simple positive.

1.4.5.2. *Analyse in vitro par des approches de RNA interférence*

L'inactivation de *TET2 in vitro* par des approches de RNA interférence (siRNA ou shRNA) a permis de mieux comprendre son rôle dans l'hématopoïèse.

Le knock down de *TET2* entraîne :

- dans les progéniteurs hématopoïétiques précoces murins,[139] l'expansion et la différenciation des monocytes-macrophages en présence de G-CSF et G-MSCF.
- dans les progéniteurs hématopoïétiques précoces humains,[140] une différenciation anormale avec expansion du lignage myélomonocytaire aux dépens de la lymphopoïèse et de l'érythropoïèse.

De plus, le knock down de *Tet2* dans des cellules primaires de moelle osseuse de souris par Sh ou SiRNA conduit après culture en méthylcellulose et/ou en milieu liquide, à une augmentation du pourcentage de cellules CKit+. La perte de *Tet2* permet donc de maintenir les cellules dans un état plus immature.[54,141] Moran-Crusio *et al* ont montré également que les cellules invalidées pour *Tet2* supportaient plusieurs passages *in vitro*, suggérant un effet direct de la perte de *Tet2* sur l'autorenouvellement.[141]

1.4.5.3. *Analyse in vivo par des modèles murins d'invalidation de Tet2*

Le rôle de Tet2 au cours de la différenciation hématopoïétique a été étudié dans divers modèles murins d'invalidation de *Tet2*,[141-146] dont deux développés au laboratoire.[144]

Cinq modèles viables ont été actuellement publiés et ont permis d'analyser le rôle de Tet2 au cours de l'hématopoïèse adulte (Figure 10) :

- un allèle « gene trap » avec une cassette LacZ-GFP au niveau de l'ATG du gène dans l'exon 3[143]
- un allèle « gene trap » avec une cassette LacZ dans l'intron entre les exons 9 et 10[144]
- un allèle conditionnel Lox-Lox ciblant l'exon 3 (le premier et le plus grand exon codant)[141]
- un allèle conditionnel Lox-Lox ciblant l'exon 11 (qui code pour la moitié du domaine catalytique de l'enzyme)[144]
- un allèle conditionnel Lox-Lox ciblant les exons 8, 9 et 10[142]

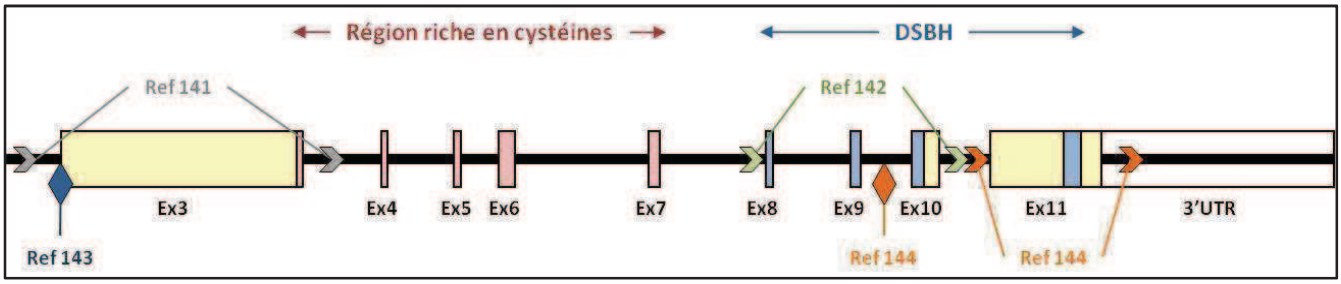


Figure 10 : Représentation de la structure du gène *Tet2* et des différentes régions ciblées par les modèles murins d'invalidation de *Tet2*. Les losanges indiquent les sites d'insertions des cassettes « gene trap » ; les flèches horizontales montrent les sites Lox. Les deux modèles développés au laboratoire sont indiqués en orange.

La perte de fonction de Tet2 est associée à une baisse du niveau global de 5hmC dans les cellules hématopoïétiques murines.[142-144]

Tous les modèles murins d'inactivation de *Tet2*[141-146] présentent globalement le même phénotype : amplification du compartiment des progéniteurs multipotents et cellules souches hématopoïétiques, augmentation des capacités d'autorenouvellement (passages des cellules *in vitro* et greffes compétitives), hématopoïèse extra-médullaire (splénique essentiellement), anomalies des différenciations myéloïde, lymphoïde B et T.
Avec une latence variable selon les modèles (8 à 20 semaines), une fraction des souris invalidées pour *Tet2* développe une maladie ressemblant à la leucémie myélomonocytaire chronique humaine (monocytose persistante, splénomégalie, dysplasie de plusieurs lignées myéloïdes). Bien que ce soit la pathologie prédominante, d'autres maladies ont été détectées comme des syndromes myélodysplasiques à prédominance érythroïde ou des syndromes myéloprolifératifs.[143]
Ces études confirment le rôle suppresseur de tumeur de Tet2 et indiquent que sa délétion est suffisante pour permettre la transformation myéloïde. Cependant la latence de développement suggère que des lésions génétiques additionnelles coopèrent probablement avec la perte de *Tet2*.

Les souris hétérozygotes pour *Tet2* développent les mêmes maladies,[141,144] suggérant un effet d'haplo-insuffisance, ce qui est cohérent avec le fait que les patients sont souvent porteurs d'une seule mutation *TET2.*

Bien que les trois gènes *Tet* soient exprimés dans les progéniteurs hématopoïétiques, la perte de *Tet2* n'entraine pas d'augmentation de la transcription de *Tet1* ou *Tet3*.[141-144] Ces données indiquent que la réduction d'une des protéines Tet est suffisante pour entraîner des changements dans le niveau de 5hmC et le développement de maladies myéloïdes. Ceci pose la question de la redondance fonctionnelle des protéines Tet et incite à explorer le rôle de chacune de ces protéines dans les cellules hématopoïétiques.

Outre les 5 modèles murins d'invalidation de *Tet2* précédemment décrits, un 6ème modèle a permis d'étudier le rôle de Tet2 au cours de l'hématopoièse fœtale. Deux groupes[145,146] ont utilisé ce modèle qui comporte un allèle « gene trap » avec une cassette LacZ située dans l'intron 2 juste en amont de l'exon 3.[147] Ces souris ont une mortalité périnatale importante et la plupart des individus ne vivent pas plus d'une semaine. La cause exacte de cette surmortalité n'est pas connue. Les auteurs ont donc essentiellement étudié l'hématopoïèse au niveau du foie fœtal. Les anomalies retrouvées au niveau du foie fœtal sont identiques à celles observées dans la moelle des souris des autres modèles d'inactivation de *Tet2*, à savoir : diminution du niveau de 5hmC, expansion des compartiments des LSK, progéniteurs multipotents et myéloïdes, augmentation de l'autorenouvellement, anomalies de différenciation myéloïde.[145,146]

1.4.5.4. *Conséquences des mutations TET2 chez les patients*

Les mutations de *TET2* observées chez les patients sont associées à une diminution de l'activité catalytique de TET2 et à un taux plus bas de 5hmC.[139,140,148] En revanche, les conséquences des mutations de *TET2* sur le profil de méthylation du génome restent à définir. Certains décrivent une signature épigénétique de type hyperméthylation avec une cinquantaine de régions différentiellement méthylées.[54] Pour d'autres, la perte de fonction de TET2 est associée une diminution globale de la méthylation.[139] Il faut noter que les cohortes analysées ne sont pas comparables (398 patients avec leucémie aiguë myéloïde au diagnostic[54] versus 88 patients avec des pathologies myéloïdes diverses (LMMC, LAM, SMP, SMD)[139]) et que les techniques d'analyse de la méthylation diffèrent entre les deux études.

Les mutations *IDH1 R132* ont été initialement rapportées chez des patients atteints de gliomes ; elles affectent plus de 70% des cas de tumeurs cérébrales de bas grade (telles que les astrocytomes) et de glioblastomes secondaires dérivant des tumeurs gliales de bas grade.[149-152] Puis des mutations d'*IDH1* mais aussi d'*IDH2* ont été décrites chez les patients atteints d'hémopathies myéloïdes : leucémies aiguës myéloïdes (LAM) *de novo* et secondaires (15 à 30% des cas),[153-156] syndromes myélodysplasiques (SMD) et syndromes myéloprolifératifs (SMP) (5% des phases chroniques et 20% des formes transformées).[154-159]

Chez les patients atteints de LAM, il a été rapporté que les mutations de *TET2* et d'*IDH1-2* sont mutuellement exclusives.[44,45,47,54] Ceci a conduit plusieurs groupes à s'intéresser au lien potentiel entre ces 2 protéines et à leur participation au processus de transformation.

Les enzymes IDH sont des enzymes dépendantes du NADP, qui catalysent la décarboxylation oxydative d'un isocitrate en α-ketoglutarate ou oxoglutarate,[150,155] ce dernier étant un des cofacteurs des enzymes de la famille TET. Les mutations *IDH1* et *IDH2* sont des mutations dites « gain de fonction ». En effet, les mutants IDH1 et IDH2 acquièrent une nouvelle fonction enzymatique : elles transforment l'α-kétoglutarate en 2-hydroxyglutarate.[153,156,160] L'hydroxyglutarate vient antagoniser l'oxoglutarate et inhibe la fonction enzymatique de TET2, conduisant à une réduction de l'hydroxyméthylation.[54,161] Par ailleurs, les mutants TET2 et les mutants IDH se caractérisent par une signature commune d'hyperméthylation.[54]

L'expression ectopique de mutants IDH *in vitro* ou le knock down de *Tet2* par ShRNA ont les mêmes effets sur la différenciation hématopoïétique, à savoir une augmentation du compartiment des progéniteurs / cellules souches et une inhibition de la différenciation myéloïde normale.[54]

Au total, les mutations *IDH1-IDH2* et la perte de *TET2* partagent un même mécanisme de transformation caractérisé par une diminution de l'hydroxyméthylation.

1.5. DNMT3A

Durant le processus de différenciation des cellules ES, la survenue de modifications épigénétiques régule les programmes transcriptionnels responsables de l'identité cellulaire.[162,163] Une des modifications épigénétiques les mieux caractérisées au cours du développement embryonnaire est la méthylation des cytosines qui contribue en partie à la perte de la pluripotence et à la spécification cellulaire.[164] Elle joue également un rôle important dans de nombreux processus cellulaires, comme le « silencing » des rétrotransposons, l'empreinte parentale, l'inactivation du X, ou encore la régulation de l'expression génique.[165]

Chez les mammifères, la méthylation des cytosines qui survient principalement au niveau des îlots CpG, provient de l'activité des DNA méthyltransférases.[166] Celles-ci sont au nombre de 3. DNMT1 agit comme une enzyme de maintenance, elle se localise au niveau de la fourche de réplication durant la phase S, où elle méthyle préférentiellement les CpG hémi- méthylés via son interaction avec Uhrf1.[167-169] DNMT3A et DNMT3B sont impliquées dans la méthylation *de novo* durant le développement.[170] Des mutations germinales du gène *DNMT3B*, situé en 20q11.2, sont observées dans le syndrome ICF (immuno-déficience combinée (I), instabilité de l'hétérochromatine paracentromérique (C) et dysmorphie faciale (F)), une maladie autosomique récessive très rare touchant moins de 100 patients dans le monde.[171]

1.5.1. Mutations du gène *DNMT3A* dans les hémopathies myéloïdes

1.5.1.1. *Description des mutations DNMT3A*

Des mutations du gène *DNMT3A*, situé en 2p23, sont retrouvées chez des patients atteints d'hémopathies myéloïdes avec des fréquences variables. Il s'agit de mutations hétérozygotes et acquises. Elles touchent environ 20% des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes (LAM)[172,173] et se localisent dans 60% des cas au niveau d'un hotspot dans l'exon 23 (R882).[172,173] Ce hospot se situe dans une région conservée de la protéine, plus précisément au niveau du domaine catalytique méthyltransférase. Les mutations *DNMT3A* sont plutôt associées au sous-type M4 ou M5 de la classification FAB,[47,173,174] à un caryotype normal et aux mutations *FLT3, IDH1, IDH2* et *NPM1*.[47,173,175] Aucune étude ne rapporte d'association entre les mutations de *TET2* et celles de *DNMT3A.* La présence de mutations *DNMT3A* est corrélée à un âge, un taux de leucocytes et un pourcentage de blastes dans la moelle osseuse plus élevés.[47,173] Au niveau pronostique, les mutations *DNMT3A* sont associées à un moins bon taux de rémission et à une moins bonne OS et EFS.[47,172,175-177]

Les mutations de *DNMT3A* sont également observées dans d'autres pathologies myéloïdes : LMMC (4%),[178] SMD (2-8%),[179-181] LAM secondaires post SMD ou post SMP (35%),[182] LAM chimio-induites (16%),[182] et SMP (10%).[183]

1.5.1.2. *Conséquences des mutations DNMT3A*

Les conséquences des mutations *DNMT3A* chez les patients ne sont pas encore claires : gain ou perte de fonction ? Le caractère hétérozygote et l'observation de mutations récurrentes sur un acide aminé sont plutôt en faveur d'un gain de fonction. Néanmoins, les études biochimiques *in vitro*[184,185] indiquent que la mutation R882H mais également d'autres mutations décrites chez les patients entraînent un défaut d'oligomérisation de la protéine DNMT3A et une diminution de son activité catalytique. Compte tenu de leur caractère hétérozygote, on pourrait donc envisager qu'il s'agisse plutôt de mutations perte de fonction par effet dominant négatif. Cependant, aucune donnée sur les conséquences fonctionnelles *in vivo* de ces mutations n'est pour l'instant disponible.

Quelques groupes ont étudié les profils de méthylation et d'expression des patients mutés pour *DNMT3A*. Ley *et al*[172] ont rapporté que la plupart des régions analysées présentent le même profil de méthylation, que les patients soient mutés pour *DNMT3A* ou non. Seule une petite fraction de régions (182) présente un niveau de méthylation moins élevé chez les patients mutés mais sans corrélation démontrée avec le niveau d'expression des gènes localisés dans ces régions. Un autre groupe[174] a identifié un total de 3878 régions différentiellement méthylées entre les patients mutés et les patients sauvages pour *DNMT3A*

mais les analyses transcriptomiques ne retrouvent des différences d'expression entre les deux groupes que sur 4% des gènes testés. Enfin, Shen *et al*[47] ont mis en évidence une corrélation entre niveau de méthylation et d'expression pour environ 70 gènes. Chez les patients, les mutations de *DNMT3A* ne semblent donc pas associées à d'importants changements dans les profils de méthylation ou d'expression génique.[47,172,174]

1.5.2. Rôle de Dnmt3a dans l'hématopoïèse

Les modèles murins d'invalidation germinale des gènes codant pour les DNA méthyltransférases indiquent que ces enzymes sont essentielles au développement embryonnaire et post natal. En effet, les souris KO *Dnmt3a*-/- meurent dans les 4 semaines suivant la naissance, tandis que les KO *Dnmt1*-/- et *Dnmt3b*-/- sont létaux au stade embryonnaire.[170,186]

Des modèles conditionnels d'invalidation utilisant un système Cre-Lox ont permis d'étudier spécifiquement le rôle de ces enzymes au cours de la différenciation hématopoïétique.

Dnmt1 est essentielle à la maintenance de la méthylation de l'ADN, à l'autorenouvellement et à la différenciation des CSH murines.[187,188] La perte de *Dnmt1* entraîne un biais de différenciation vers le lignage myéloïde en augmentant la mise en cycle des progéniteurs myéloïdes et en induisant l'expression inappropriée de gènes matures de lignage.[188] Les CSH *Dnmt1*-/- perdent la capacité à se différencier en progéniteurs lymphoïdes.[187]

En 2007, en utilisant un modèle conditionnel d'invalidation, le groupe de Tadokoro[189] a montré que *Dnmt3a* et *Dnmt3b* sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques, de façon plus importante dans les lignages B et T que dans les neutrophiles/macrophages et les cellules érythroïdes. La perte de *Dnmt3a* ou *Dnmt3b* n'affecte pas l'autorenouvellement et le potentiel de différenciation des CSH en cellules myéloïdes, lymphoïdes B et T. En revanche, la perte combinée des 2 protéines (double KO) induit une diminution de l'autorenouvellement et des capacités de reconstitution à long terme des CSH, sans impact sur leur potentiel de différenciation.

Une étude plus récente publiée en 2011 par Challen *et al* [190] a permis de préciser le rôle de Dnmt3a dans l'hématopoïèse. *Dnmt3a* semble très exprimé dans les CSH, en comparaison aux progéniteurs et aux cellules différenciées. Les CSH *Dnmt3a*-/- ne semblent pas différentes des CSH *Dnmt3a*+/+ au niveau de l'autorenouvellement et des capacités de différenciation. Cependant, en utilisant un modèle de greffes sériées, il apparaît au fur et à mesure des passages *in vivo* que les CSH *Dnmt3a*-/- ne se comportent pas de la même façon que les CSH *Dnmt3a*+/+. Le phénotype décrit ci-après est obtenu après un minimum

de 2 greffes. Il consiste en une expansion du compartiment des progéniteurs immatures (LSK) sans augmentation de la prolifération ni diminution de l'apoptose, et en une meilleure reconstitution avec un biais de différenciation vers la lignée B. Le potentiel de différenciation des CSH *Dnmt3a-/-* diminue avec les passages *in vivo* alors que le quotient d'autorenouvellement augmente. En revanche, il n'est pas détecté de différence sur le niveau global de 5mC en comparaison avec les CSH *Dnmt3a+/+*.

Les profils de méthylation des CSH *Dnmt3a-/-* montrent une hyperméthylation de 58% des régions différentiellement méthylées et une hypométhylation de 42% d'entre elles. La perte de *Dnmt3a* n'est pas associée à une diminution de l'expression de *Dnmt1* et *Dnmt3b*, cela pouvant expliquer la persistance d'une hyperméthylation de certaines régions. Les niveaux de méthylation semblent peu corrélés aux profils d'expression. Néanmoins, la perte de *Dnmt3a* est associée à une surexpression de gènes de multipotence tels que *Gata3, Runx1, Pbx1* ou *Cdkn1A* et à une diminution de l'expression de gènes importants pour la différenciation des CSH tels que *Flk2, Ikaros, Sfpi1* ou *Me2fc.*

Les cellules B dérivant des CSH *Dnmt3a-/-* ont un phénotype différent. Elles présentent une diminution de leur niveau global de 5mC ainsi qu'une hypométhylation globale des régions différentiellement méthylées. Les gènes de multipotence caractéristiques des CSH sont toujours exprimés dans les cellules B *Dnmt3a-/-.*

Au total, l'ensemble de ces résultats indique que le rôle de Dnmt3a dans les CSH est de réprimer les gènes de multipotence pour permettre la différenciation des CSH (Figure 11).

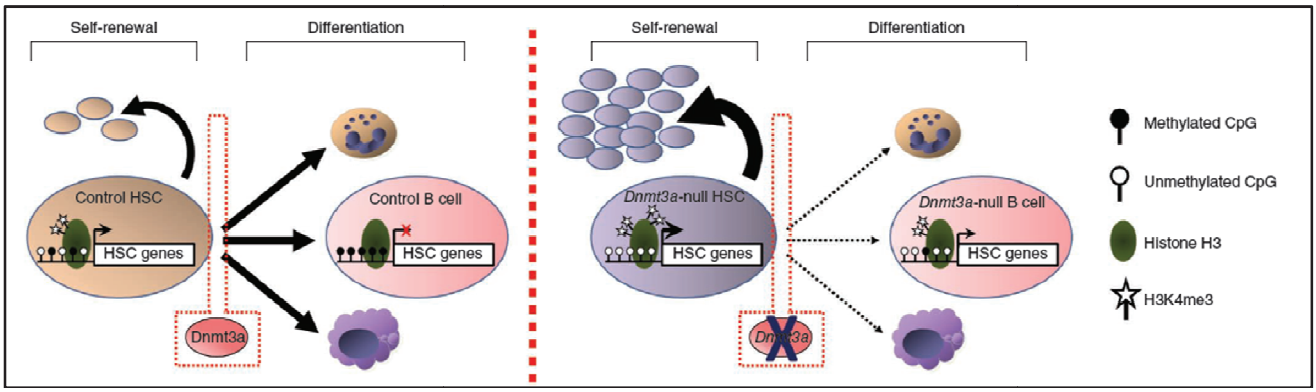


Figure 11 : Modèle pour le rôle de Dnmt3a dans les CSH murines. [190]
A gauche : contexte *Dnmt3a+/+*. Les gènes de multipotence « CSH » sont à l'état déméthylé et exprimés dans les CSH normales. Sous l'impulsion d'un signal de différenciation, Dnmt3a méthyle et réprime les gènes « CSH » permettant l'engagement vers la différenciation. Ce processus s'accompagne de la perte de H3K4me3 et de la répression des gènes « CSH » dans les cellules B.
A droite : contexte *Dnmt3a-/-*. Les gènes « CSH » ne peuvent être réprimés en l'absence de *Dnmt3a*. Le programme d'autorenouvellement reste actif conduisant à une accumulation des CSH *Dnmt3a-/-* dans la moelle osseuse. Les quelques cellules B dérivant des CSH *Dnmt3a-/-* montrent des profils de méthylation incomplets et la persistance de l'expression de gènes « CSH ».

Au cours de la différenciation des CSH, Dnmt3a régule le programme transcriptionnel par plusieurs mécanismes (Figure 12). Dnmt3a peut directement méthyler les régions promotrices de gènes de multipotence telles que *Runx1* et *Gata3*. Ce processus est associé à une perte de H4K4me3 et à la répression des gènes de « souchitude » (Figure 12,a). Dnmt3a peut indirectement réprimer des cibles indirectes telles que *Nr4a2* par son action sur *Runx1* par exemple (Figure 12,b). Enfin, l'on peut supposer que Dnmt3a réprime les gènes liés à l'autorenouvellement indépendamment de son activité enzymatique, via une interaction avec d'autres protéines ou régulateurs transcriptionnels (Figure 12,c).[191]

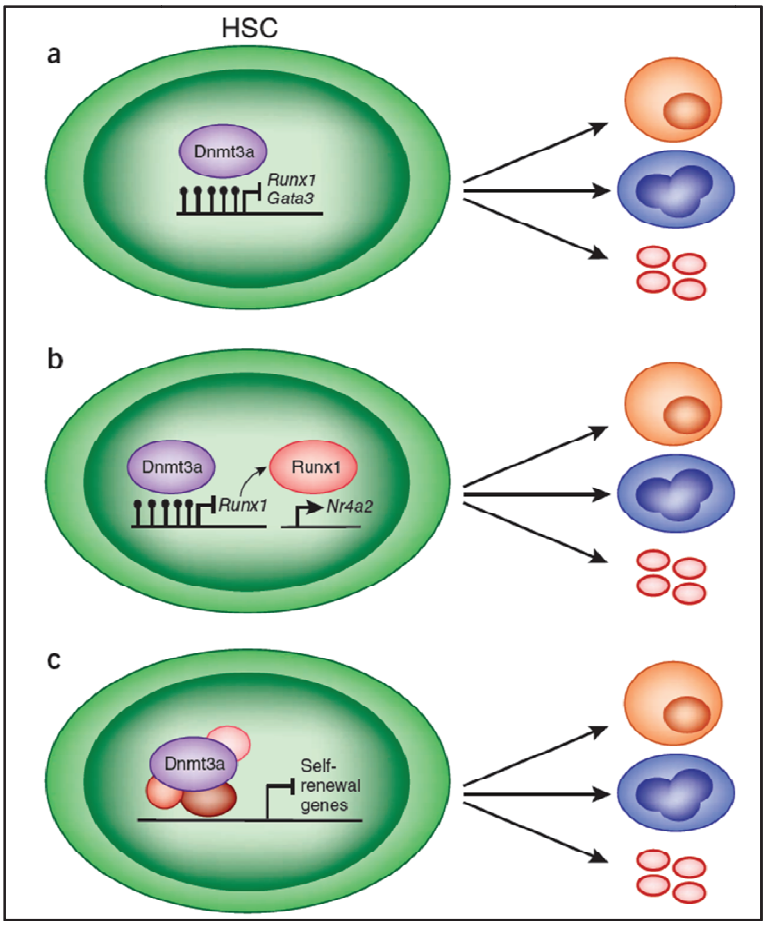


Figure 12 : Mécanismes proposés pour la répression transcriptionnelle induite par Dnmt3a lors de la différenciation hématopoiétique.[191]

1.5.3. Conséquences de la méthylation dnmt3a-dépendante sur l'expression des gènes

Les conséquences des mutations *DNMT3A* chez les patients restent à préciser. La perte de *DNMT3A* dans les souris KO semble à l'évidence insuffisante pour induire la leucémogenèse et ne résume pas la pathogenèse chez les patients mutés *DNMT3A*, indiquant que d'autres événements génétiques additionnels doivent coopérer.

De plus, il a récemment été observé que la méthylation dnmt3a-dépendante n'entraine pas uniquement la répression de gènes mais peut être associée à une activation de certaines cibles et ceci complexifie la compréhension des mécanismes de pathogenèse.
La méthylation a en effet longtemps été uniquement envisagée comme un mécanisme de répression des gènes. En particulier, beaucoup de cancers montrent un profil aberrant de méthylation, à type d' hypométhylation globale et d'hyperméthylation promoteur-spécifique. L'hypométhylation globale créerait une instabilité génétique tandis que l'hyperméthylation des promoteurs conduirait à la répression de certains gènes, en particulier des gènes suppresseurs de tumeur.[192,193] Cependant, il a été récemment montré que certains gènes activement transcrits présenteraient de hauts niveaux de méthylation au niveau du corps du gène. La méthylation de l'ADN jouerait donc un rôle dans la répression mais aussi l'activation des gènes.

Wu *et al*[194] ont étudié le rôle de Dnmt3a au cours de la neurogenèse murine en utilisant des modèles murins inactivés pour *Dnmt3a.* Leurs résultats indiquent que *Dnmt3a* est exprimé dans les cellules souches neuronales et est indispensable à la différenciation des cellules souches neuronales en neurones.
Dnmt3a est associée à deux types de cibles :

- des gènes de multipotence importants pour les cellules souches neuronales, pauvres en îlots CpG et avec un faible niveau d'H3K4me3. Dnmt3a est dans ce cas observée principalement au niveau des régions promotrices et conduit à la répression de ces gènes.
- des gènes clés pour la différenciation neuronale riches en îlots CpG et associés à la marque H3K4me3. Dnmt3a ne se localise pas au niveau des promoteurs mais plutôt dans les régions inter et/ou intragéniques proches des îlots CpG. Cette méthylation « hors promoteurs » est associée à une diminution des niveaux de H3K27me3 et à une activation génique. La diminution de H3K27me3 s'explique par le fait que Dnmt3a antagonise l'action du complexe PRC2 en l'empêchant de se fixer à la chromatine.

Ces données indiquent que Dnmt3a n'est pas seulement impliquée dans la répression transcriptionnelle mais est aussi requise pour favoriser l'expression de facteurs clés pour la neurogenèse postnatale. Au total, Dnmt3a réprime l'autorenouvellement des cellules souches neuronales en méthylant les promoteurs de certains gènes mais favorise aussi l'expression de cibles importantes pour la différenciation neuronale en antagonisant le complexe PRC2 via la méthylation « non promoteur » dépendante.

2. OBJECTIFS

Les mutations de *TET2* sont observées dans diverses hémopathies myéloïdes. Dans les syndromes myéloprolifératifs (SMP), en particulier les polyglobulies primitives, elles peuvent coexister avec les mutations de *JAK2*.[28] Nous avons donc étudié le statut de *TET2* et *JAK2* dans une série de leucémies aiguës myéloïdes secondaires post SMP afin d'établir leurs rôles respectifs au cours de la transformation aiguë (cf article 1).

De plus, certains patients atteints d'hémopathies myéloïdes et mutés pour *TET2* avaient développé de façon concomitante des pathologies lymphomateuses.[34] Nous avons donc analysé le statut mutationnel de *TET2* chez les patients avec hémopathie lymphoïde et tenté de mieux comprendre le rôle de TET2 au cours de la lymphomagenèse (cf article 2).

Les lymphomes T, en particulier les lymphomes T angio-immunoblastiques (AITL) et les lymphomes T périphériques non spécifiés (PTCL, NOS) sont encore mal caractérisés sur le plan moléculaire. Pour cette raison, nous avons plus particulièrement étudié le statut mutationnel de *TET2* dans ces deux entités de lymphomes T périphériques (cf articles 2 et 3).

Enfin, comme pour *TET2*, des mutations du gène *DNMT3A* ont été décrites dans diverses hémopathies myéloïdes. De plus, les DNA méthyltransférases agissent en amont des protéines TET en méthylant les cytosines. Au regard de la fonction de cette protéine et compte tenu de la présence de mutations du gène *DNMT3A* dans les hémopathies myéloïdes, nous nous sommes intéressés au statut de *DNMT3A* dans les hémopathies lymphoïdes (cf article 4).

3. RESULTATS

3.1. Article 1 : Analyses of *TET2* mutations in post myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias

Les syndromes myéloprolifératifs non BCR-ABL se caractérisent par une fréquence élevée de mutations *JAK2*V617F. Elles sont en effet observées dans plus de 90% des cas de polyglobulie de Vaquez et chez 50 à 60% des patients atteints de thrombocytémie essentielle ou myélofibrose primitive.[20] Néanmoins, chez certains patients, la mutation *JAK2* initialement détectée lors du diagnostic du SMP n'est plus retrouvée lors de la transformation en leucémie aiguë,[24] suggérant qu'un autre évènement oncogénique a précédé la survenue de la mutation *JAK2* dans le développement du SMP. Les mutations du gène *TET2* qui sont également présentes chez une fraction de patients atteints de SMP, pourraient constituer un tel évènement.

Afin de mieux comprendre le rôle des mutations de *TET2* et *JAK2* au cours de l'acutisation des SMP, nous avons étudié leur statut mutationnel dans une série de 19 échantillons des LAM secondaires post SMP.

Les mutations *JAK2*V617F et *TET2* ont été respectivement détectées chez 52% (10/19) et 32% (6/19) des patients. Dans les blastes leucémiques, nous avons observé toutes les combinaisons possibles entre les mutations des gènes *JAK2* et *TET2* (*JAK2*V617F-*TET2* muté, *JAK2* sauvage-*TET2* muté, *JAK2*V617F-*TET2* sauvage, *JAK2* sauvage-*TET2* sauvage) cela indiquant qu'il n'y a pas un mode univoque de transformation.

Parmi les cas mutés pour *TET2*, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un patient (patient n°4 dans l'article) atteint d'une thrombocytémie essentielle (TE) *JAK2*V617F positive, pour lequel nous disposions de matériel en phases chronique et blastique. Lors de la transformation en LAM-M1 survenue deux ans après le diagnostic de TE, la mutation *JAK2*V617F n'était plus détectée alors que la mutation *TET2* (Gln603X) était toujours présente. Grâce à l'étude de tissu germinal, il avait été montré que la mutation *TET2* était bien acquise (données non publiées). L'analyse caryotypique montrait comme seule anomalie structurelle une translocation t(10;16)(q22;q22). La localisation du point de cassure en 16q22 suggérait l'implication du gène *CBFβ* dans la translocation, qui a été confirmée par hybridation *in situ* fluorescente (FISH). Par RT-PCR, il a été montré que le partenaire de *CBFβ* n'était pas le gène *MYH1, CBFβ* étant en effet connu pour être fusionné au gène *MYH11* dans les inversions du chromosome 16 [inv(16)(p13q22)] dans les LAM-M4 à éosinophiles.

Ces résultats nous ont permis de confirmer que chez ce patient, la mutation de *TET2* survient avant celle de *JAK2* et que ces deux oncogènes coopèrent lors de la phase chronique. Lors de la transformation aiguë, le clone présent semble dériver d'une cellule *JAK2* sauvage et *TET2* coopère alors avec d'autres évènements génétiques, tels que la nouvelle fusion *CBFβ* (Figure 13).

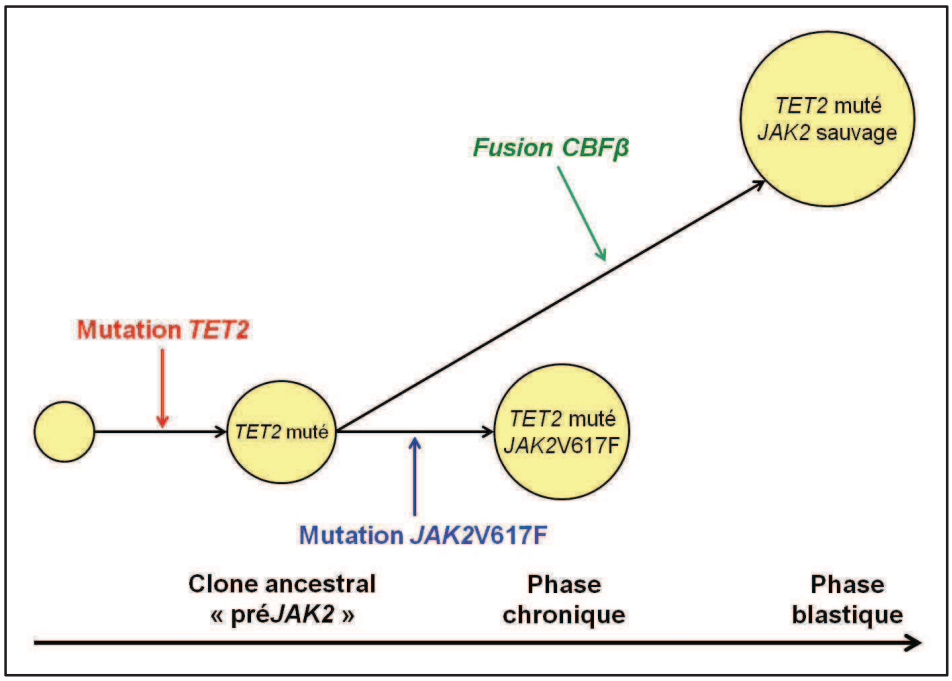


Figure 13 : Représentation schématique de l'évolution du SMP du patient 4.

Chez certains patients, les anomalies de *TET2* peuvent donc précéder les mutations de *JAK2* dans l'histoire naturelle de la maladie.[31,48] A l'inverse, d'autres études ont mis en évidence que les mutations de *TET2* pouvaient être acquises au moment de l'acutisation du SMP et donc apparaissaient après les mutations de *JAK2*.[36,195-197] En résumé il apparaît que les mutations de *TET2* prédisposent à ou accélèrent l'évolution des SMP *JAK2* mutés.

Analyses of *TET2* mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias

Leukemia (2010) **24,** 201–203; doi:10.1038/leu.2009.169; published online 27 August 2009

Classic myeloproliferative neoplasms (MPN) include essential thrombocythemia, polycythemia vera and primitive myelofibrosis.[1] These diseases are characterized by an over production of myeloid cells and may transform into acute myeloblastic leukemia (AML). An acquired point mutation that leads to the expression of a constitutively active form of the Janus kinase 2 (JAK2) tyrosine kinase, *JAK2V617F*, is observed in almost all polycythemia vera cases, and in 50–60% of essential thrombocythemia and primitive myelofibrosis. In experimental models, *JAK2V617F* recapitulates most of the features of MPN, establishing its essential role in the clinical phenotype of the diseases. It is, however, unclear how a single mutation gives rise to three related but distinct disorders. Moreover, when AML develops in a patient with a *JAK2V617F*-positive myeloproliferative neoplasm, the fully transformed clone is often *JAK2V617F* negative.[2] These and other observations suggested that, in some patients, another unknown mutation has preceded the *JAK2V617F* mutation in the development of MPN.[3] Recent publications have reported acquired mutations of the *TET2* gene in various hematopoietic malignancies.[4] The most frequent type of

Table 1 Clinical, cytogenetic and genetic data

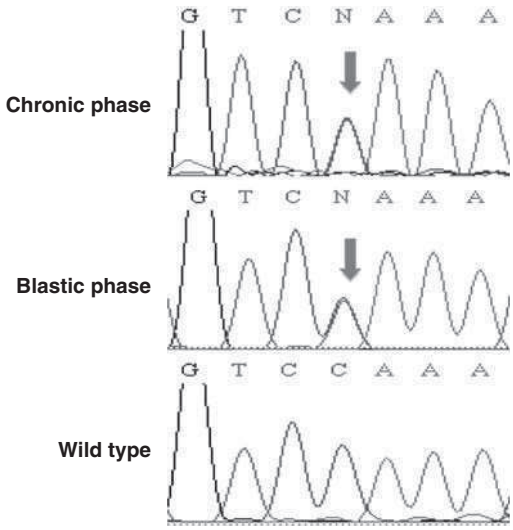
	Sex	*MPN*	*Age (diagnosis of MPN (y))*	*Duration of chronic Phase*	*Treat-ment*	*Karyotype*[a]	*TET2*[a]	*JAK2*[a]	*Outcome*[b]
1	M	PMF	66[c]	un	None	47,XY,del(1)(p32p36),+8[1]/47,sl,del(5)(q31q33–34)[1]/47,sdl1,del(17)(p11)[3]/47,sl2,i(5)(p10)[cp4]/46,XY[1]bm	mut	wt	D(3m)
2	F	PV	47	16y	HU, PB	47∼48,XX,−9[5],add(19)(p13)[3],del(20)(q11q13)[5],+2∼3mar[cp5]bm	mut	mut	A(1m)
3	F	PV	58	11y	HU, PB	45,XX,add(4)(q?),add(5)(q?14),−7,add(9)(p13)[6]/46,XX,del(5)(q13q33),add(22)(p10)[2]/46,XX[5]pb	mut[e]	mut[d]	un
4	F	ET	53	2y	None	46,XX,t(10;16)(q22;q23)[29]bm	mut[e]	wt[d]	D(1m)
5	F	ET	63	16y	HU	45,XX,t(2;13)(q35∼37,q11∼13),−5,−7,add(17)(p11),+r[2]/46,XX[38]bm	mut	mut	D(1y)
6	F	ET	53	13y	HU	46,XX,add(19)(q13),add(21)(q22)[12]/46,idem,add(3)(q2?2)[4]/46,XX[8]bm	mut	mut	D(5m)
7	M	ET	56	7y	HU	46,XY,r(7)[10] bm	wt	wt	D(4m)
8	F	PMF	59[c]	un	None	46,XX,t(6;14)(q22;q23),del(20)(q1?2)[cp20]pb	wt	mut	A(3y)
9	M	PV	38	19y	HU	48,XY,+del(1)(p31p36),+8[5]/46,XY[15] bm	wt	mut	D(1m)
10	M	PMF	55	7y	HU, SM	47,XY,+8[18]/46,XY[2]bm	wt	mut	D(2m)
11	M	ET	64	4y	HU, PB	45,X,−Y[1]/41,X,−Y,−5,dic(14;17)(5pter-5p11::17?q21-cen-17p11::5q?14-5q?23::21q21–21q22::14p11-cen-14qter),der(16)t(16;20)(p11;q11),der(18).ish ?dic(18;20)(q23;q12),−20,der(21)trp(21)(q11q22) t(17;21)(?;q22)[5]/41,idem,der(16)t(16;20)(p11;q11)del(16)(q21)[14]bm	wt	wt	D(5d)
12	F	PV	38	11y	PB	46,XX,dup(1)(q21q42),t(6;16)(p21;q22–23),dic(1;9)(p11;q34)[2]/46,idem,add(18)(q21)[18]bm	wt	mut	D(22m)
13	F	PMF	50	17y	HU	46,XX,t(12;17)(q24;q11)[19]/46,XX[1]pb	wt	wt	un
14	M	PV	32	14y	HU, PB	45–46,XY,del(5)(q13q35),del(7)(q22q33),−13,add(17)(p11),−20,+2mar[cp11]bm	wt	mut	D(9m)
15	M	PV	53	14y	PB	44–47,XY,add(1)(q21),−2,der(5)t(5;12)(q13;q11),−7,−12,add(8)(q24),+3mar[cp22]bm	wt	wt	A(1m)
16	M	ET	60	17y	HU	46,X,t(Y;14)(q12;q24),del(5)(q13q32),add(7)(q21),−19,+mar[6]/43,XY,−3,del(5q13q32),add(7)(q21),der(13)t(3;13)(q12;p11),i(18)(q10),−19[5]/46,XY[4]bm	wt	wt	D(1m)
17	F	PV	49	7y	PB	46,XX,add(5)(q31),add(6)(q24),del(7)(p11),add(8)(p12,add(17)(p13),del(20)(q12)[10]/46,XX[10]bm	wt	wt	D(7d)
18	F	PV	37	14y	HU, PB	46,XX,del(5)(q13q34),der(1;18)(q10;q10)[12]bm	wt	mut	un
19	M	PMF	56	5y	HU	46,XY,t(3;3)(q26;q21),del(13)(q14q22)[7]bm	wt	wt	D(2m)

Abbreviations: A, alive; AML, acute myeloblastic leukemia; bm, bone marrow; d, days; D, dead; ET, essential thrombocythemia; HU, hydroxyurea; m, months; MPN, myeloproliferative neoplasms; mut, mutated; pb, peripheral blood; PB, pipobroman; PMF, primitive myelofibrosis; PV, polycythemia vera; SM, splenectomy; un, unknown; wt, wild type; y, years.
[a]Karyotype, *TET2* and *JAK2* analyses were performed at AML phase.
[b]Time after the diagnosis of AML.
[c]These patients were seen for the first time at the AML phase. The assumption of previous PMF is based on signs of myelofibrosis at the time of AML.
[d]*JAK2V617F* was shown to be present at chronic phase.
[e]The *TET2* mutation was present at chronic phase.

a

Patients	Consequences
1	p.Ile1873Thr
2	p.Phe760fs
3	p.His762fs
4	p.Gln803X
5	p.Arg1465X
6	p.[Lys959fs+Arg1366His]

b



c

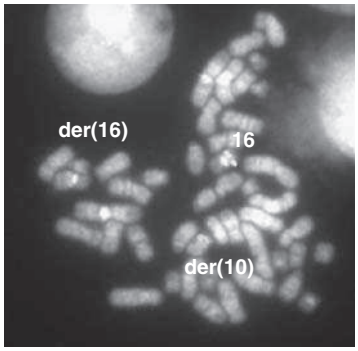


Figure 1 Molecular and cytogenetic analyses of patients. (**a**) Consequences of *TET2* variations in secondary AML (sAML) patients. (**b**) Traces of *TET2* sequences obtained from the cDNA of patient 4 at chronic and blastic phases. The same variation is observed at both phases and is indicated by an arrow. Wild-type sequences are shown for comparison purposes. (**c**) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analyses of the t(10;16)(q22;q22) translocation observed in blast metaphasic chromosome using the Vysis *CBFB* break apart probe (Abbott, Rungis, France). The red (centromeric) signal remains on the derivative chromosome 16 and the green (telomeric) signal is translocated to the derivative chromosome 10. The probes closely bracket the *CBFB* gene.

variation affecting *TET2* interrupts the open reading frame of the gene. In MPN, *TET2* mutations were observed in both *JAK2V617F*-positive and -negative patients and in both *JAK2V617F*-positive and -negative clones in individual patients.[5]

To investigate whether *TET2* mutations could represent a pre*JAK2V617F* event predisposing to the development of AML, we recruited a series of secondary AMLs (sAMLs) derived from MPN patients on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. All patients gave informed consent according to the Helsinki declaration. DNA was available for 19 samples, and it was analyzed for the presence of *TET2* and *JAK2V617F* mutations as described.[5] *JAK2V617F* mutations were observed in the majority of sAMLs (10 of 19; Table 1). An investigation of the coding sequence of the *TET2* gene identified seven variations in six samples. These were frame shift ($n=3$), nonsense ($n=2$) and missense ($n=2$) variations. The results are summarized Table 1 and Figure 1a. It is not known whether the Arg1366His variation is acquired, but it affects a conserved amino acid in an evolutionarily conserved region of the protein (data not shown), and is therefore expected to have functional consequences.[5,6] An Ile1873Thr change has already been reported as acquired. It is noteworthy that all possible combinations between the wild-type and mutated form of the *JAK2* and *TET2* genes were observed in sAML samples. These results show that sAML may arise from MPNs in the presence or absence of *TET2* mutations.

We were particularly interested in patient 4, for whom chronic phase cDNA was available. Molecular analyses of this patient have already been reported as patient BO-04.[7] She suffered from essential thrombocythemia and the *JAK2V617F* mutation was present only in a fraction of neutrophils. At the transformation phase, the blasts were devoid of the *JAK2V617F* mutation,[7] but a C→T variation was observed resulting in the creation of a stop codon (p.Gln803X, Figures 1a and b). The identified *TET2* mutation was searched in the cDNA obtained from chronic phase peripheral blood cells. As shown in Figure 1b, the *TET2* mutation was already present in the chronic phase sample, and the ratio between wild-type and mutated nucleotide was roughly similar between the two phases. These data indicated that, although *JAK2V617F* had been observed in a minority of myeloid cells, *TET2* mutations were present in the majority of blood cells. Unfortunately, no material from neutrophils at the chronic phase was available, precluding any experimental confirmation that *TET2* and *JAK2* mutations had been present in the same cells. Nevertheless, our data strongly suggest that in patient 4, *TET2*-mutated AML derived from *TET2*-mutated *JAK2* wild-type cells was present during the chronic phase.

The karyotype was not determined during the chronic phase, but an isolated t(10;16)(q22;q22) was observed at the blastic phase. The location of the break point on chromosome 16 suggested the involvement of the *CBFB* gene in the translocation. *CBFB* is located on human chromosome 16, band q22, and is fused to *MYH11* in inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22) observed in AML.[8] Fluorescence *in situ* hybridization on metaphase chromosomes from blasts of patient 4 demonstrated the direct involvement of *CBFB* in t(10;16) (Figure 1c), whereas reverse transcription PCR analyses aimed at detecting that the *CBFB–MYH11* fusion was negative (data not shown). These results suggest that a novel *CBFB* fusion might have cooperated with the *TET2* mutation to drive the development of AML in patient 4.

Taken together, our data indicate that *TET2* mutations are not observed in all cases of *JAK2V617F*-negative AML that

develops from MPN, but cooperate with other mutations to induce AML independently of *JAK2V617F*. A detailed analysis of a larger series is required to determine whether the example of patient 4 is paradigmatic.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, INCa, the Fondation de France and the Ligue Nationale Contre le Cancer. We thank William Vainchenker for critical reading of the manuscript.

L Couronné[1], E Lippert[2], J Andrieux[3], O Kosmider[4,5], I Radford-Weiss[6], D Penther[7], N Dastugue[8], F Mugneret[9], M Lafage[10], N Gachard[11], N Nadal[12], OA Bernard[1] and F Nguyen-Khac[13] on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique

[1]*INSERM E210, Hôpital Necker-Enfants Malades; Université René Descartes, Paris, France;*
[2]*Laboratoire de Cytogénétique, CHU, Bordeaux, France;*
[3]*Laboratoire de Génétique Médicale, CHU, Lille, France;*
[4]*Service d'Hématologie Biologique, CHU Cochin, Paris, France;*
[5]*Université René Descartes, Paris, France;*
[6]*Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France;*
[7]*Génétique Oncologique, Centre H Becquerel, Rouen, France;*
[8]*Génétique des Hémopathies, CHU, Toulouse, France;*
[9]*Laboratoire de Cytogénétique, CHU, Dijon, France;*
[10]*Laboratoire de Cytogénétique, CHU La Timone, Marseille, France;*
[11]*Laboratoire de Cytogénétique, CHU, Limoges, France;*
[12]*Laboratoire de Cytogénétique, CHU, St-Etienne, France and*
[13]*Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière; INSERM, U872; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France*
E-mail: florence.nguyen@psl.aphp.fr

References

1 Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008; **22**: 14–22.
2 Kilpivaara O, Levine RL. JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: discovery and science. *Leukemia* 2008; **22**: 1813–1817.
3 Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; **22**: 1841–1848.
4 Mullighan CG. TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies. *Nat Genet* 2009; **41**: 766–767.
5 Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009; **360**: 2289–2301.
6 Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; **324**: 930–935.
7 Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E *et al.* Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; **110**: 375–379.
8 Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP. Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFB/PEBP2B-MHY11. *Oncogene* 2004; **23**: 4297–4307.

Characterizing chromosomal break points of t(12;21)[*ETV6–RUNX1*]-positive leukaemia using multiple tiling PCR on whole-genome-amplified DNA

Leukemia (2010) **24,** 203–205; doi:10.1038/leu.2009.170; published online 27 August 2009

Childhood acute lymphoblastic leukaemia is frequently initiated prenatally with a subsequent latent period of several years.[1] The most common subtype (20% of all cases) harbours the t(12;21)(p13;q22)[*ETV6–RUNX1*] translocation.[2] Clone-specific *ETV6–RUNX1* fusion primers have allowed the mapping of parts of the natural history of this acute lymphoblastic leukaemia subset, including back tracking to the neonatal period.[3,4] Although other markers have been used, the *ETV6–RUNX1* translocation remains paramount in studies of the natural history of common childhood acute lymphoblastic leukaemia because of its relatively high incidence and its leukaemia specificity as opposed to, for example, antigen receptor markers.[5] The clone-specific *ETV6–RUNX1* break points have mainly been identified by multiplex PCR or by long-distance inverse PCR techniques.[3,4,6,7] However, because of the insufficient quantity and quality of diagnostic DNA and the spread of potential break points over almost 200 kb, these approaches may frequently fail, and thus hamper the exploration of *ETV6–RUNX1*-positive cases.

Whole-genome amplification (WGA) methods have been developed to overcome the quantity of DNA as a limiting factor in molecular genetics. Accordingly, we explored the usefulness of WGA in combination with a multiple tiling PCR setup on three potential DNA sources for the identification of *ETV6–RUNX1* chromosomal break points.

Six *ETV6–RUNX1*-positive cases, for which we had been unable to map the chromosomal break points of the translocation by conventional multiplex PCR or long-distance inverse PCR were selected for this study. The archival sources of DNA were the following: (A) Genomic DNA from mononuclear cells isolated by Ficoll density centrifugation from peripheral blood or bone marrow, purified using a standard SDS/proteinase K/phenol extraction method at the time of diagnosis. (B) Glass slides with alcohol-fixated, May–Grünwald–Giemsa-stained diagnostic bone marrow aspirate smears. The cells were scraped off the slides, and DNA was extracted using NucleoSpin Tissue Protocol (Macherey-Nagel, Düren, Germany), yielding on an average 100 ng DNA per slide. (C) Finally, DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) material was extracted essentially as described earlier[8] from three 50 μm section cuts. The DNA yield was between 2 and 10 ng.

3.2. Article 2 : TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis

Les mutations de *TET2* sont observées dans des pathologies myéloïdes diverses et semblent chez certains patients, cibler la cellule souche hématopoïétique.[31] De plus, ces mutations sont associées à une diminution du niveau global de 5hmC,[139] suggérant que la perte de fonction de TET2 et donc l'altération des profils d'hydroxyméthylation dérégule des facteurs clés pour l'hématopoïèse et participe ainsi au processus de transformation tumorale.

3.2.1. L'inactivation de *Tet2* entraîne des anomalies de l'hématopoïèse chez la souris

Afin de comprendre le rôle de Tet2 dans l'hématopoïèse normale et pathologique, nous avons développé au laboratoire deux modèles murins d'inactivation de *Tet2* : un modèle d'invalidation germinale « gene trap » dans lequel une cassette LacZ est insérée au niveau de l'intron entre les exons 9 et 10 et un modèle d'invalidation conditionnel basé sur un système Mx1-Cre Lox qui aboutit à l'excision de l'exon 11.

Ces deux modèles conduisent à l'inactivation du domaine catalytique de Tet2 et à une diminution du niveau global de 5hmC.

Le phénotype est quasi identique dans les 2 modèles. Les souris inactivées pour *Tet2* présentent une amplification du compartiment des cellules souches LSK et des progéniteurs CMP et MEP. Les cellules de moelle osseuse *Tet2-/-* ont une capacité augmentée à former des colonies en méthylcellulose et présentent un avantage compétitif par rapport aux cellules sauvages dans des expériences de greffes compétitives. Tet2 semble donc contrôler l'homéostasie du système hématopoïétique.

Les souris *Tet2-/-* montrent également des anomalies de différenciation des lignées myéloïde, consistant en une amplification du compartiment myélomonocytique Mac+Gr+, et érythroïde avec augmentation des proérythroblastes CD71+Ter119-.

Une fraction de ces souris développe, à partir de l'âge de 6 mois, une hémopathie maligne ressemblant à la leucémie myélomonocytaire chronique humaine et associant hyperleucocytose, anémie, thrombopénie et hépatosplénomégalie. Une hyperplasie myéloïde et erythroïde ainsi que l'accumulation d'une population anormale myélomonocytique Mac+ Gr+ sont observées dans la moelle osseuse et la rate. La greffe de ces cellules anormales dans des souris receveuses conduit au développement de la même maladie et au décès rapide des individus transplantés.

Outre les anomalies affectant les lignages myéloïde et érythroïde, les souris *Tet2-/-* présentent également des anomalies de différenciation des cellules B et T. En effet, au niveau du thymus, la population des progéniteurs DN CD4-CD8- est augmentée par rapport aux contrôles, avec en particulier une surreprésentation des progéniteurs les plus immatures, les DN1. En revanche, il ne semble pas y avoir d'anomalie quantitative ou qualitative des lymphocytes T matures CD4+ ou CD8+ dans les autres organes hématopoïétiques. Avec une diminution dans la moelle osseuse des progéniteurs pro- et pré-B, le lignage B semble également altéré.

3.2.2. L'inactivation de *TET2* constitue un événement récurrent durant la lymphomagenèse humaine

Au regard des anomalies de différenciation lymphoïde observées dans les souris inactivées pour *Tet2* et compte tenu de la présence concomitante d'un lymphome et d'une hémopathie myéloïde chez certains patients mutés pour *TET2*,[34] nous nous sommes intéressés au statut mutationnel de *TET2* dans une série de lymphoproliférations B et T.

Nous avons analysé l'ADN extrait de biopsie ganglionnaire ou de sang de 301 patients atteints d'hémopathies lymphoïdes B et 177 patients atteints d'hémopathies lymphoïdes T. Nous avons considéré comme des mutations les variations non-sens, les insertions / délétions et les variations faux-sens affectant des acides aminés situés dans les régions conservées de la protéine au cours de l'évolution. Dans certains cas, le caractère somatique des mutations a pu être établi par l'analyse d'un échantillon non tumoral du patient.

Nous avons observé des mutations de *TET2* dans 2,0% (6/301) des hémopathies lymphoïdes B étudiées, 5 lymphomes B diffus à grandes cellules et 1 lymphome folliculaire. Des mutations de *TET*2 sont observées chez 11,9% (21/177) des patients atteints d'hémopathies lymphoïdes T, avec deux sous-types histologiques particulièrement représentés : le lymphome T angio-immunoblastique (AITL) (33%) et le lymphome T périphérique non spécifié (PTCL, NOS) (20%). Les mutations identifiées sont principalement de petites insertions ou délétions, provoquant des décalages du cadre de lecture et des mutations non-sens, ce qui correspond aux types de mutations déjà décrits dans les hémopathies myéloïdes.

Pour 13 des patients mutés pour *TET2*, nous disposions d'ADN non tumoral. Dans 8 cas, la mutation de *TET2* était soit absente, soit présente à un très faible niveau, confirmant son caractère acquis. Dans 5 cas, la mutation de *TET2* était observée dans des échantillons sanguins ou de cytaphérèse, malgré l'absence de cellules tumorales circulantes. Deux hypothèses peuvent rendre compte de ces résultats : soit la mutation de *TET2* est présente

au niveau germinal, soit elle est acquise très précocement au niveau d'un progéniteur hématopoïétique et peut ainsi être retrouvée dans les 2 compartiments, lymphoïde et myéloïde.

Chez 3 patients pour lesquels des cellules viables étaient disponibles, nous avons pu analyser des colonies cellulaires obtenues *in vitro* à partir d'une cellule progénitrice CD34+. Les mutations de *TET2* observées dans les cellules lymphomateuses étaient également présentes dans une fraction des cellules hématopoïétiques immatures, capables de se différencier vers les lignées myéloïdes.

Enfin, par une analyse de la totalité de la séquence codante (exome sequencing) nous avons identifié dans les cellules de lymphome du patient 27, sept nouvelles mutations touchant d'autres gènes que *TET2*. Trois de ces sept mutations étaient également observées en association avec une des mutations de *TET2* dans les colonies obtenues *in vitro* à partir des progéniteurs CD34+.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats montre que l'inactivation *TET2* peut survenir dans une cellule très immature, voire une cellule souche hématopoïétique et conduit alors à des anomalies de l'homéostasie du système hématopoïétique avec une amplification du compartiment des cellules souches / progéniteurs. Néanmoins, les anomalies de *TET2* n'entraînent pas, à elles seules, la transformation cellulaire mais nécessitent, lors du processus de tumorigenèse, la coopération d'autres événements oncogéniques, qui sont responsables du phénotype myéloïde ou lymphoïde de la maladie (Figure 14).

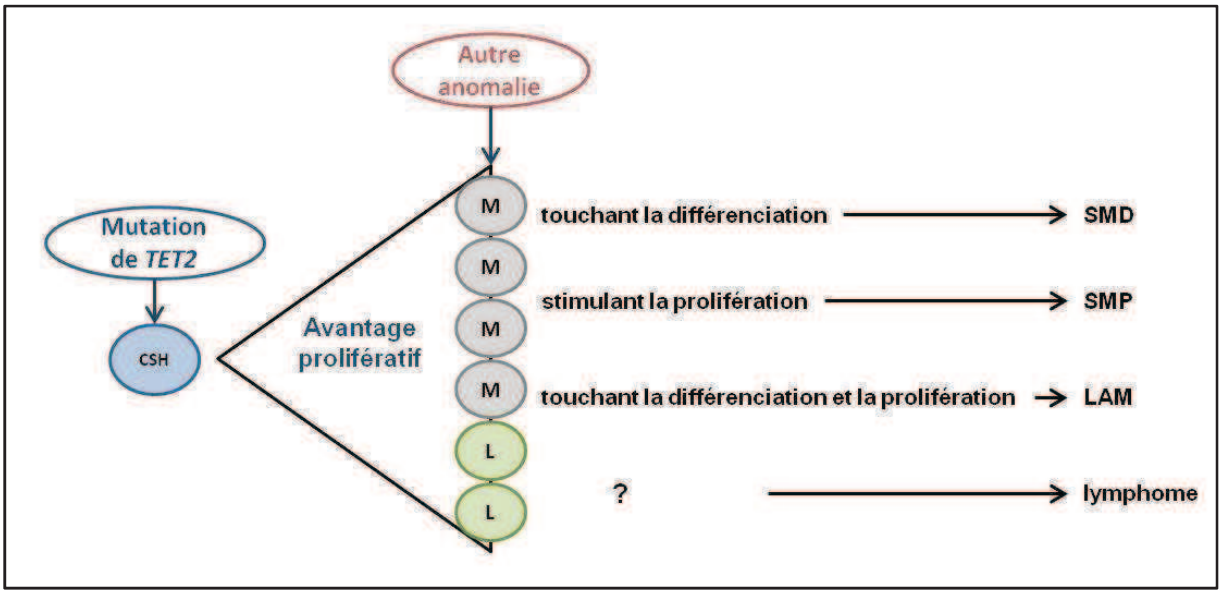


Figure 14 : Modèle de transformation tumorale induite par les mutations de *TET2.*

Cancer Cell
Article

TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis

Cyril Quivoron,[1,2,3,14] Lucile Couronné,[1,2,3,14] Véronique Della Valle,[1,2,3,14] Cécile K. Lopez,[1,2,3] Isabelle Plo,[2,3,4] Orianne Wagner-Ballon,[4,5] Marcio Do Cruzeiro,[6] Francois Delhommeau,[4,7] Bertrand Arnulf,[8] Marc-Henri Stern,[9] Lucy Godley,[10] Paule Opolon,[3] Hervé Tilly,[11] Eric Solary,[2,3,4] Yannis Duffourd,[3] Philippe Dessen,[1,2,3] Hélène Merle-Beral,[12] Florence Nguyen-Khac,[12] Michaëla Fontenay,[13] William Vainchenker,[2,3,4] Christian Bastard,[11,15] Thomas Mercher,[1,2,3,15] and Olivier A. Bernard[1,2,3,15,*]
[1]INSERM, U985, Villejuif 94805, France
[2]Université Paris-Sud, Orsay 91400, France
[3]Institut Gustave Roussy, Villejuif 94805, France
[4]INSERM, U1009, Villejuif 94805, France
[5]Hôpital Henri Mondor, Créteil 94000, France
[6]Plateforme de Recombinaison Homologue, Institut Cochin, INSERM U1016; Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8104; Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, 75014, Paris, France
[7]Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Saint Antoine, Paris 75005, France
[8]A 3963, Université Paris VII, Hôpital Saint-Louis, Paris 75010, France
[9]INSERM, U830, Institut Curie, Paris 75005, France
[10]Department of Medicine, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA
[11]INSERM, U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen 76038, France
[12]Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; INSERM U872, Paris 75005, France
[13]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Service d'Hématologie Biologique, Groupe Hospitalier Broca-Cochin-Hôtel-Dieu; Institut Cochin, Département d'Immuno-Hématologie, INSERM U1016, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8104, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris 75014, France
[14]These authors contributed equally to this work
[15]These authors contributed equally to this work
*Correspondence: olivier.bernard@inserm.fr
DOI 10.1016/j.ccr.2011.06.003

SUMMARY

Loss-of-function mutations affecting one or both copies of the *Ten-Eleven-translocation* (*TET*)*2* gene have been described in various human myeloid malignancies. We report that inactivation of *Tet2* in mouse perturbs both early and late steps of hematopoiesis including myeloid and lymphoid differentiation in a cell-autonomous manner, endows the cells with competitive advantage, and eventually leads to the development of malignancies. We subsequently observed *TET2* mutations in human lymphoid disorders. *TET2* mutations could be detected in immature progenitors endowed with myeloid colony-forming potential. Our results show that the mutations present in lymphoid tumor cells may occur at both early and later steps of lymphoid development and indicate that impairment of TET2 function or/and expression predisposes to the development of hematological malignancies.

Significance

TET2 mutations were associated with all subtypes of human myeloid malignancies. We show that Tet2 deficiency in mouse results in a cell-autonomous competitive advantage of hematopoietic progenitors, widespread hematological defects, and myeloid transformation. We also demonstrate that *TET2* mutations can be identified in human B and T cell lymphomas. These mutations can affect the hematopoietic stem cell compartment and may appear as an early event in the multistep process that leads to lymphoid or myeloid or both malignancies. These observations indicate that therapeutic strategies may have to target the hematopoietic stem cells to eradicate these diseases.

INTRODUCTION

Most human adult cancers develop through a multistep acquisition of a wide range of somatic mutations. It has been proposed that the tumor cells that initiate or maintain the malignant clone need to be able to self-renew. In human acute leukemia, this crucial property can be acquired by committed progenitors with limited self-renewal capacities through a genetic event or maintained through the targeting of hematopoietic stem cells (HSCs) (Cozzio et al., 2003; Goardon et al., 2011; Huntly et al., 2004). Leukemia-initiating cells are able to reconstitute the leukemia upon xenotransplantation in immunodeficient mice (Dick, 2008). Such cells have been experimentally shown to represent $1/10^2$–$1/10^6$ of the original blastic population in human acute myeloblastic and lymphoblastic leukemia. This notion, however, does not indicate the origin of the cell, namely, the cell in which the initial tumorigenic event occurred. Despite important progress in the identification of oncogenes involved in the development of human mature lymphoid malignancies, little is known regarding the initiating events in these diseases. More specifically, the natural history of mature T-lymphoid neoplasms is poorly understood (Jaffe, 2009; Jones, 2010).

The TET family proteins (Tet1, Tet2, Tet3) have been shown to catalyze the conversion of 5-methyl-cytosine (mC) to 5-hydroxymethyl-cytosine (hmC), a recently identified epigenetic mark (Ito et al., 2010; Koh et al., 2011; Kriaucionis and Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009). We and others have recently identified mutations in the *TET2* gene that frequently represent an early event during the development of a wide variety of human myeloid malignancies, including myeloproliferative neoplasms (MPNs), polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), myelofibrosis (MF), myelodysplastic syndrome (MDS), chronic myelomonocytic leukemia (CMML), and acute myeloid leukemia (AML) (Abdel-Wahab et al., 2009; Delhommeau et al., 2009; Jankowska et al., 2009; Kohlmann et al., 2010; Kosmider et al., 2009a, 2009b; Langemeijer et al., 2009; Nibourel et al., 2010; Tefferi et al., 2009a, 2009b, 2009d). A correlation between low hmC and *TET2* mutation status was reported in patients with MDS (Ko et al., 2010b), suggesting that an altered 5-hydroxy-methylation status in promoter or imprinted region leads to deregulation of important hematopoietic regulators and participates to the malignant process.

In half of the patients, only one copy of *TET2* is mutated, arguing for a role of haploinsufficiency in transformation (Delhommeau et al., 2009; Langemeijer et al., 2009). The variety of myeloid disorders carrying a *TET2* mutation suggests that it may represent an early step in the transformation process, targeting the hematopoietic stem/progenitor cell compartment. *TET2* mutation may, however, also occur at late steps during the transformation of MPN to secondary acute leukemia (Abdel-Wahab et al., 2010; Beer et al., 2010; Couronné et al., 2010; Saint-Martin et al., 2009; Schaub et al., 2010).

To investigate the role of TET2 during hematopoiesis, we engineered two mouse models in which the 5-hydroxy-methylation function of Tet2 is impaired. In addition, we investigated the status of *TET2* coding sequences in various human mature lymphoid malignancies.

RESULTS

Murine Models of Tet2 Inactivation

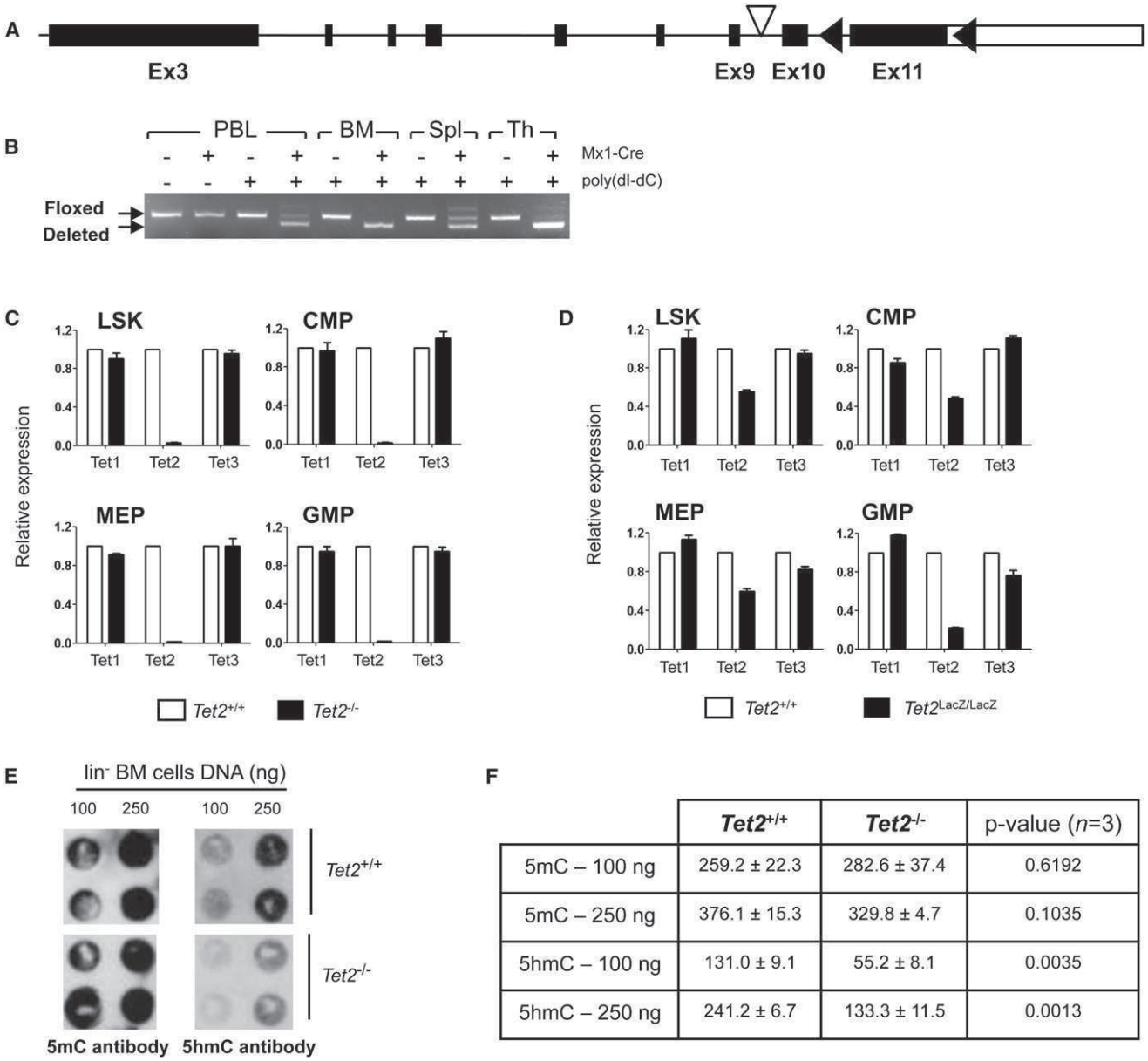
We generated two *Tet2*-deficient mouse lines (Figure 1A). One was derived from a gene-trap ES clone (SIGTR ES cell line AN0709) in which a β-galactosidase-neomycin cassette was inserted in *Tet2* intron 9 ($Tet2^{LacZ}$ allele), thus leading to the expression of a Tet2-βGal fusion transcript (Figure 1A). We also generated a conditional knockout allele of *Tet2* in which the coding sequences of the last exon of *Tet2* are surrounded by *loxP* sites ($Tet2^{Lox}$). After Cre recombination, this allele results in the loss of the last 490 carboxy-terminal (Ct) amino acids of Tet2. In both models, *TET2* is predicted to lose the conserved Ct homology region of the double-stranded β-helix-2OG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain. The two alleles were backcrossed for at least six generations into the C57BL/6 background, and then intercrossed to obtain homozygous animals.

Mice bearing the conditional *Tet2* allele and the interferon inducible Cre transgene (Mx1-Cre) were intercrossed to obtain a cohort of Mx1-$Cre^+Tet2^{Lox/Lox}$ (hereafter named $Tet2^{-/-}$) and control Mx1-$Cre^-Tet2^{Lox/Lox}$ (hereafter named $Tet2^{+/+}$) animals that were injected with poly(dI-dC) to induce Cre expression and acute inactivation of *Tet2* in adult animals. Full excision was observed in bone marrow and thymus (Figure 1B) and correlated with loss of normal *Tet2* mRNA expression in purified hematopoietic stem ($Lineage^-Sca\text{-}1^+c\text{-}Kit^+$: LSK cells) and progenitor populations (Figure 1C).

$Tet2^{LacZ/LacZ}$ animals were obtained at a Mendelian ratio, were fertile and appeared normal (data not shown). $Tet2^{LacZ/LacZ}$ progenitors showed a 20%–50% residual expression of a normal *Tet2* mRNA compared to wild-type progenitors, suggesting that the $Tet2^{LacZ}$ allele is an hypomorph allele (Figure 1D; see Figure S1 available online). Importantly, *Tet1* and *Tet3* expression levels remained unchanged in progenitors from both models (Figures 1C and 1D). Quantification of mC and 5hmC in $Tet2^{-/-}$ $lineage^-$ cells revealed a marked reduction of 5hmC compared to $Tet2^{+/+}$ (Figures 1E and 1F). Using a similar approach, no significant change in 5hmC level was detected in $Tet2^{LacZ/LacZ}$ $lineage^-$ cells (data not shown). Together these data confirmed the inactivation of *Tet2* in these models and indicate that loss of *Tet2* during adult hematopoiesis is not compensated by increased transcription of *Tet1* and *Tet3*.

Tet2 Controls Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Homeostasis

Analysis of the hematopoietic compartments in these animals showed an amplification of the LSK compartment in 4- to 6-month-old animals in both *Tet2* inactivation models (Figures 2A and 2B; Figures S2A–S2D). Heterozygous animals also presented increased LSK in both models (Figures S3A and S3F). Within this compartment, $CD34^+Flt3^-$ short-term stem cells and to a lesser extent $CD34^-Flt3^-$ long-term stem cells were amplified. Notably, absolute numbers of $CD150^+CD48^-$ LSK cells were slightly increased (Figure 2A; Figure S2D). The absolute number of common myeloid progenitors (CMP) and megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEP) was increased, whereas the granulocyte-macrophage progenitor (GMP) population remained stable in $Tet2^{-/-}$ animals compared with controls



	Tet2$^{+/+}$	*Tet2*$^{-/-}$	p-value (*n*=3)
5mC – 100 ng	259.2 ± 22.3	282.6 ± 37.4	0.6192
5mC – 250 ng	376.1 ± 15.3	329.8 ± 4.7	0.1035
5hmC – 100 ng	131.0 ± 9.1	55.2 ± 8.1	0.0035
5hmC – 250 ng	241.2 ± 6.7	133.3 ± 11.5	0.0013

Figure 1. Description of the Two *Tet2* Inactivation Mouse Models

(A) Partial structure of the *Tet2* gene. For the *Tet2*^{LacZ} "LacZ" allele, the location of the gene-trap cassette containing a splice acceptor and a β-galactosidase-neomycin fusion gene is indicated (empty triangle). For the *Tet2*^{Lox} "floxed" allele, *loxP* sites (black triangles) have been introduced in intron 10 and in the 3′ untranslated region of exon 11.

(B) PCR analyses of Mx1-Cre-mediated exon 11 deletion in peripheral blood leukocytes (PBL), bone marrow (BM), spleen (Spl) and thymus (Th) cells from Mx1-Cre^{-}*Tet2*$^{Lox/Lox}$ (hereafter named *Tet2*$^{+/+}$) and Mx1-Cre^{+}*Tet2*$^{Lox/Lox}$ (hereafter named *Tet2*$^{-/-}$) animals 2 months after poly(dI:dC) injections (floxed allele: 305 bp; deleted allele: 237 bp).

(C) Quantitative RT-PCR analysis of expression of the murine *Tet1*, *Tet2* and *Tet3* genes in flow-sorted hematopoietic progenitors from *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals (n = 3 per genotype). Results are normalized with respect to *Abl1* expression and represented relatively to expression in control mice samples. *Tet2* RT-PCR assay spans the exon 10–11 boundary. LSK: Lin^{-}Sca-1^{+}c-Kit^{+}; CMP: common myeloid progenitor; MEP: megakaryocyte-erythrocyte progenitor; GMP: granulocyte-macrophage progenitor.

(D) Quantitative RT-PCR analysis in *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ versus wild-type controls as in C (n = 3 per genotype).

(E) Drop in 5-hydroxymethyl-cytosine (5hmC) in immature populations of *Tet2*-inactivated mice. Immunoblot analyses of increased quantity of genomic DNA from BM lineage (lin)-negative cells of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice 4 months after poly(dI:dC) induction using anti 5-methylcytosine- (5mC) antibody (left panel) and 5-hydroxymethyl-cytosine- (5hmC) antibody (right panel).

(F) Quantification of the signal shown in (E).

See also Figure S1.

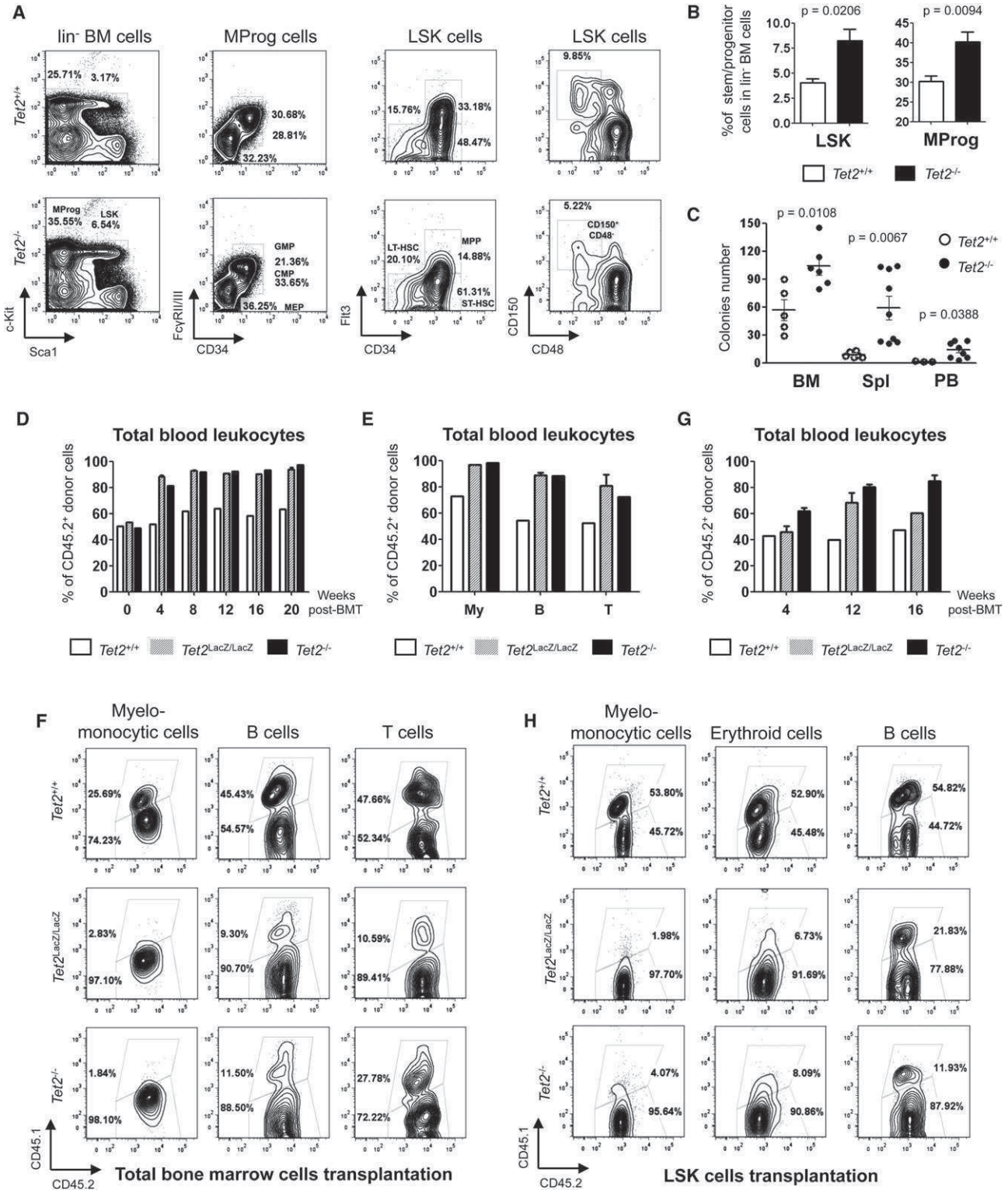


Figure 2. Tet2 Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Compartments Homeostasis

(A) Flow cytometrical analysis of hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals. Analysis was performed 4–6 months postinduction. Percentages within lineage⁻ bone marrow cells (left panel), myeloid progenitor cells (MProg: lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺ cells; middle left panel), or within LSK cells (lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ cells; middle right and right panel) are indicated.

(B) Representation of the results exemplified in A as a percentage of lineage-negative hematopoietic progenitors. Data are presented as mean ± SEM *Tet2*$^{+/+}$ (n = 6; white histogram) and *Tet2*$^{-/-}$ (n = 6; black histogram) mice.

(Figures S2E and S2K). Bone marrow cells from *Tet2*$^{-/-}$ animals presented a functional increase in methylcellulose colony forming progenitors (Figure 2C; Figures S2F and S2G). Of note, the average number of cells per colony was higher in *Tet2*-deficient cell cultures compared with controls (Figures S2F and S2M). Culture of purified LSK cells from some *Tet2*$^{-/-}$ animals 12 months after induction also produced an increased number of cells presenting a decreased differentiation toward CD11b^{+}Gr1^{+} myeloid cells and a higher maintenance of the immature c-Kit^{+}Sca1^{+} phenotype compared with controls (Figures S2H and S2I). The amplitude of this phenotype was variable among animals. Similar results were obtained from gene-trap animals (Figures S2J–S2N).

To demonstrate the cell-autonomous nature of this property, we transplanted total bone marrow or purified LSK cells from both *Tet2*-deficient models (CD45.2^{+}CD45.1^{-}) in competition with wild-type cells (CD45.2^{+}CD45.1^{+}) into wild-type CD45.2^{-}CD45.1^{+} recipients. Homozygous *Tet2*-deficient cells from both models efficiently reconstitute all hematopoietic lineages for over 16 weeks, indicating that amplified LSK cells are functional (Figures 2D–2H; Figures S2O–S2S). In both myeloid and lymphoid lineages, the contribution of *Tet2*-deficient cells progressively increased over that of wild-type cells. An amplification of the LSK compartment was observed in some recipient animals (Figure S2R).

Together, these data showed that Tet2 inactivation resulted in a phenotypic and functional amplification and a competitive advantage of hematopoietic stem and progenitor cells indicating cell-autonomous control of their homeostasis by Tet2.

Tet2 Inactivation Induces Alteration of Several Mature Hematopoietic Lineages

To further characterize the consequences of Tet2 inactivation on mature hematopoietic lineages, we followed a cohort of *Tet2*$^{-/-}$, *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ animals and their respective controls for disease development. Four-month-old *Tet2*$^{-/-}$ and *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ animals present a modest increase in white blood cell counts, a decrease in erythroid and platelets counts, and a significant hepatosplenomegaly compared with controls (Figures 3A and 3B; Figures S3H and S3I). Histopathological analysis showed an alteration of the normal splenic architecture with significant expansion of the red pulp and infiltration of the lymphoid follicles with admixed maturing myeloid, immature erythroid, and maturing megakaryocytic elements (Figure S3L; Figure 3C). Analysis of the liver showed that *Tet2*$^{-/-}$ animals presented a diffuse infiltration of the sinusoids with an admixture of lymphoid and trilineage myeloid elements with some focused perivascular infiltrations (Figure S3L).

Flow cytometrical analysis confirmed an amplification of myeloid cells in both models with a marked increase in a myelomonocytic CD11b^{+}Gr1^{-} population in the peripheral blood and spleen (Figure 3D). Alteration of the erythroid lineage was observed in the bone marrow with a significant increase in CD71^{+}Ter119^{-} proerythroblasts and a decrease in the number of CD71^{low}Ter119^{+} late erythroblasts (Figure 3E). Splenic erythropoiesis was also visible with an increase in the number of CD71^{+}Ter119^{+} erythroid cells (Figure 3E). Tet2-deficient splenocytes could form multilineages colonies in methylcellulose colony-forming assays confirming extramedullar hematopoiesis (Figure 2C and data not shown). Similar abnormalities were observed in the gene-trap model (Figures S2M, S2N, S3J, and S3K).

Lymphoid lineages were also affected with a global increase in the number of immature double-negative (DN) CD4^{-}CD8^{-} T cell progenitors in the thymus, more particularly, CD44^{+}CD25^{-} DN1 cells (Figure 3F; Figures S3Q–S3V). The B cell lineage was also altered with a decreased number of bone marrow B220^{+}IgM^{-} pre- and pro-B cells and B220^{+}IgM^{low} mature B cells (Figure 3G) associated with an increase in the number of splenic B cells (Figure 3H; Figures S3M–S3P). Of note, heterozygous *Tet2*$^{LacZ/wt}$ animals present similar abnormalities of the myeloid, erythroid and B cell lineages (Figure S3B). Also, both lymphoid and myeloid lineage alterations were observed in recipients of *Tet2*-deficient cells (Figure S2O), indicating that differentiation abnormalities are cell autonomous.

With age, some *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ animals developed a lethal phenotype associated with important weight loss, high white blood cell counts, anemia, thrombocytopenia, and massive hepatosplenomegaly (Figures 4A and 4B; data not shown). Histopathological analysis of moribund animals showed complete effacement of the spleen architecture and massive perivascular as well as interstitial infiltration of the liver with myeloid elements (Figure 4C). A moderate fibrosis, assessed by increased reticulin fiber staining on tissue sections, was observed in the spleen and liver but not the bone marrow (Figure 4D). Flow cytometrical analysis confirmed the myeloid and erythroid lineage hyperplasia with abnormal myelomonocytic differentiation revealed by a striking amplification of the CD11b^{+}Gr1^{-} population visible in younger Tet2-deficient animals (Figure 4E). Importantly, the disease was transplantable to

(C) Clonogenic activity of bone marrow (BM), spleen (Spl) and peripheral blood (PB) cells from *Tet2*$^{+/+}$ (n = 6; white circles) and *Tet2*$^{-/-}$ (n = 6; black circles) mice 4–8 months postinduction in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored after 7 days and results are represented as mean colony number ± SEM. See also Figure S2.

(D) Competitive bone marrow transplantation (BMT) assay. CD45.2^{+} donor BM cells isolated from *Tet2*$^{+/+}$, *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice were transplanted into lethally irradiated CD45.1^{+} recipients, in equivalent number to wild-type competitor CD45.1^{+}CD45.2^{+} BM cells. The percentage of donor chimerism (CD45.2^{+} cells) in the blood is given at the indicated time points post-BMT (n = 2 mice per genotype). See also Figure S2.

(E) Percentage of CD45.2^{+} donor chimerism in blood cells 20 weeks post-BMT; myelomonocytic cells (My; CD11b^{+}Gr-1^{+}), B cells (CD19^{+}B220^{+}) and T cells (CD4^{+} or CD8^{+}). Values shown are mean ± SEM (n = 2 mice per genotype).

(F) Representative flow cytometrical profiles of donor chimerism in blood subpopulations shown in (E) (host cells were electronically excluded with CD45.1).

(G) LSK cells transplantation. CD45.2^{+} sorted-LSK cells isolated from *Tet2*-deficient or wild-type mice were transplanted into lethally irradiated CD45.1^{+} congenic recipients. The percentage of donor chimerism in the blood is given at the indicated time points post-BMT. Values shown are mean ± SEM (n = 2 mice per genotype). See also Figure S2.

(H) Representative flow cytometrical analysis of donor chimerism in bone marrow subpopulations 16 weeks post-BMT (CD11b^{+}Gr-1^{+} myelomonocytic cells; CD71^{+} erythroid cells; CD19^{+}B220^{+} B cells).

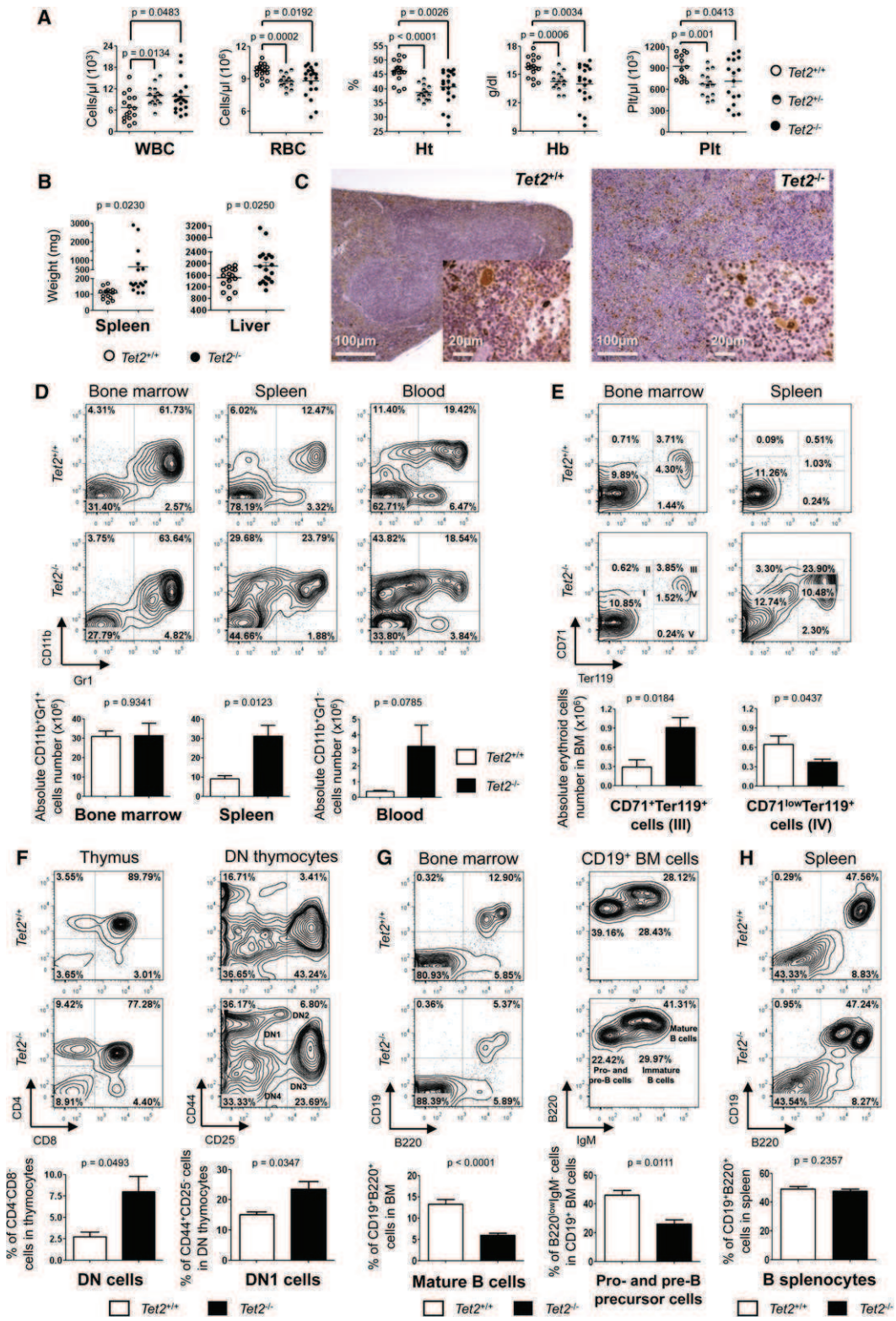


Figure 3. Tet2 Inactivation Results in Aberrant Myeloid and Lymphoid Maturation

(A) White blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), and platelet (Plt) counts in peripheral blood samples obtained from *Tet2*$^{+/+}$, *Tet2*$^{+/-}$, and *Tet2*$^{-/-}$ mice, performed 4–6 months postinduction. See also Figure S3 and Table S1.

(B) Spleen and liver weights of mutant and littermate control mice.

(C) Von Willebrand staining on spleen sections from *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals highlights megakaryocytic hyperplasia in *Tet2*$^{-/-}$ animals 4 months postinduction.

secondary recipients, which succumbed with a shorter latency and a similar phenotype (Figure S4). To date, *Tet2*$^{-/-}$ animals did not develop lethal disorders with a follow-up of over 15 months.

Together, these results show that *Tet2* inactivation in mice results in pleiotropic alterations of the immature and mature hematopoietic compartments including both lymphoid and myeloid lineages (summarized in Table S1). With time, *Tet2* inactivation leads to bona fide myeloid malignancies with differentiation abnormalities reminiscent of human CMML.

TET2 Is Mutated in Human Lymphoid Malignancies

Based on these results indicating that TET2 controls both self-renewal and/or proliferation of early progenitors and also late steps of both myeloid and lymphoid hematopoietic differentiation, we investigated whether human lymphoid malignancies could also present *TET2* mutations. Supporting this hypothesis, two of six patients presenting myeloid malignancies and initially investigated for *TET2* alterations, concomitantly suffered from lymphomas (Delhommeau et al., 2009; Viguié et al., 2005). Therefore, we resequenced the entire coding sequence of *TET2* in a series of human lymphoid malignancies. No nucleotide changes inducing truncation or aminoacid changes in the catalytic domain of TET2 were observed in chronic lymphocytic leukemias (CLLs) (n = 75), plasma cell neoplasms (PCNs) (n = 22), and leukemic or disseminated T cell neoplasms (n = 45) [including T cell prolymphocytic leukemia (TPLL), T cell large granular lymphocytic leukemias (TGLLs), and adult T cell lymphoma/leukemia HTLV1+ (ATLL HLTV1)]. In a series of 301 B cell lymphoma and 177 T cell lymphoma samples, *TET2* mutations were observed in 2.0% of B cell and 11.9% of T cell lymphomas and in up to a third of the angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL) samples (Table 1). The mutations were mainly insertion/deletions, generating frameshifts and nonsense mutations, as seen for myeloid malignancies (Table S2). Of note, five of these patients had a known history of successive hematological malignancies (Table S3).

We also analyzed T-lymphoma samples by DNA micro-arrays, including nine *TET2* wild-type and ten *TET2* mutated samples. The analysis revealed that one of the mutated samples also exhibited a small genomic deletion of chromosome 4q including the *TET2* locus (Figure S5A). Therefore, as for myeloid malignancies, *TET2* genomic abnormalities are less frequent than *TET2* mutations but may occur in conjunction.

Matched nontumoral DNA samples were available for 13 patients with *TET2* mutations (Figure 5A, Table S2, Figures S5B and S5C). The TET2 sequences were wild-type in two patients (patients 5 and 6). The mutated TET2 sequence detected in the lymphoma cells was clearly observed in the nontumoral DNA samples of five patients (patients 3, 4, 13, 15, and 26). In two of them (patients 3 and 15), this might be due to the presence of tumor cells, as judged by PCR analyses for TCR or IgH clonality or the presence of IGH-BCL2 fusion transcript (data not shown). Trace of the mutated TET2 sequence was suspected in six matched samples (patients 2, 10, 16, 17, 20, and 21) of which three (patients 2, 10, and 16) were devoid of tumor cells. Mutations observed in patients 17, 20, and 25 have been described as acquired in myeloid malignancies.

Together the mutated *TET2* sequences were observed in the matched sample despite the absence of detectable circulating tumor cells in five samples (patients 2, 4, 10, 13, and 16). In two of these samples (patients 4 and 13), the estimated burden of mutated sequences was comparable to the wild-type sequence. Two hypotheses could account for these observations: either the mutation was germline transmitted, or the mutation was acquired and had endowed the clone with a growth advantage over wild-type progenitors, leading to a skewed hematopoiesis.

TET2 Mutations Are Detected in CD34$^+$ Cells with Myeloid Potential

To test the hypothesis that *TET2* mutations may arise in early hematopoietic progenitors in patients presenting lymphomas, we analyzed three patients for which viable cells were available. Patient 8 was diagnosed with an AITL and carried a Q1445X mutation. Blood mononuclear cells were grown in a colony assay supporting myeloid differentiation. Of the 11 colonies that grew out, 5 showed only a wild-type *TET2* allele and 6 showed both Q1445X and wild-type alleles (Figure 5B). These results demonstrate the acquired nature of the *TET2* mutation in this patient and also indicate its presence in progenitor cells with myeloid colony-forming potential.

Patient 2 was initially diagnosed with a B cell lymphoma carrying two *TET2* mutations [(E448fs; 4663+1G > A: splice site mutation)] that were barely detectable in blood sample (Figure 5C). Five months after treatment, the patient developed an MDS that rapidly evolved into AML. Viable bone marrow cells were available only at the AML phase. DNA was extracted from whole bone marrow cells, purified CD34$^-$ and CD34$^+$ fractions.

(D) Representative flow cytometrical analysis of the mature myeloid cells in the bone marrow, spleen, and blood of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals. Percentages of total cells are indicated. Lower panel: absolute number of cells from analysis shown in (C). *Tet2*$^{+/+}$ (n = 10; white bars) and *Tet2*$^{-/-}$ (n = 16; black bars) animals are represented as mean ± SEM. See also Table S1.

(E) Representative flow cytometrical analysis of the erythroid lineage in the bone marrow and spleen of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals. Percentage of total cells is indicated. Lower panel: absolute number of cells from analysis shown in (D). *Tet2*$^{+/+}$ (n = 10; white bars) and *Tet2*$^{-/-}$ (n = 16; black bars) animals are represented as mean ± SEM.

(F) Representative flow cytometry analysis of thymocytes in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice performed 4 months postinduction. Upper left panels: the percentages of total thymocytes are indicated. Upper right panels: the percentages of thymocytes precursors in Lineage$^-$CD4$^-$CD8$^-$ double-negative (DN) cells are represented. Lineage antibodies included antibodies against CD19, CD3ε, CD8, TCR-β, NK-1.1, Ly-6G, and CD11b murine markers. Lower panels: the percentages of CD4$^-$CD8$^-$ DN in total thymocytes and CD44$^+$CD25$^-$ DN1 cells in DN precursor thymocytes from *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals (n = 3 per genotype) are represented as mean ± SEM. See also Figure S3.

(G) Flow cytometrical analysis of B cells in the bone marrow of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals 4 months postinduction. Left panel: whole bone marrow. Right panel: gated on CD19$^+$ cells (the frequencies are indicated as a percentage of CD19$^+$ cells). Gates include pro- and pre-B precursor cells (B220^{low} IgM$^-$), immature B cells (B220^{low} IgM^{hi}) and mature B cells (B220^{hi} IgM^{hi}). Lower panels indicate mean ± SEM of eight animals per genotype. See also Table S1.

(H) Flow cytometrical analysis of splenic B cells in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals. Lower panel indicate mean ± SEM of ten animals per genotype.

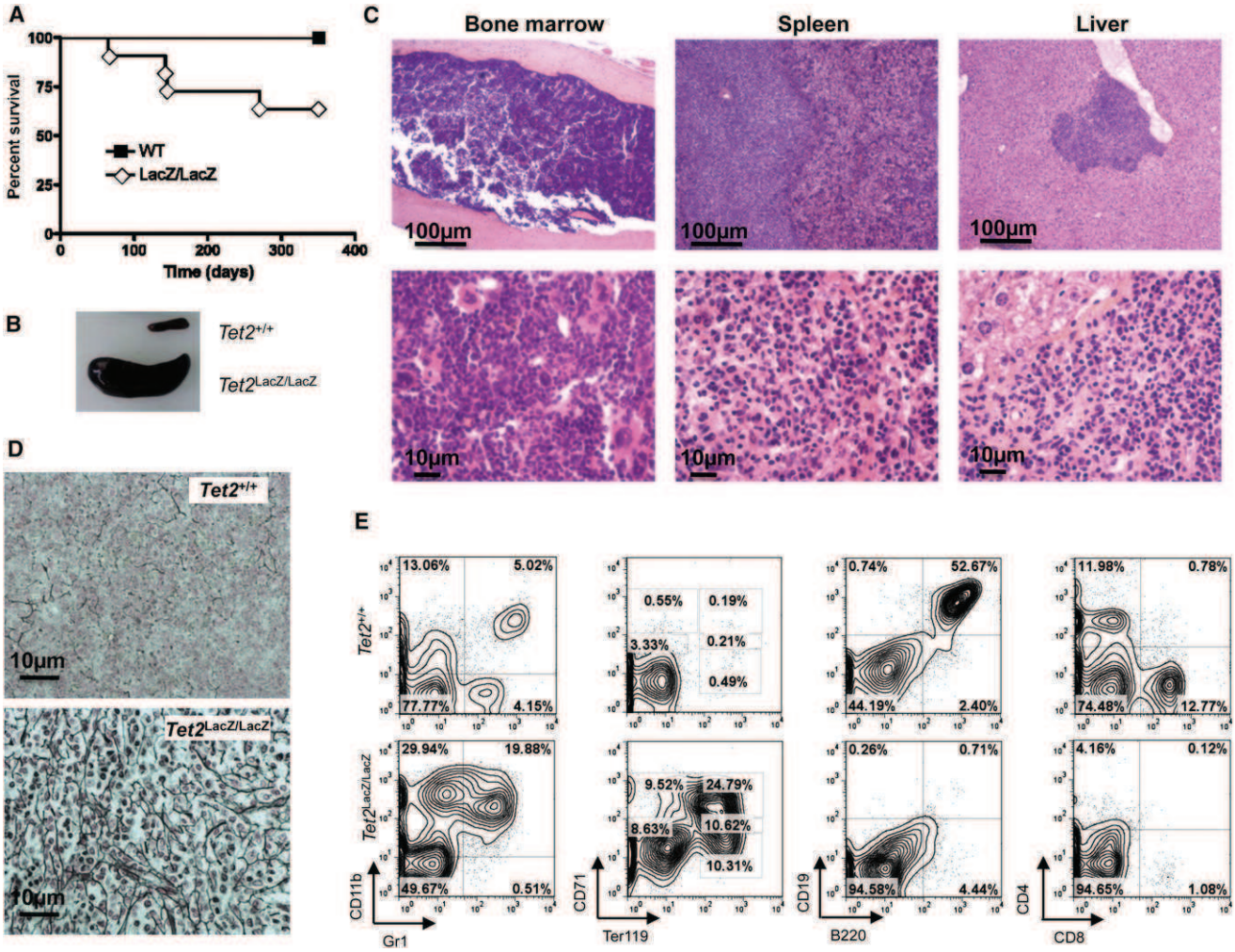


Figure 4. Tet2 Inactivation Induces Fatal Hematopoietic Malignancies

(A) Kaplan-Meier survival curve of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ animals and wild-type littermate controls. Only animals that reached moribund state were considered. See also Figure S4.

(B) Representative picture of spleens observed in mutant *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ mouse compared with spleens from wild-type littermates.

(C) Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) staining of bone marrow, spleen and liver sections from a 14-month-old moribund *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ animal. See also Figure S3L.

(D) Reticulin staining of spleen from animal in (C).

(E) Flow cytometrical analysis of myelomonocytic, erythroid, B and T lymphoid lineages in the spleen of a 14-month-old moribund mutant *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ mouse. Of note, this animal displayed leukocytosis (69.1 × 10^6 WBC/mm^3), anemia (1.76 × 10^6 RBC/mm^3, 12.6% hematocrit, and 4.7 g hemoglobin/dl), thrombocytopenia (189 × 10^3 platelets/mm^3) and hepatosplenomegaly (liver and spleen weights were 3960 and 2000 mg, respectively). See also Figure S4.

In every DNA samples, both *TET2* mutations were observed at seemingly variable ratios with respect to the wild-type sequence. DNA was extracted from 28 colonies grown in myeloid conditions in vitro, from single CD34$^+$ cells. Six colonies showed only wild-type *TET2* sequences, 14 colonies presented both *TET2* mutations, and 8 colonies carried only the splice site mutation (Figure 5C). These data demonstrate the presence of *TET2* mutations in both the lymphoma and the AML cells, confirmed their acquired nature. Taken together, these observations suggest that the *TET2* mutated clone had invaded the bone marrow and was at the origin of both the lymphoid and myeloid type malignancies.

Patient 27 was diagnosed with a T cell lymphoma. Bone marrow aspirate examination was cytologically normal. We observed two *TET2* mutations (P761fs and Q481X) in the CD34$^-$CD3$^-$CD19$^-$CD14$^-$ cell fraction (the remaining fraction after successive exclusion of the CD3$^+$, CD19$^+$ and CD14$^+$ cell fractions from the blood sample), which were absent in the other fractions (Figure 6A). In vitro colonies assay of sorted CD34$^+$ cells showed the presence of P761fs in 6 of 84 (~7%) colonies, whereas the stop mutation was not observed (Figure 6C). This fraction remained stable, since a similar analysis showed 6 out of 93 (~6.5%) colonies with the P761fs mutation 4 months later. Of the 45 colonies obtained from cultures of Lineage$^-$CD34$^+$ CD38$^-$ sorted cells, only one carried the P761fs (Figure 6C). These results show the acquired nature of the *TET2* mutations in this patient and indicate the presence of a *TET2* mutation on one copy in a small fraction of hematopoietic progenitors with myeloid differentiation potential.

Table 1. TET2 Mutations in B and T Cell Neoplasms

B cell ceoplasms	All patients	Mutated TET2
LPL	2	0 (0%)
PCN	22	0 (0%)
CLL /SLL	75	0 (0%)
TCRBL	3	0 (0%)
DLBCL	87	5 (5.7%)
MCL	22	0 (0%)
MZL	17	0 (0%)
FL	68	1 (1.5%)
Unspecified B-lymphoma	5	0 (0%)
Total	301	6 (2.0%)
T cell neoplasms	**All patients**	**Mutated TET2**
TLBL	5	1 (20%)
Leukemic or disseminated (TPLL, TGLL, ATLL)	45	0 (0%)
Extranodal (ETCL, hepatosplenic)	4	0 (0%)
Extranodal cutaneous (Sezary, MF…)	42	2 (4.8%)
AITL	30	10 (33.3%)
ALCL	8	0 (0%)
PCTL, NOS	30	6 (20%)
Unspecified T-lymphoma	13	2 (15.4%)
Total	177	21 (11.9%)

LPL, lymphoplasmacytic lymphoma (including Waldenström macroglobulinemia); PCN, plasma cell neoplasms (including plasma cell myeloma and plasma cell leukemia); CLL, chronic lymphocytic leukemia; SLL, small lymphocytic lymphoma; TCRBL, T cell-rich B cell lymphoma; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, marginal zone lymphoma; FL, follicular lymphomal; TLBL: precursor T-lymphoblastic lymphoma; TPLL, T cell prolymphocytic leukemia; TGLL, T cell large granular lymphocytic leukemia; ATLL, adult T cell lymphoma/leukemia (HTLV1+); ECTL, enteropathy-associated T cell lymphoma; MF, mycosis fungoides; AITL, angioimmunoblastic T cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; PCTL-NOS, peripheral T cell lymphoma not otherwise specified.

Taken together, these results show the presence of *TET2* mutations in B and T cell lymphomas. Detailed analysis of three patients indicated that lymphoma cells carried one somatic mutation originally acquired in an hematopoietic stem cell. During T cell maturation/differentiation, a second *TET2* mutation may occur, leading to the total loss of TET2 function in lymphoma cells.

To investigate the sequence of events occurring during tumor development, we further analyzed the tumor cells from patient 27. SNP microarray analyses showed several acquired abnormalities, including an LOH of the long arm of chromosome 7 and a duplication of the long arm of chromosome 4 (data not shown). FISH analyses confirmed the presence of an additional copy of the *TET2* locus in 20% of the nuclei in blood sample (data not shown). Sequencing of the PCR products obtained from single cells, sorted in individual wells from the fraction enriched in $CD34^-CD3^-CD19^-CD14^-$ tumor cells, confirmed the simultaneous presence of both *TET2* mutations in 6/10 assays (Figure 6D). We also PCR-amplified a fragment spanning the two mutations from the same tumor population, and the PCR products were subcloned using T/A vectors. Sequencing of individual bacterial colonies showed that a given mutation was always associated with a wild-type sequence at the other position. The P761fs/Q481wt combination was observed 24/42 times (57%) and the P761wt/Q481X combination 18/42 times (43%) (data not shown). No wild-type fragment was sequenced from these vectors, indicating that all three *TET2* copies present in the tumor cells were mutated. The observed ratio between both mutations indicated that the duplicated copy carried the P761fs mutation. In addition, these data indicate that the flow-sorted $CD34^-CD3^-CD19^-CD14^-$ fraction contained essentially tumor cells.

Additional genetic Alterations Are Associated with *TET2* Mutations

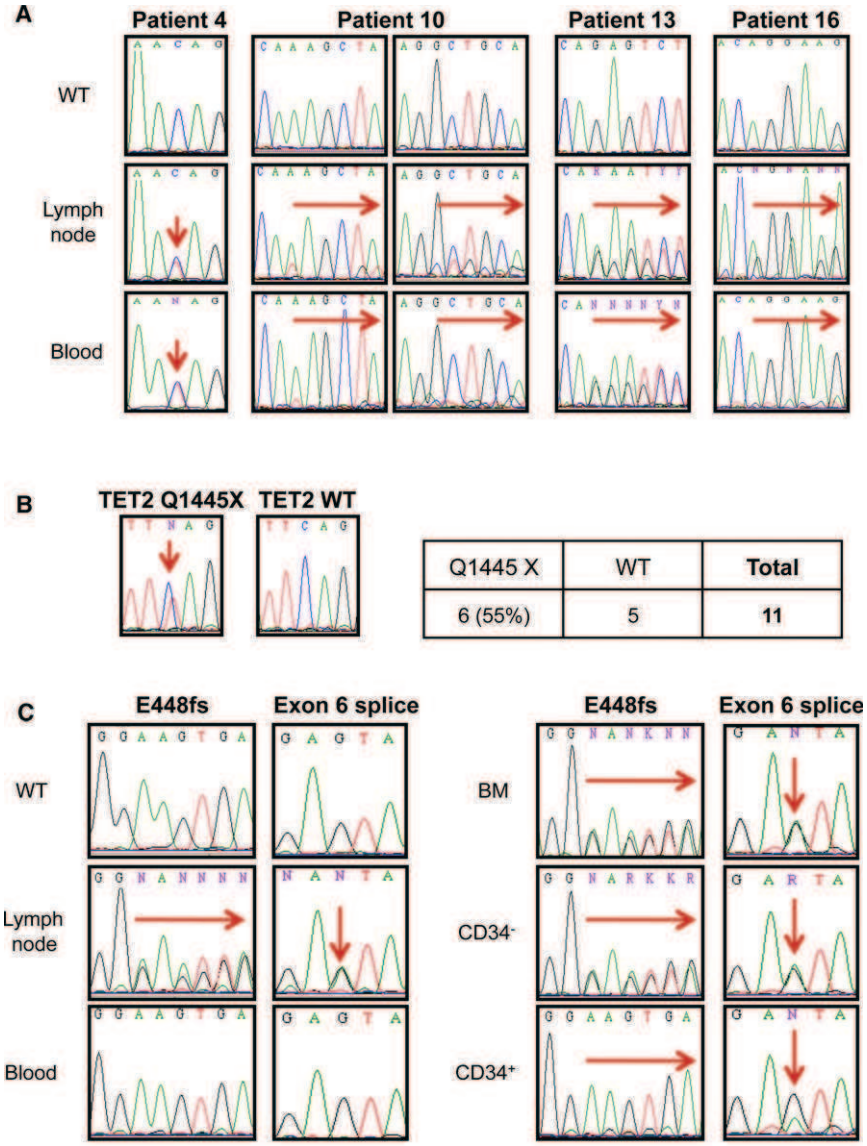
To identify additional genetic alterations in lymphomas, we used an exome sequencing approach to investigate DNA from the $CD34^-CD3^-CD19^-CD14^-$ (tumor) and $CD3^+$ (matched control) fractions. For each fraction, exonic DNA was captured using the SureSelect oligonucleotides (Agilent) and sequenced to generate 115600653 and 90633228 reads, from tumor and matched control libraries, respectively.

We first confirmed the presence of both *TET2* mutations in the tumor population at a ratio of 184/339 reads (54%) for P761fs and 140/389 reads (36%) for the Q481X, consistent with the duplication of the P761fs mutation (Figure 6E). The two mutations were observed at very low frequencies in the $CD3^+$ fraction (8/228 reads (4%) and 6/256 (2%) reads, respectively). We next looked for sequence variations, with respect to the human reference sequence, that were present only in the tumor population. Variations in seven genes (*IGSF21*, *CRIM1*, *CLSTN2*, *MCCC2*, *PLZF*, *ZC3H10*, and *ZNF774*) were validated by Sanger analysis (Figure 6E; Figure S6).

We then used quantitative RT-PCR to analyze the expression profile of the mutated genes in RNA from normal human brain, bone marrow, peripheral lymphocytes, and in flow-sorted tumor cells from patient 27 (Figure 6F). *CLSTN2* expression was observed in brain, but not in normal PBL, thymus, or bone marrow nor in patient's tumor samples (data not shown). The lack of detectable expression of *CLSTN2* in the hematopoietic system suggests that the *CLSTN2* mutation could be a passenger rather than a causal mutation. The transcription of *ZNF774*, *CRIM1*, and *IGSF21* was not detected in normal blood cells and/or in the tumor sample, but was observed in the bone marrow and/or thymus, questioning their role in the transformation process. Finally, we investigated the presence of the mutations in the $CD34^+$-derived colonies of the patient. Mutations in *PLZF* and *CRIM1* were identified in eight of eight $CD34^+$-derived colonies with the *TET2* P761fs mutation. The *ZNF774* mutation was observed in six of eight *TET2*-mutated colonies tested, suggesting that it occurred later in the transformation process than the three others (i.e., *TET2*, *PLZF*, and *CRIM1*). *ZNF774*, *PLZF*, and *CRIM1* mutations were not observed in 65 *TET2* wild-type $CD34^+$ colonies, suggesting that they did not occur independently of the *TET2* P761fs mutation.

DISCUSSION

The present study demonstrates the unique role of *Tet2* during murine hematopoiesis. Using two independent murine models,



Q1445 X	WT	Total
6 (55%)	5	11

	E448fs/4663+1G>A	wt/4663+1G>A	wt/wt	Total
$CD34^+CD38^-$	8	5	6	19
$CD34^+CD38^+$	6	3	0	9
Total	14	8	6	28

Figure 5. *TET2* Mutation in Human T-Lymphoma Samples

(A) *TET2* sequence in diagnostic and matched control samples. Vertical arrows indicate the sequence variations. Other examples are shown in Figure S5. Horizontal arrows hang over the frameshift mutations. The presence of the mutated TET2 sequences was confirmed by sub cloning the PCR product from patient 10. The [1893_1896 delAAGC] (on the left) was observed on 1/29 DNA molecules analyzed and the [4527 delG] (on the right) was observed on 2/18 DNA molecules analyzed.

(B) Genotype of $CD34^+$ colonies from patient 8. Note that four erythroid lineage colonies were carrying the *TET2* mutation.

(C) Genotyping of diagnostic and purified bone marrow fractions and $CD34^+$ colonies from patient 2.

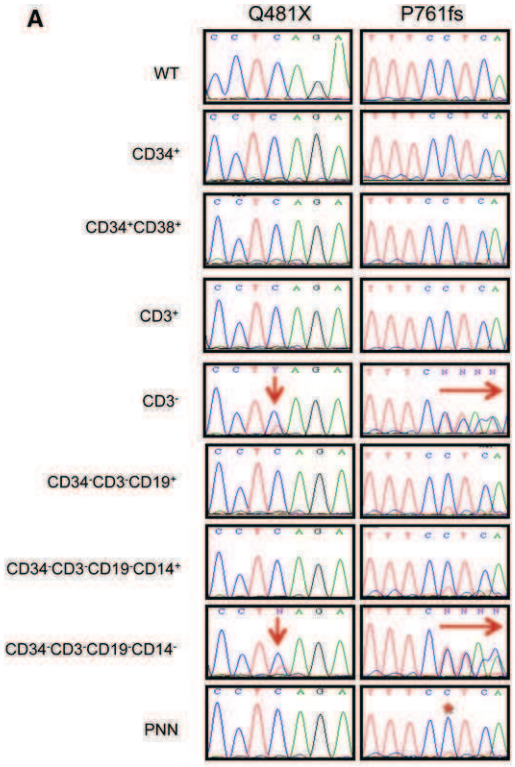
Left panel: *TET2* sequences at the lymphoma phase. Wild-type (WT) sequences are shown at the top. Node: nodal biopsy at diagnosis. Whole-blood sample was considered as normal matched DNA because it is devoid of IGH clonal marker.

Right panel: *TET2* sequences at the AML phase. BM: bone marrow nucleated cells. $CD34^-$: negative fraction after $CD34^+$ beads selection and $CD34^+$: flow-sorted $CD34^+$ population. Both mutations (frameshift [fs] and splice site mutation) are observed in all analyzed fractions.

Bottom: Genotype of colonies obtained from single cells sorted on CD34 and CD38 expression. 4663+1G > A would have appeared first in the course of the disease. Note that the cloning efficiency was extremely low (less than one colony out of 3000 seeded cells) and that colonies were small. See also Figure S5 and Table S2.

we showed that alteration of Tet2 function resulted in pleiotropic hematopoietic abnormalities and predisposed to development of a fatal disorder resembling human myeloid disorders in which *TET2* is mutated. In addition, these results led to a screen that identified *TET2* mutations as a recurrent event in several human lymphoid malignancies.

First, we show that complete inactivation of the catalytic domain of Tet2 (conditional model) lead to a reduction of the 5hmC marks in hematopoietic cells. It has been postulated that hmC might represent a step toward cytosine demethylation, but opposite data have been reported regarding the relation between hmC and mC levels in human samples (Figueroa et al., 2010; Ko et al., 2010a). It will be important to further investigate this point in the light of the recent description of *DNMT3A* mutation in human AML (Ley et al., 2010). *Tet2* also controls homeostasis of murine hematopoietic stem and progenitor cells, in keeping with the reported role of *TET2* in ES cell differentiation (Koh et al., 2011). Indeed, both *Tet2*-deficient models present an amplification of the hematopoietic stem/progenitor cell population in vivo associated with a competitive advantage in bone marrow transplantation assays and an increased self-renewal in vitro. Importantly, the gene-trap/hypomorph and conditional models exhibit some differences. For example, the gene-trap animals develop bona fide myeloid tumors that are transplantable to secondary recipients, whereas conditional animals did not develop fatal disease during the 15 months of follow-up. In keeping with the observation that *TET2* is mutated in half of human CMML patients



B

Fractions	Q481X	P761fs
CD34+	-	-
CD34+CD38+	-	-
CD3+	-	-
CD3-	+	+
CD34-CD3-CD19+	-	-
CD34-CD3-CD19-CD14+	-	-
CD34-CD3-CD19-CD14-	+	+
PNN	-	-

C

	P761fs/Q481wt	P761wt Q481wt	Total
CD34+ colonies[1]	6 (7.1%)	78	**84**
CD34+ colonies[2]	6 (6.5%)	87	**93**
CD34+CD38- colonies[2]	1 (2.2%)	44	**45**

D

CD34-CD3-CD19-CD14- cells	Q481X	P761fs
1	+	+
2	-	+
3	-	+
4	+	+
5	-	+
6	+	+
7	-	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+

E

Gene	Localisation	Nucleotide change	Normal (CD3+)	Tumour (CD14-)	Mutation	Consequence	Prediction (Polyphen 2)
IGSF21	chr1 : 18692117-18692118	C>G	0/47 (0%)	19/37 (51%)	D314E	missense	probably damaging
CRIM1	chr2 : 36764605-36764606	C>T	1/62 (2%)	35/70 (50%)	T847I	missense	possibly damaging
CLSTN2	chr3 : 140167363-140167364	G>A	5/98 (5%)	48/118 (41%)	W266X	nonsense	no prediction
MCCC2	chr5 : 70939645-70939646	G>A	5/110 (5%)	57/122 (47%)	G358E	missense	probably damaging
ZBTB16/PLZF	chr11 : 114112936-114112937	C>T	5/51 (10%)	36/68 (53%)	A501V	missense	benign
ZC3H10	chr12 : 56514775-56514776	C>A	3/62 (5%)	36/84 (43%)	L144I	missense	probably damaging
ZNF774	chr15 : 90904097-90904098	DelC	1/106 (1%)	42/114 (37%)	P346fs	adds 80 aa before stop	no prediction
TET2	chr4 : 106 156 504-106 156 505	C>T	6/256 (2%)	140/389 (36%)	Q481X	nonsense	no prediction
TET2	chr4 : 106157378-106157379	DelC	8/228 (4%)	184/339 (54%)	P761fs	adds 51 aa before stop	no prediction

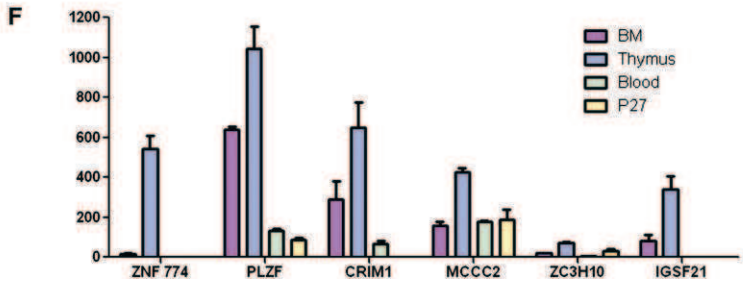


Figure 6. *TET2* and Other Acquired Mutations Are Found in Hematopoietic Progenitors

(A) *TET2* mutation status in flow-sorted subpopulations from blood samples from patient 27. The *TET2* sequences in sorted subpopulations are shown. Both mutations are detected in the CD3- and CD34-CD3-CD19-CD14- populations, whereas only P761fs is observed as a trace (indicated by a star) in the other fractions.

(B) Summary of results presented in (A).

(Kohlmann et al., 2010; Kosmider et al., 2009b; Tefferi et al., 2009c), these results demonstrate that alteration of Tet2 functions contribute to the development of hematologic disorders with characteristics reminiscent of human CMML. Of note, we did not detect global alteration of 5hmC levels in the lineage$^-$ cells of the gene-trap model. It is possible that undetected subtle reduction of 5hmC marks is sufficient for the alteration of the hematopoietic progenitor compartment observed in both models. The observation that heterozygous animals present similar hematopoietic abnormalities supports this idea. However, we cannot exclude that susceptibility to transformation is controlled by another function of Tet2, as proposed recently for Tet1. Together, these results demonstrate that inactivation of Tet2 catalytic function and deregulation of 5hmC marks alter homeostasis of the hematopoietic progenitors and warrant further studies of *Tet2* expression level and structure in inactivation models.

Second, we observed that *Tet2* inactivation alters also T and B cell differentiation in mice. Of note, we observed the amplification of an aberrant CD19$^+$B220^{low} lymphoid population. We demonstrated that, in human malignancies, *TET2* is mutated in 2.0% of B cell, 11.9% of T cell lymphomas and ~30% of AITL samples. Extensive molecular and cellular analyses showed that *TET2* mutations are present in cells endowed with both myeloid and lymphoid potential in at least, a fraction of the *TET2*-mutated lymphoma patients. In some lymphoma patients, hematopoietic stem cells present mutation of one *TET2* allele in hematopoietic stem cells while lymphoma cells present mutation of both copies. Deep resequencing of the exome in a T cell lymphoma patient identified several mutations that are present with *TET2* mutation(s) either at the stem/progenitor cell level or only at latter steps of lymphoma development. Among those identified in early hematopoietic progenitor cells (i.e., *PLZF*, *CRIM1*, and *ZNF774*), PLZF has previously been shown to play a role in early hematopoietic progenitor biology (Dick and Doulatov, 2009). Although functional analyses will be required to assess the role of these mutations in lymphoma progression, these data suggest that *TET2* hemizygous mutation cooperates with additional mutations, including mutation of the second *TET2* copy. These findings suggest that in both mouse and human fine-tuning of *TET2* expression and activity is essential for normal homeostasis of the hematopoietic system and that loss of one allele of *TET2* contribute to disease development.

Finally, our results support the idea that disruption of Tet2 function leads to alteration of the homeostasis within the hematopoietic stem/progenitor compartment but per se does not induce a specific hematopoietic malignancy. We propose that Tet2 alteration, when it occurs in a stem/progenitor cell, predisposes to the development of malignancies in cooperation with secondary mutations that drives the phenotype of the disease. Combination of Tet2 deficiency with oncogenes, such as JAK2^{V617F}, will shed light on the oncogenic cooperation observed in human tumorigenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of the *Tet2*^{LacZ} and *Tet2*^{floxed} Alleles and Animal Analyses

Gene-trap mouse embryonic stem cell clone (SIGTR ES cell line AN0709: *Tet2*$^{Gt(AN0709)Wtsi}$, herein named *Tet2*^{LacZ}) carrying a β-galactosidase-neomycin (β-geo) resistance fusion cassette in *Tet2* gene were obtained from UC Davis Mutant Mouse Regional Resource Center (http://www.mmrrc.org) to generate gene-trap mouse line and the insertion of the β-geo cassette in intron 9 of *Tet2* was routinely genotyped on tail DNA by multiplexed polymerase chain reaction (PCR) using 5′-CAGCCAGGAAGACACTTACC-3′ and 5′-GACACCGATCTTGCTGGTTG-3′ primers into intron 9 to detect wild-type *Tet2* allele and 5′-CGCCTTGCAGCACATCCC-3′ and 5′-GGCCTTCCTGTA GCCAGC-3′ primers into the β-galactosidase sequence (and after the splicing donor site) to detect gene-trap allele (*Tet2*$^{LacZ/LacZ}$).

Mice harboring *Tet2* allele with exon 11 flanked by two *loxP* sites introduced in intron 10 and in the 3′ untranslated region of exon 11 (*Tet2*$^{Lox/Lox}$; "floxed allele") were generated by the Clinique de la Souris (Strasbourg, France) and intercrossed with mice expressing Cre recombinase under the control of the type I interferon-inducible Mx1 murine promoter (transgene referred as Mx1-Cre). PCR on tail DNA using 5′-GGCAGAGGCATGTTGAATGA-3′ and 5′-TAGACAAGCCCTGCAAGCAAA-3′ primers allowed to distinguish between wild-type and floxed allele. The *Tet2*^{Lox} allele was backcrossed into C57BL/6 background for at least six generations using speed-congenics (Harlan Laboratories) prior to analysis.

Acute inactivation of *Tet2* in 6- to 10-week-old Mx1-Cre$^+$*Tet2*$^{Lox/Lox}$ was performed by intraperitoneal injections (three injections every other day) of 800 μg poly(I:C)-LMW (InvivoGen, San Diego). Induction of Cre recombinase and efficient excision of floxed allele was confirmed by multiplex PCR using 5′-GGCAGAGGCATGTTGAATGA-3′, 5′-TAGACAAGCCCTGCAAGCAAA-3′ and 5′-GTGTCCCACGGTTACACACG-3′ primers that discriminated between floxed and deleted allele, respectively 305 and 237 bp. Therefore, we used the following nomenclature: Mx1-Cre$^+$*Tet2*$^{Lox/Lox}$ = *Tet2*$^{-/-}$, Mx1-Cre$^-$*Tet2*$^{Lox/Lox}$ = *Tet2*$^{+/+}$.

Competitive transplantations were performed by transplanting equal numbers of total bone marrow cells from CD45.1$^-$CD45.2$^+$ *Tet2*-deficient and CD45.1$^+$CD45.2$^+$ wild-type animals into lethally irradiated CD45.1$^+$CD45.2$^-$ recipients. For LSK cells transplantation, LSK cells were purified by flow cytometry from *Tet2*-deficient animals and 4000 LSK cells supplemented with 1×10^6 total bone marrow cells from wild-type were injected to lethally irradiated recipients. Expression of CD45.1 and CD45.2 was followed by flow cytometry on blood cells every month and animals were analyzed at 4 months after transplantation.

Animal experiments were conducted according to the Institut Gustave Roussy Institutional guidelines and authorized by the Direction Départementale des Services Vétérinaires du Val de Marne.

Patient Samples Collection

Lymph node, peripheral blood, and bone marrow samples from the patients were obtained with their informed consent and the approval of the local Research Ethics Committees (Centre Henri Becquerel, Pitié-Salpétrière, and Cochin hospitals). Additional information on patient samples is available in Tables S2 and S3.

(C) Genotype of colonies obtained from sorted single CD34$^+$ cells. [1] and [2] correspond to two successive blood samples at a 4-month interval. Only the P761fs mutation is observed in CD34$^+$ (~7%) and CD34$^+$CD38$^-$ (2.2%) colonies. No P761fs positive colony was observed out of 40 CD34$^+$CD38$^+$ single-cell-derived colonies (data not shown).
(D) Single-cell analyses show the presence of both *TET2* mutations in the same cell.
(E) Somatic mutations identified through exome analyses of patient 27.
(F) Expression level of the mutated genes in normal tissues and tumor sample. Expression levels were normalized with respect to *GUSB* expression.
See also Figure S6 and Table S3.

Flow Cytometry, Cell Sorting, and Purification

Total white blood cells, obtained from peripheral blood after lysis of red blood cells, and single-cell suspensions from bone marrow, spleen and thymus were stained in toto in PBS supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) with fluorochrome-conjugated mouse antibodies raised against specific markers of hematopoietic lineages (BD Biosciences PharMingen, except otherwise mentioned). Additional information on antibody clones is available in Supplemental Methods. Viability of cells was confirmed by using the Sytox Blue (Invitrogen) viability marker. Flow cytometric analysis and cell sorting were performed using a FACSCantoII Flow Cytometer (BD Biosciences) and a MoFlow (Becton Dickinson) or a FACSAriaIII (BD Biosciences), respectively. Immunophenotypic data were analyzed using the FlowJo Version 7.2.4 software (TreeStar).

For human samples, bone marrow or peripheral blood mononuclear cells, lymphocytes, and granulocytes were isolated and stored in liquid nitrogen as viable cells in FBS with 10% dimethyl-sulfoxide (DMSO, Sigma). Patients were selected on DNA availability. Their clinical and biological characteristics are summarized in Table S2. Diagnoses were made by standard international criteria. Cells were purified using Miltenyi beads according the manufacturer instructions. When mentioned, cells were sorted after labeling with PE–CD34 and APC–CD38 antibodies (Immunotech) using a FACSDiva cell sorter (Becton Dickinson).

In Vitro Clonogenic Assays

Sorted $CD34^+$ cells were seeded at one cell per well on methylcellulose in MEM alpha medium supplemented with 10% FBS (Stem Cell Technologies), and a cocktail of early cytokines (thrombopoietin [TPO], interleukin [IL-3], Flt3-L, Stem Cell Factor [SCF], erythropoietin [EPO], granulocyte-colony stimulating factor [G-CSF], granulocyte/macrophage-colony stimulating factor [GM-CSF] and IL-6). After 2 weeks, individual clones were collected for further genotyping.

For patient 2, total mononuclear cells were seeded in 2% standard methylcellulose supplemented with 25% FBS (Stem Cell Technologies), and a cocktail of cytokines as described.

Nucleic Acid Methods

DNA and RNA were extracted using commercial kits (QIAGEN or Roche). Polymerase chain reaction (PCR) and direct sequencing reaction were performed using standard conditions with primers available upon request. Nucleotide sequences were compared to wild-type human genomic sequence present in the databases (genome.ucsc.edu). All observed mutations were scored on both strands. Additional information on exome sequencing is available in Supplemental Experimental Procedures.

In Vitro Differentiation Assays

LSKs (5×10^2), total BM (5×10^4), and spleen cells (5×10^4) isolated from mutant or control mice were cultured in methylcellulose-based medium (MethoCult M3434; StemCell Technologies) and scored for CFUs (colony-forming units) using combined scoring for burst-forming unit erythroids (BFU-Es), CFU-megakaryocytes (CFU-Mks), CFU-granulocyte macrophages (CFU-GMs), and CFU-granulocyte erythroid macrophage megakaryocytes (CFU-GEMMs) after 7 days. All live colonies were counted for each of the two 35 mm dishes plated per sample.

Quantitative PCR

cDNA was synthesized from total RNA purified (using the RNeasy microkit, QIAgen) from sorted LSK, common myeloid progenitor (CMP), megakaryocyte-erythrocyte progenitor (MEP), and granulocyte-macrophage progenitor (GMP) populations using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). TaqMan probes were purchased from Applied Biosystems (*Tet1*: Mm01169089; *Tet2* [exon 9–10]: Mm00524395_m1; *Tet2* [exon 10–11]: Mm01312907; *Tet3*, Mm01184936; *Abl1*, Mm00802038). *Tet2* (exon 3–4) transcript were detected using the following primers; Primer1: 5′-agaatcagatactcctggtgaacaaa-3′, Primer2: 5′-cctagatgggtataataaggagcttcat-3′, Probe: 5′ FAM-tctggattgcatccttcacatttgccat-3′TAM. *Tet2-LacZ* fusion transcript was detected using the following primers and probe; Primer1 (*Tet2* exon 9): 5′-cccacagagaccagcagaaca-3′, Primer2 (*LacZ*): 5′-tgcgttcttcttctttggttttc-3′, Probe: 5′FAM-cctgggaccactgtactgccatttgg-3′TAM. The expression level of each gene was assessed by qRT-PCR with an ABI PRISM 7500 and calculated following the ΔΔCt method; each sample was analyzed in triplicate and normalized with *Abl1* and *GusB* expression (Applied Biosystems Mm00802038_g1 and Mm03003537_s1, respectively).

Statistical and Quantification Analyses

Results are expressed as mean values ± SEM. Statistical significance of differences between the results was assessed using a 2-tailed unpaired Student's t test, performed using Prism (GraphPad software, version 5.03). p values < 0.05 were considered statistically significant. Quantification of the 5mC and 5hmC signals was performed by dot-blotting DNA and using antibodies from Eurogentec (1/500 dilution) and Active Motif (1/10,000 dilution) respectively. Signal was quantified using GelEval (FrogDance software, version 1.32).

ACCESSION NUMBERS

Microarray procedures and data used in this publication have been deposited in the European Bioinformatics Institute (EBI) database with the following accession number: E-TABM-1161.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes six figures, three tables, and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at doi:10.1016/j.ccr.2011.06.003.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. R. L. Levine and Omar Abdel-Wahab for valuable help with resequencing, Dr. Paola Rivera-Munhoz and Dr. Sophie Ezine for helpful discussions, and Olivia Bawa for histopathological analysis. The work was funded by grants from INSERM, Institut National du Cancer (INCa), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Fondation Gustave Roussy and by NIH/NCI grants CA129831 and CA129831-03S1 (L.G.). C.Q. is the recipient of a fellowship from the region île de France.

Received: February 24, 2011
Revised: May 12, 2011
Accepted: June 8, 2011
Published online: June 30, 2011

REFERENCES

Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., et al. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. Blood *114*, 144–147.

Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., Heguy, A., Bueso-Ramos, C., Kantarjian, H., Levine, R.L., and Verstovsek, S. (2010). Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res. *70*, 447–452.

Beer, P.A., Delhommeau, F., Lecouedic, J.P., Dawson, M.A., Chen, E., Bareford, D., Kusec, R., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., et al. (2010). Two routes to leukemic transformation following a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. Blood *115*, 2891–2900.

Couronné, L., Lippert, E., Andrieux, J., Kosmider, O., Radford-Weiss, I., Penther, D., Dastugue, N., Mugneret, F., Lafage, M., Gachard, N., et al. (2010). Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. Leukemia *24*, 201–203.

Cozzio, A., Passegué, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. Genes Dev. *17*, 3029–3035.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. N. Engl. J. Med. *360*, 2289–2301.

Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. Blood *112*, 4793–4807.

Dick, J.E., and Doulatov, S. (2009). The role of PLZF in human myeloid development. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1176*, 150–153.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell *18*, 553–567.

Goardon, N., Marchi, E., Atzberger, A., Quek, L., Schuh, A., Soneji, S., Woll, P., Mead, A., Alford, K.A., Rout, R., et al. (2011). Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. Cancer Cell *19*, 138–152.

Huntly, B.J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., et al. (2004). MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. Cancer Cell *6*, 587–596.

Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature *466*, 1129–1133.

Jaffe, E.S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program, 523–531.

Jankowska, A.M., Szpurka, H., Tiu, R.V., Makishima, H., Afable, M., Huh, J., O'Keefe, C.L., Ganetzky, R., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2009). Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood *113*, 6403–6410.

Jones, D. (2010). Functional classification of peripheral T-cell lymphomas as an approach to improve outcome prediction and therapy selection. Semin. Hematol. *47* (*Suppl 1*), S1–S4.

Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A.M., Pape, U.J., Tahiliani, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Koh, K.P., Ganetzky, R., et al. (2010a). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. Nature *468*, 839–843.

Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A.M., Pape, U.J., Tahiliani, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Koh, K.P., Ganetzky, R., et al. (2010b). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. Nature *468*, 839–843.

Kohlmann, A., Grossmann, V., Klein, H.U., Schindela, S., Weiss, T., Kazak, B., Dicker, F., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., et al. (2010). Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. J. Clin. Oncol. *28*, 3858–3865.

Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., et al. (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. Cell Stem Cell *8*, 200–213.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Cheok, M., Grabar, S., Della-Valle, V., Picard, F., Viguié, F., Quesnel, B., Beyne-Rauzy, O., Solary, E., et al; Groupe Francophone des Myélodysplasies. (2009a). TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). Blood *114*, 3285–3291.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Ciudad, M., Racoeur, C., Jooste, V., Vey, N., Quesnel, B., Fenaux, P., Bastie, J.N., Beyne-Rauzy, O., et al; Groupe Francophone des Myélodysplasies. (2009b). TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica *94*, 1676–1681.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science *324*, 929–930.

Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M.G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A.G., Raymakers, R.A., et al. (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat. Genet. *41*, 838–842.

Ley, T.J., Ding, L., Walter, M.J., McLellan, M.D., Lamprecht, T., Larson, D.E., Kandoth, C., Payton, J.E., Baty, J., Welch, J., et al. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. *363*, 2424–2433.

Nibourel, O., Kosmider, O., Cheok, M., Boissel, N., Renneville, A., Philippe, N., Dombret, H., Dreyfus, F., Quesnel, B., Geffroy, S., et al. (2010). Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. Blood *116*, 1132–1135.

Saint-Martin, C., Leroy, G., Delhommeau, F., Panelatti, G., Dupont, S., James, C., Plo, I., Bordessoule, D., Chomienne, C., Delannoy, A., et al; French Group of Familial Myeloproliferative Disorders. (2009). Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. Blood *114*, 1628–1632.

Schaub, F.X., Looser, R., Li, S., Hao-Shen, H., Lehmann, T., Tichelli, A., and Skoda, R.C. (2010). Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. Blood *115*, 2003–2007.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., and Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science *324*, 930–935.

Tefferi, A., Levine, R.L., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Finke, C.M., Mullally, A., Li, C.Y., Pardanani, A., and Gilliland, D.G. (2009a). Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRA correlates. Leukemia *23*, 900–904.

Tefferi, A., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Patnaik, M.M., Hanson, C.A., Pardanani, A., Gilliland, D.G., and Levine, R.L. (2009b). Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. Leukemia *23*, 1343–1345.

Tefferi, A., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Patnaik, M.M., Hanson, C.A., Pardanani, A., Gilliland, D.G., and Levine, R.L. (2009c). Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. Leukemia *23*, 1343–1345.

Tefferi, A., Pardanani, A., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Gangat, N., Finke, C.M., Schwager, S., Mullally, A., et al. (2009d). TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. Leukemia *23*, 905–911.

Viguié, F., Aboura, A., Bouscary, D., Ramond, S., Delmer, A., Tachdjian, G., Marie, J.P., and Casadevall, N. (2005). Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? Leukemia *19*, 1411–1415.

Cancer Cell *20*

Supplemental Information

TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis

Cyril Quivoron, Lucile Couronné, Véronique Della Valle, Cécile K. Lopez, Isabelle Plo, Orianne Wagner-Ballon, Marcio Do Cruzeiro, Francois Delhommeau, Bertrand Arnulf, Marc-Henri Stern, Lucy Godley, Paule Opolon, Hervé Tilly, Eric Solary, Yannis Duffourd, Philippe Dessen, Hélène Merle-Beral, Florence Nguyen-Khac, Michaëla Fontenay, William Vainchenker, Christian Bastard, Thomas Mercher, Olivier A Bernard

Inventory of supplemental information

Supplemental Data:
Figure S1 related to Figure 1
Figure S2 related to Figure 2
Figure S3 related to Figure 3
Table S1 related to Figure 3
Figure S4 related to Figure 4
Figure S5 related to Figure 5
Table S2 related to Figure 5
Figure S6 related to Figure 6
Table S3 related to Figure 6

Supplemental Experimental Procedures

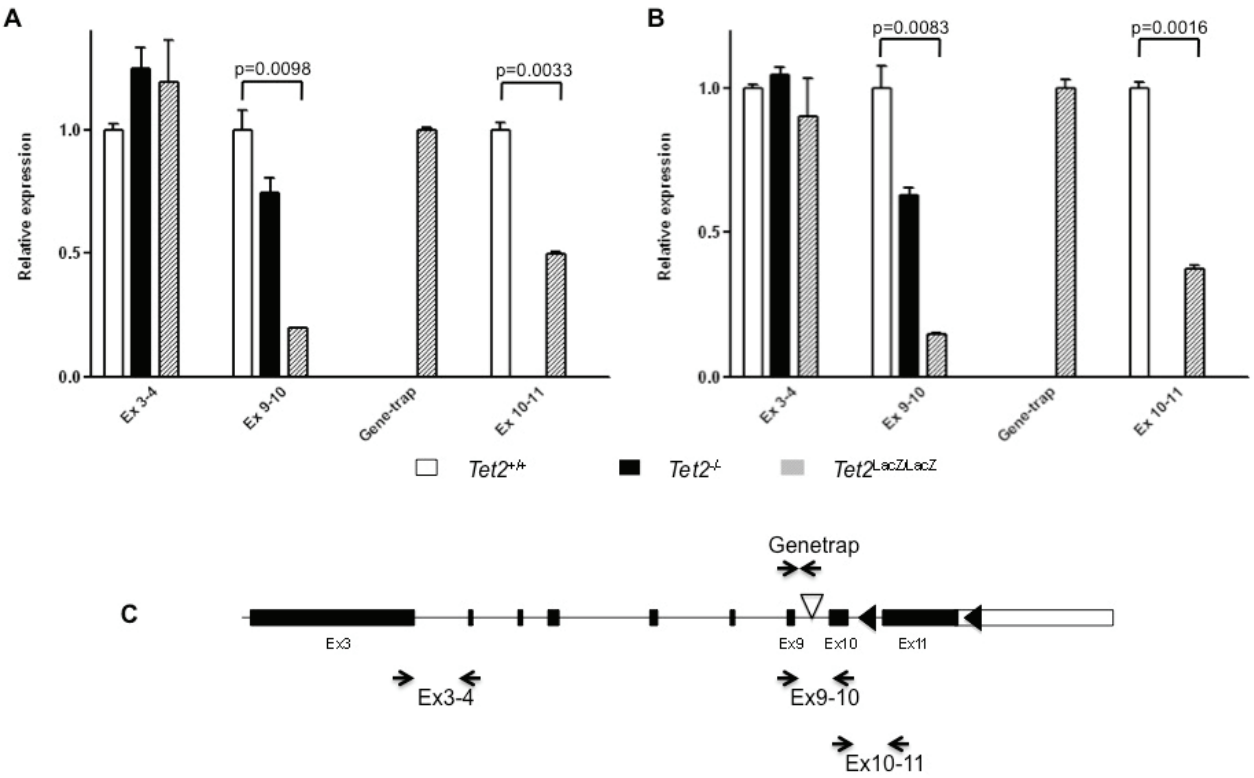
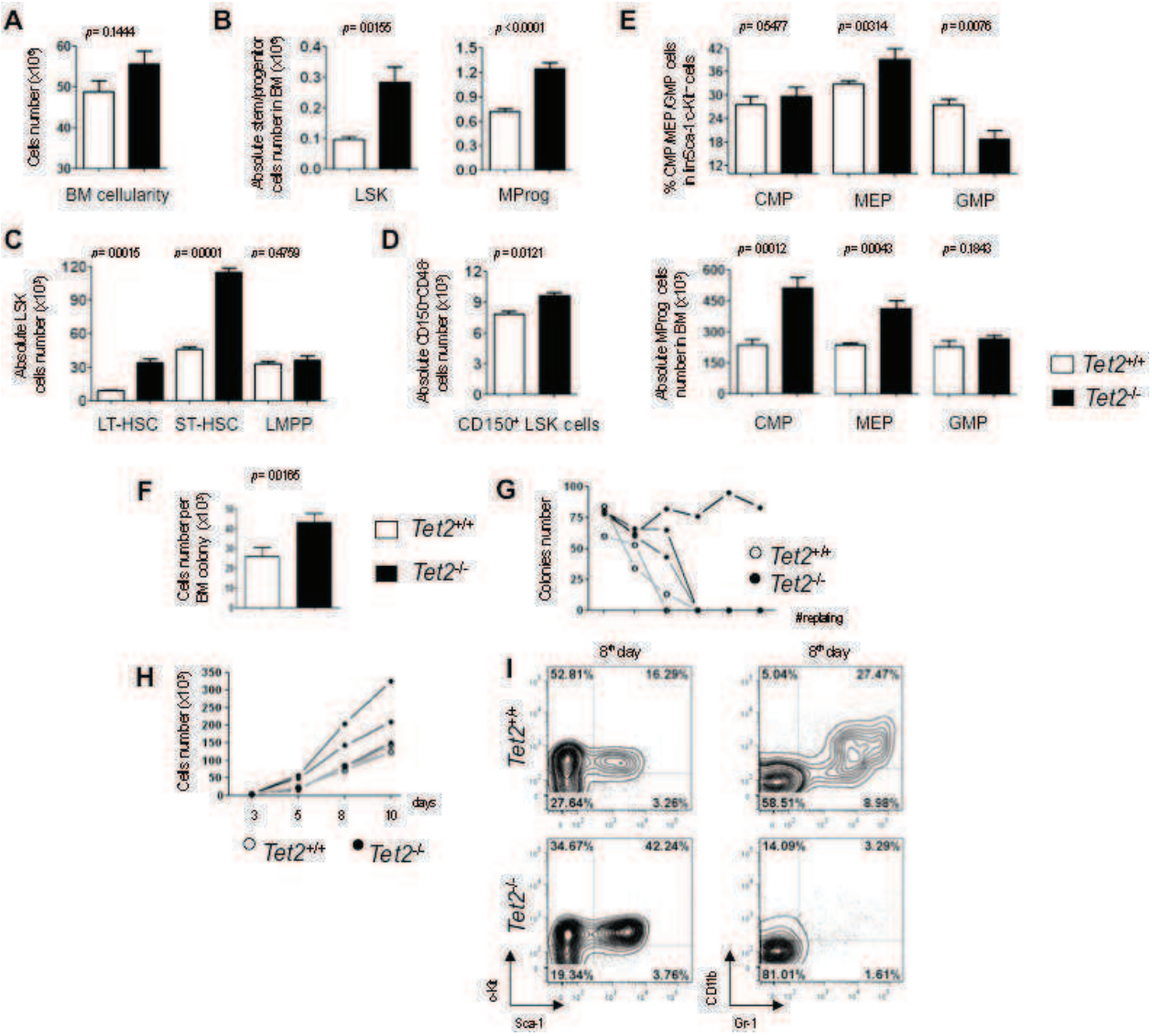
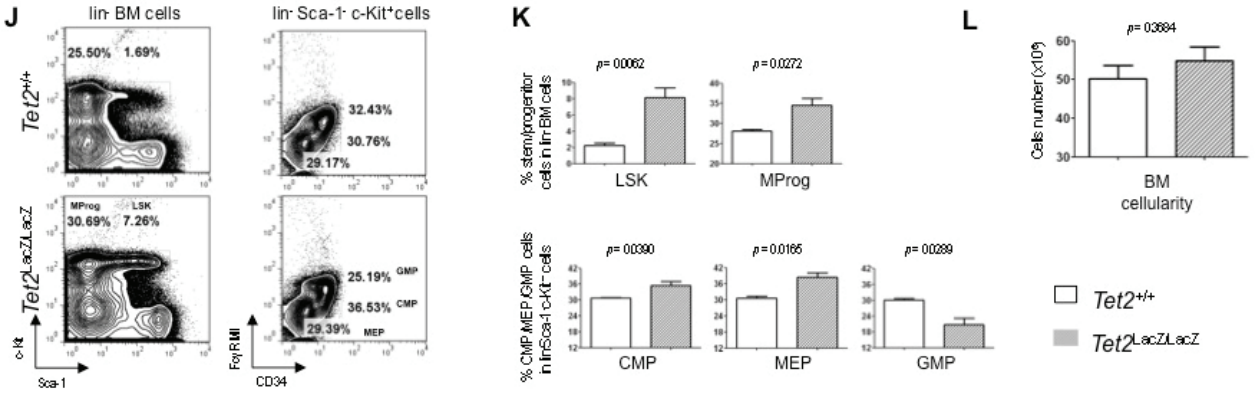


Figure S1: Quantitative RT-PCR analysis of *Tet2*^{LacZ} allele (related to Figure 1).

Quantitative RT-PCR analysis of expression of murine *Tet2* gene in Lin- progenitors from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals using assays spanning exon 3-4, exon 9-10, exon 10-11 boundaries and one gene-trap allele specific assay spanning the Tet2-βGal fusion. Results are normalized with respect to *GUSB* (**A**: left panel) and *Abl1* expression (**B**: right panel) and represented relatively to expression in control mice samples except for the gene-trap probe.
C: Schematic representation of the primer used in A and B.


A
p= 0.1444
Cells number (x10³)
BM cellularity
B
p= 00155
p < 0.0001
Absolute stem/progenitor cells number in BM (x10³)
LSK
MProg
E
p= 05477
p= 00314
p= 0.0076
% CMP MEP GMP cells in linSca-1 c-Kit⁻ cells
CMP
MEP
GMP
C
p= 00015
p= 00001
p= 04759
Absolute LSK cells number (x10³)
LT-HSC
ST-HSC
LMPP
D
p= 0.0121
Absolute CD150⁺CD48⁻ cells number (x10³)
CD150⁺ LSK cells
p= 00012
p= 00043
p= 0.1843
Absolute MProg cells number in BM (x10³)
CMP
MEP
GMP
Tet2+/+
Tet2-/-
F
p= 00165
Cells number per BM colony (x10³)
Tet2+/+
Tet2-/-
G
Colonies number
Tet2+/+
Tet2-/-
#replating
H
Cells number (x10³)
days
Tet2+/+
Tet2-/-
I
8th day
8th day
52.81%
16.29%
27.64%
3.26%
5.04%
27.47%
58.51%
8.98%
34.67%
42.24%
19.34%
3.76%
14.09%
3.29%
81.01%
1.61%
Tet2+/+
Tet2-/-
c-Kit
Sca-1
CD11b
Gr-1


J
lin⁻ BM cells
lin⁻ Sca-1⁻ c-Kit⁺cells
25.50%
1.69%
32.43%
30.76%
29.17%
MProg
LSK
30.69%
7.26%
25.19%
GMP
36.53%
CMP
29.39%
MEP
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ
c-Kit
Sca-1
FcγRIII
CD34
K
p= 00062
p= 0.0272
% stem/progenitor cells in lin⁻BM cells
LSK
MProg
p= 00090
p= 0.0165
p= 00289
% CMP MEP GMP cells in linSca-1 c-Kit⁻ cells
CMP
MEP
GMP
L
p= 03684
Cells number (x10³)
BM cellularity
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ

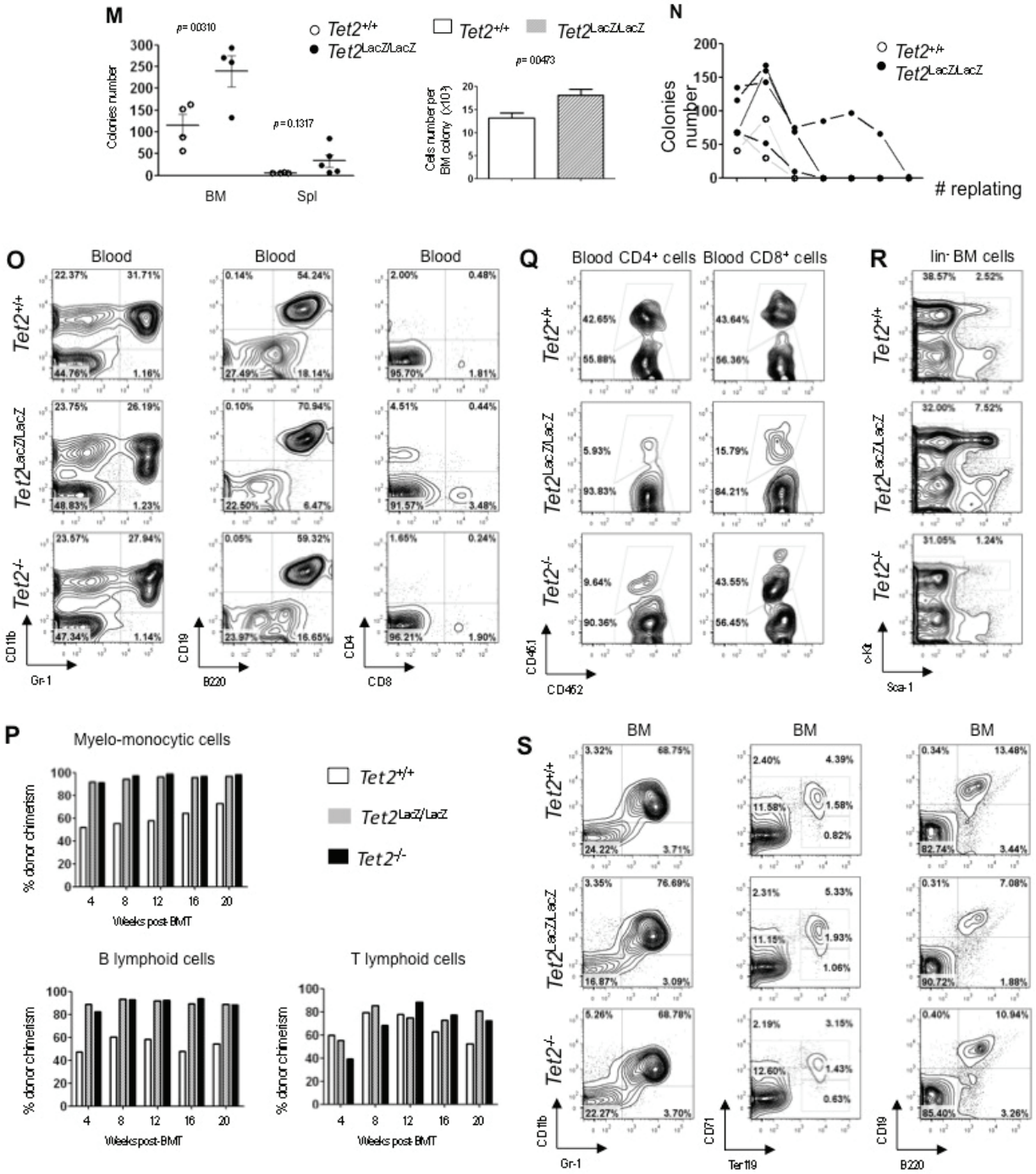


Figure S2: Stem and progenitor cells analyses (related to Figure 2).

A: Absolute number of cells within bone marrow from 2 femurs and 2 tibias of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals (*n*=6 per genotype), 4-6 months post-induction, presented as mean ± SEM (p-values are calculated by 2-tailed unpaired Student's t-test).

B: Representation of the results exemplified in Figure 2B as absolute cells number. Data are presented as mean ± SEM. *Tet2*$^{+/+}$ (*n*=6; white histogram) and *Tet2*$^{-/-}$ (*n*=6; black histogram) animals.

C: Absolute cells number of LSK subpopulations in *Tet2*$^{+/+}$ (*n*=6; white histogram) and *Tet2*$^{-/-}$ (*n*=6; black histogram) mice, 4-6 months post-induction; LT-HSC (Long Term-HSC, lin^{-}Sca-1^{+}c-Kit^{+}CD34^{-}Flt3^{-}), ST-HSC (Short Term-HSC, lin^{-}Sca-1^{+}c-Kit^{+}CD34^{+} Flt3^{-}), and

LMPP (Lymphoid-Primed Multipotent Progenitors, lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$CD34$^+$ Flt3$^+$). Data shown are mean cells number ± SEM.

D: Absolute CD150$^+$CD48$^-$ LSK cells number in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals, 4-6 months post-induction (*n*=3 per genotype). Data shown are mean cells number ± SEM.

E: Percentages of CMP/MEP/GMP cells in lin$^-$Sca-1$^-$c-Kit$^+$ myeloid progenitor cells (upper panels), and absolute cells number (lower panels) from *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice 4-6 months post-induction (*n*=6 per genotype). Results are presented as mean ± SEM.

F: Average number of cells per colony obtained from bone marrow cell cultures as described in Figure 2C (*n*=6 per genotype). Data shown are mean cells number ± SEM.

G: Clonogenic activity of bone marrow cells of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice (*n*=3 per genotype) 4 months post-induction in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored and 5x10^4 cells were replated in new M3434 medium every 7 days.

H: *In vitro* proliferation of LSK in liquid cultures. 500 LSK cells were flow-sorted and plated in RPMI1640 supplemented with 10% FBS, 15 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 25 ng/ml IL-11, 20 ng/ml SCF, 50 ng/ml Flt3L, 25 ng/ml EPO and 25 ng/ml TPO. Total number of viable cells was determined using trypan-blue exclusion method (lower panel, *n*=3 per genotype).

I: A representative flow cytometrical profile after 8 days of culture using c-Kit, Sca1, CD11b and Gr1 indicate that c-Kit$^+$Sca1$^+$ cells are maintained more efficiently in *Tet2*$^{-/-}$ cell cultures while differentiation toward the myeloid CD11b$^+$Gr1$^+$ lineage is inhibited compared to *Tet2*$^{+/+}$ cell cultures.

J: Representative flow cytometrical analysis of hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ *vs*. wild-type control animals. Analysis was performed with 7-month-old mice. The percentages of each population within lineage$^-$ bone marrow cells (left panels) or within lin$^-$Sca-1$^-$c-Kit$^+$ myeloid progenitor cells (right panels) are indicated.

K: Representation of the results shown in A as a percentage of cells in lineage$^-$ bone marrow cells (upper panels), and as a percentage of CMP/MEP/GMP cells in myeloid progenitor cells (lower panels) from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=8; striped bars) and wild-type control (*n*=4; white bars) 4-8 month-old mice. Data are presented as mean ± SEM; p-values are calculated by 2-tailed unpaired Student's t-test.

L: Absolute number of cells within bone marrow (BM) from 2 femurs and 2 tibias of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=8) and control (*n*=4) 4-8 month-old animals presented as mean ± SEM.

M: Clonogenic activity of bone marrow (BM; 5x10^4) and spleen (Spl; 5x10^4) cells of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=4-5; black circles) and wild-type control (*n*=4; white circles) 8-10 month-old mice in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored after 7 days, and results are represented as mean colony number ± SEM (left panel) and average number of cells per colony (right panel).

N: Clonogenic activity of lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ LSK flow-sorted cells of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=4) and wild-type (*n*=2) 4-month-old mice in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored and 5x10^4 cells were replated in new M3434 medium every 7 days.

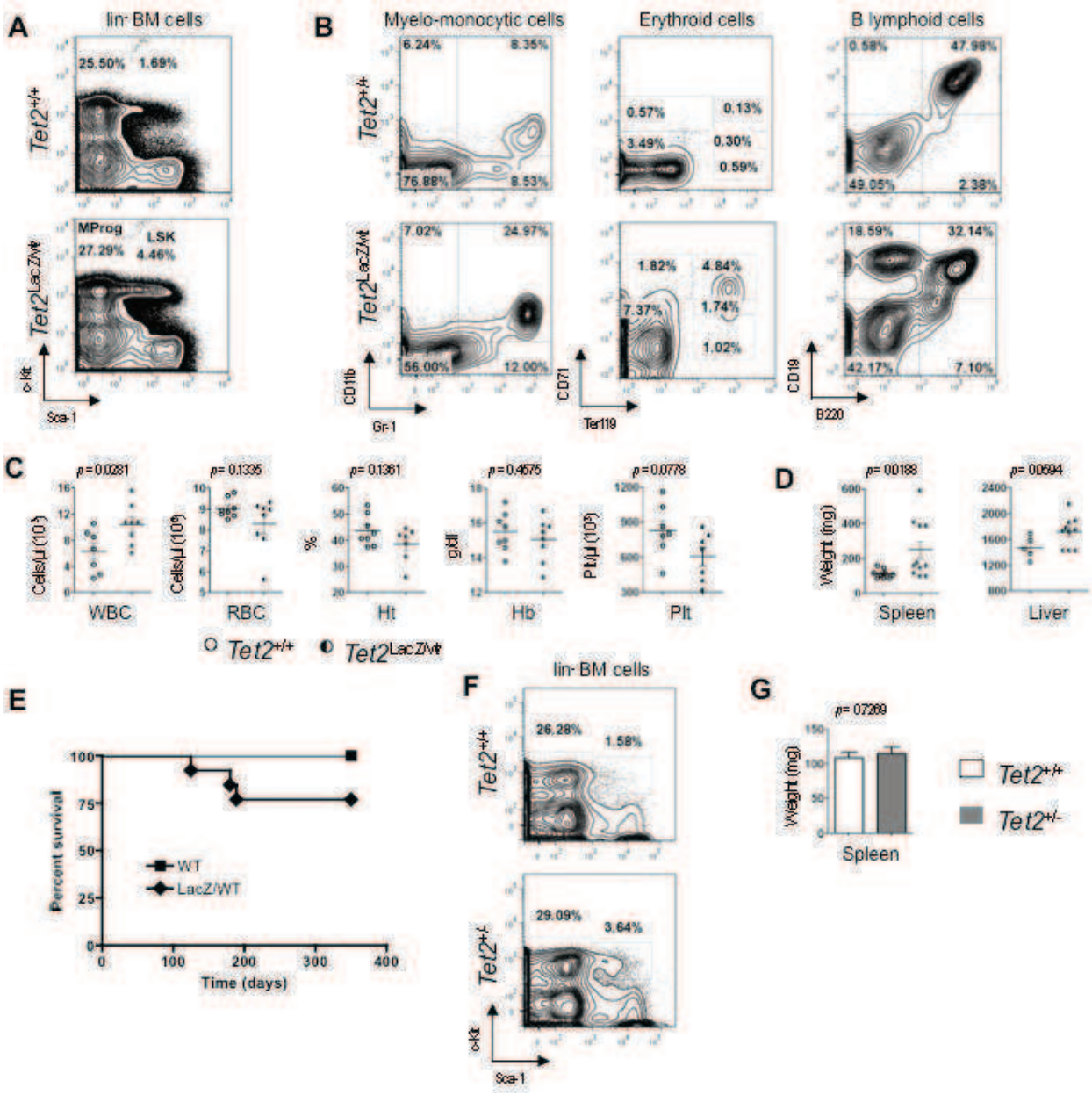
O: Representative flow cytometry profile of blood subpopulations shown in Figure 2F (analysis of CD45.2$^+$ donor chimerism in myelo-monocytic and lymphoid cells, 20 weeks post-BMT).

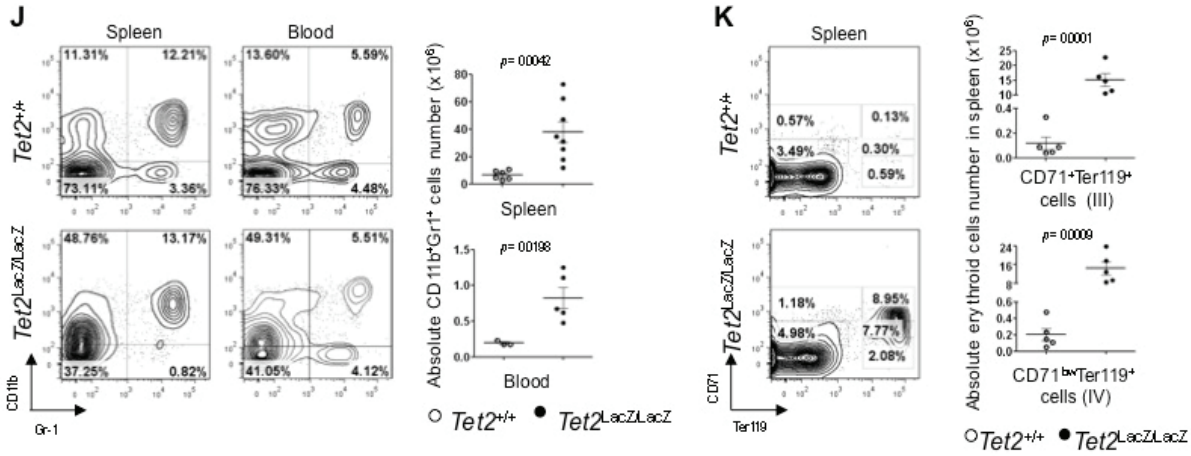
P: The percentages of donor chimerism in myelo-monocytic and lymphoid lineages in blood are given at the indicated time points post-BMT (*n*=2 mice per genotype).

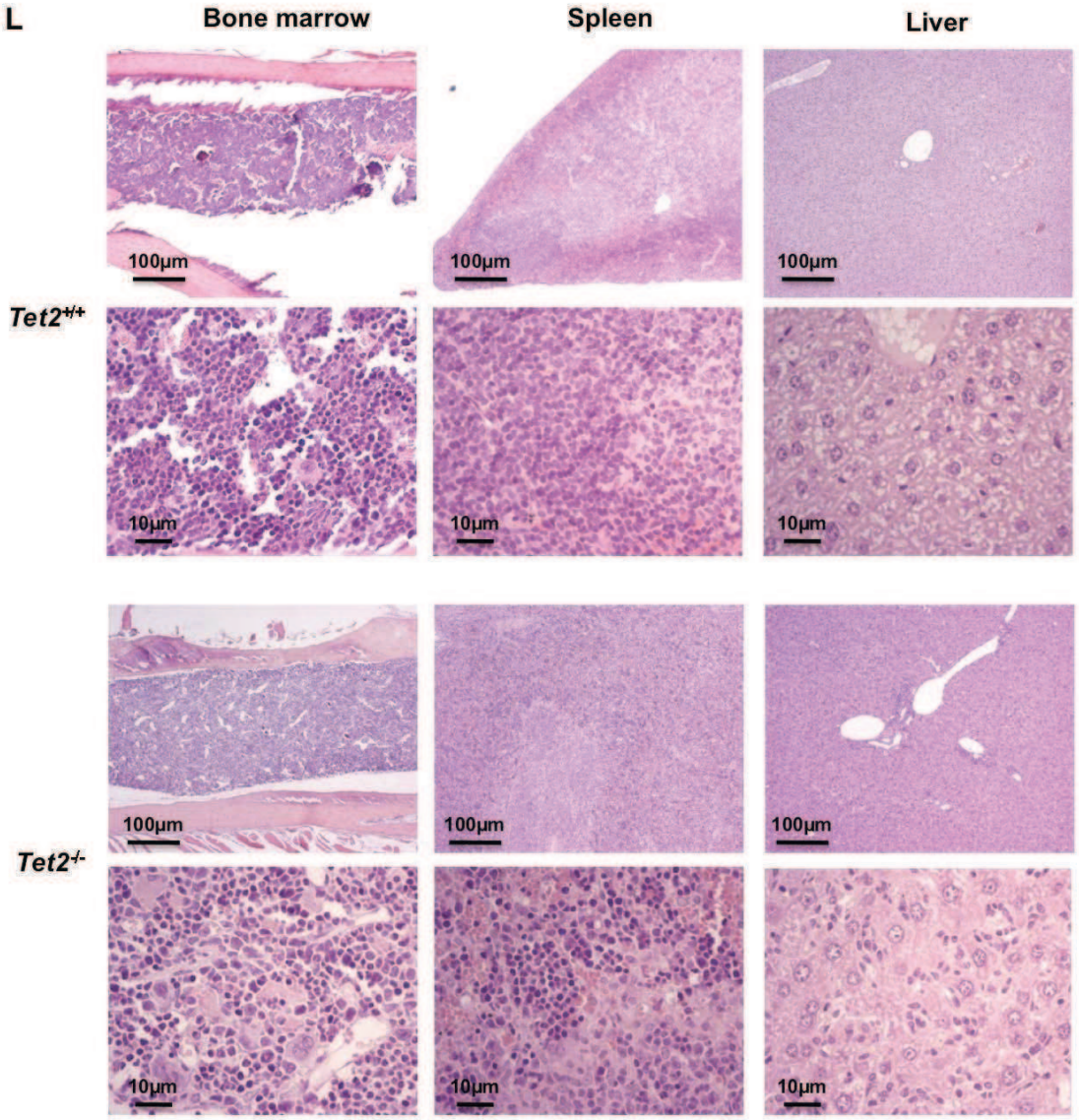
Q: Representative flow cytometry analysis of CD45.2$^+$ donor chimerism in T lymphoid cells, 20 weeks post-BMT.

R: Flow cytometrical analysis of hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow of secondary recipients, 20 weeks post-BMT. 95% of *Tet2*-deficient LSK cells are CD45.1$^-$CD45.2$^+$.

S: Representative flow cytometrical profile of in bone marrow subpopulations described in Figure 2H.


A
lin- BM cells
Tet2+/+
25.50%
1.69%
Tet2LacZ/Wt
MProg
27.29%
LSK
4.46%
c-Kit
Sca-1
B
Myelo-monocytic cells
Erythroid cells
B lymphoid cells
6.24%
8.35%
76.88%
8.53%
0.57%
0.13%
3.49%
0.30%
0.59%
0.58%
47.98%
49.05%
2.38%
7.02%
24.97%
56.00%
12.00%
1.82%
4.84%
7.37%
1.74%
1.02%
18.59%
32.14%
42.17%
7.10%
CD11b
Gr-1
CD71
Ter119
CD19
B220
C
p = 0.0281
p = 0.1335
p = 0.1361
p = 0.4675
p = 0.0778
Cells/µl (10³)
Cells/µl (10⁶)
%
g/dl
Plt/µl (10³)
WBC
RBC
Ht
Hb
Plt
Tet2+/+
Tet2LacZ/Wt
D
p = 00188
p = 00594
Weight (mg)
Spleen
Liver
E
Percent survival
WT
LacZ/WT
Time (days)
F
lin- BM cells
Tet2+/+
26.28%
1.58%
Tet2+/-
29.09%
3.64%
c-Kit
Sca-1
G
p = 07269
Weight (mg)
Spleen
Tet2+/+
Tet2+/-
H
p = 0.4441
p = 00049
p = 00461
p = 00416
p = 0.0301
Cells/µl (10³)
Cells/µl (10⁶)
%
g/dl
Plt/µl (10³)
WBC
RBC
Ht
Hb
Plt
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ
I
p = 0.0006
p = 0.0394
Weight (mg)
Spleen
Liver
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ


J
Spleen
Blood
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ
11.31%
12.21%
73.11%
3.36%
13.60%
5.59%
76.33%
4.48%
48.76%
13.17%
37.25%
0.82%
49.31%
5.51%
41.05%
4.12%
CD11b
Gr-1
Absolute CD11b+Gr1+ cells number (x10^6)
p= 00042
Spleen
p= 00198
Blood
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ
K
Spleen
0.57%
0.13%
3.49%
0.30%
0.59%
1.18%
8.95%
4.98%
7.77%
2.08%
CD71
Ter119
Absolute erythroid cells number in spleen (x10^6)
p= 00001
CD71+Ter119+ cells (III)
p= 00009
CD71bxTer119+ cells (IV)
Tet2+/+
Tet2LacZ/LacZ


L
Bone marrow
Spleen
Liver
Tet2+/+
Tet2-/-
100μm
10μm

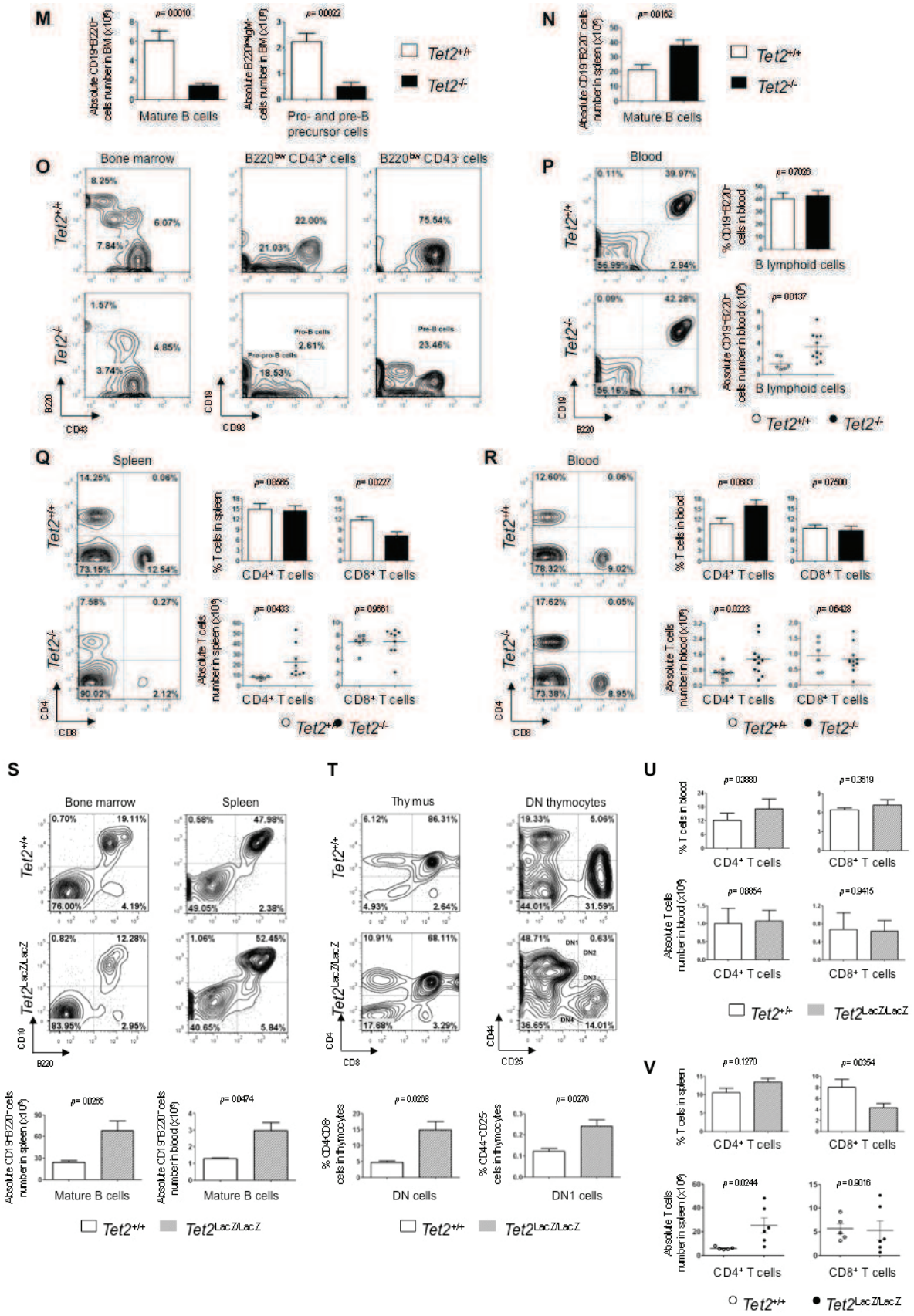


Figure S3: Phenotype of heterozygous *Tet2*$^{+/-}$ and *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and additional phenotype of homozygous animals (related to Figure 3).

A: Flow cytometry analysis of the LSK compartment in *Tet2*$^{LacZ/wt}$ animals (gated on lineage-negative cells).
B: Flow cytometry analysis of the splenocytes from *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and control animals.
C: Blood counts of *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and control animals.
D: Spleen and liver weight of *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and control animals.
E: Survival curve of *Tet2*$^{LacZ/wt}$ and control animals.
F: Flow cytometry analysis of the LSK compartment in *Tet2*$^{+/-}$ animals (gated on lineage-negative cells).
G: Spleen weight of *Tet2*$^{+/-}$ and control animals.
H: White blood cells (WBC), red blood cells (RBC) counts, hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), and platelets (Plt) counts in peripheral blood samples obtained from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=10-12; black circles) and control (*n*=7-8; white circles) 4-8 month-old animals. Results are presented as mean ± SEM (p-values calculated by 2-tailed unpaired Student's t-test).
I: Spleen and liver weights of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ *vs*. control animals (as in A).
J: Representative immunophenotypical analysis of the myelo-monocytic cells in the spleen and blood of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and control 8-month-old mice (left panels; percentages of total cells are represented). Absolute number of CD11b^{+}Gr1^{+} cells in spleen and blood from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=5-8) and control (*n*=3-6) 4-8 month-old animals are represented as mean ± SEM (right panels).
K: Representative flow cytometry analysis of the erythroid lineage in the spleen of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and control 4-month-old mice (left panels; percentages of total splenocytes after red blood cells lysis are indicated). Absolute number of erythroid cells in the spleen from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=5) and control (*n*=5) 4-8 month-old animals are represented as mean ± SEM (right panels).
L: A representative picture of bone marrow, spleen and liver sections stained with Hematoxylin-Eosin-Safran.
M: Absolute number of pro- and pre-B precursor cells (B220^{low}IgM^{-}) and mature B cells (CD19^{+}B220^{+}) in the bone marrow of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals, indicated as mean ± SEM of 8 animals per genotype (data shown in Figure 3G).
N: Absolute number of splenic CD19^{+}B220^{+} B-cells in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ mice, indicated as mean ± SEM of 10 animals per genotype.
O: Flow cytometry analysis of B precursor cells in the bone marrow of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals performed 12 months post-induction. Gates include pre-pro-B (B220^{low}CD43^{+}CD19^{-}CD93^{low}), pro-B (B220^{low}CD43^{+}CD19^{+}CD93^{+}; middle panels), and pre-B (B220^{low}CD43^{-}CD19^{+}CD93^{+}; right panels) precursor cells.
P: Percentages (upper panel) and absolute numbers (lower panel) of CD19^{+}B220^{+} B lymphoid cells in blood of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals 4-8 months post-induction are presented as mean ± SEM (*n*=6-10 per genotype).
Q: Representative flow cytometrical profile of T splenocytes in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ performed 4 months post-induction (left panel). Percentages (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of CD4^{+} and CD8^{+} splenocytes in *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ animals 4-8 months post-induction are presented as mean ± SEM (*n*=6-9 per genotype).
R: Representative flow cytometrical analysis of T cells in blood of *Tet2*$^{+/+}$ and *Tet2*$^{-/-}$ performed 4 months post-induction (left panels). Percentages (right upper panels) and absolute numbers (right lower panels) of CD4^{+} and CD8^{+} T lymphoid cells in blood of *Tet2*$^{-/-}$ (*n*=10; black bars/circles) and control *Tet2*$^{+/+}$ (*n*=6-10; white bars/circles) animals 4-8 months post-induction are presented as mean ± SEM (p-values are calculated by 2-tailed unpaired Student's t-test).
S: Immunophenotypical analysis of B lymphoid cells in the bone marrow and spleen of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and wild-type control 4-8 month-old animals (upper panels). The frequencies

are indicated as a percentage of total bone marrow cells or total splenocytes. The absolute number of $CD19^{+}B220^{+}$ mature B cells in the spleen and blood of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=6; striped bars) and wild-type control (*n*=4; white bars) 4-8 month-old animals are presented as mean ± SEM (lower panels).

T: Representative flow cytometry analysis of thymocytes in *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and wild-type control 4-month-old mice. Upper left panels: the percentages of total thymocytes are indicated. Upper right panels: the percentages of thymocytes precursors in $CD4^{-}CD8^{-}$ double-negative (DN) cells are represented (mature thymocytes and other cells were electronically excluded from the analysis by CD19, CD8, CD3ε, TCRβ, NK-1.1, Ly-6G and CD11b antibodies staining). The percentages of $CD4^{-}CD8^{-}$ DN and $CD44^{+}CD25^{-}$ DN1 cells in total thymocytes from *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ and wild-type control animals (*n*=4 per genotype) are represented as mean ± SEM (lower panels). p-values calculated by 2-tailed unpaired Student's t-test.

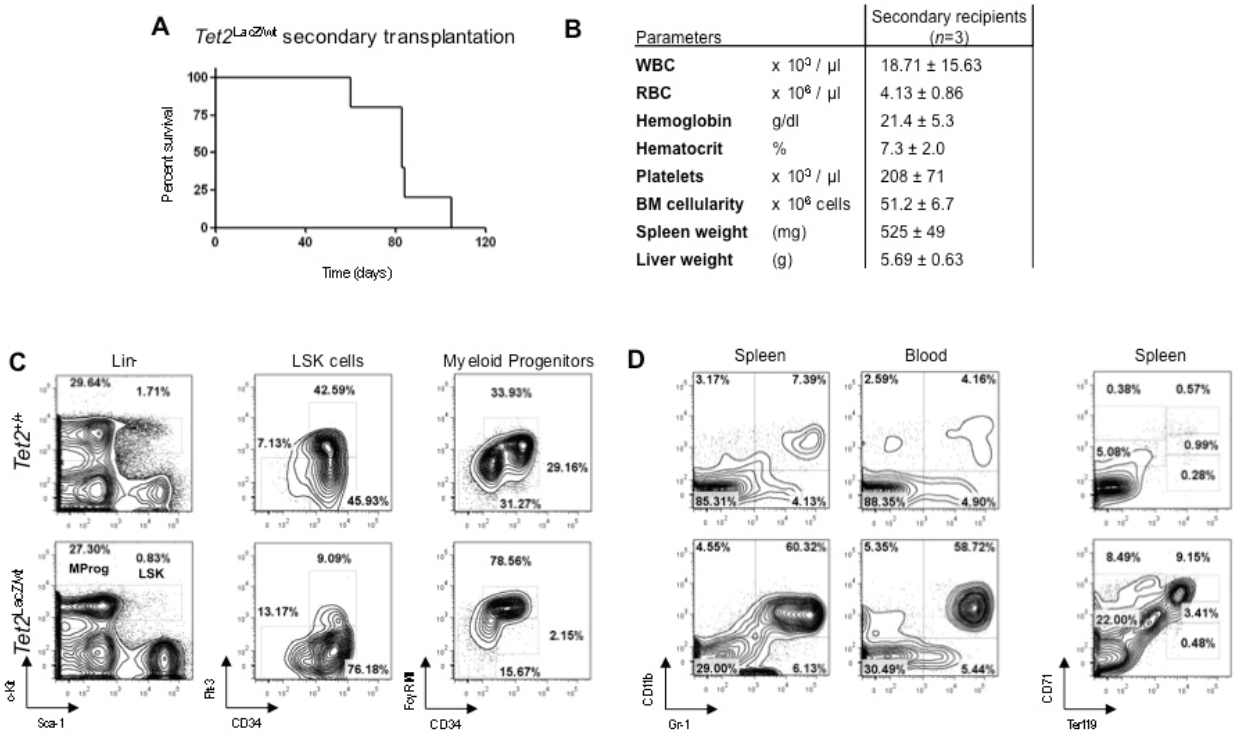
U: Percentages (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells in blood of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=4; black circles) and wild-type control (*n*=3; white circles) 4-month-old animals are presented as mean ± SEM.

V: Percentages (upper panels) and absolute numbers (lower panels) of $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells in spleen of *Tet2*$^{LacZ/LacZ}$ (*n*=6) and wild-type control (*n*=5) 4-8 month-old animals are presented as mean ± SEM.

	Tet2$^{-/-}$	*Tet2*$^{LacZ/wt}$	*Tet2*$^{LacZ/LacZ}$
Organomegaly			
Splenomegaly (> 170 mg)	**9/18** (50%)	**5/10** (50%)	**9/12** (75%)
Hepatomegaly (> 1900 mg)	**8/18** (44%)	**4/10** (40%)	**4/8** (50%)
Peripheric abnormality			
↗ WBC (> $10x10^3/mm^3$)	**6/18** (33%)	**2/10** (20%)	**3/12** (25%)
Hb (< 14 g/dl)	**7/18** (39%)	**3/10** (30%)	**5/12** (42%)
Plt (< $600x10^3/mm^3$)	**7/18** (39%)	**4/10** (40%)	**5/12** (42%)
Quantitative abnormality			
↗ LSK cells	**12/14** (86%)	**8/9** (89%)	**8/8** (100%)
↗ DN thymocytes	**2/3** (66%)	**3/5** (60%)	**3/4** (75%)
Differentiation abnormality			
↗ $CD11b^{low/+}Gr1^-$ myeloid cells	**3/11** (27%)	**2/10** (20%)	**6/9** (67%)
↗ $B220^{low}CD19^+$ B lymphoid cells	**7/11** (64%)	**1/10** (10%)	**4/6** (66%)

Table S1: Summary of the hematopoietic alterations observed in *Tet2*-deficient animals (related to Figure 3).

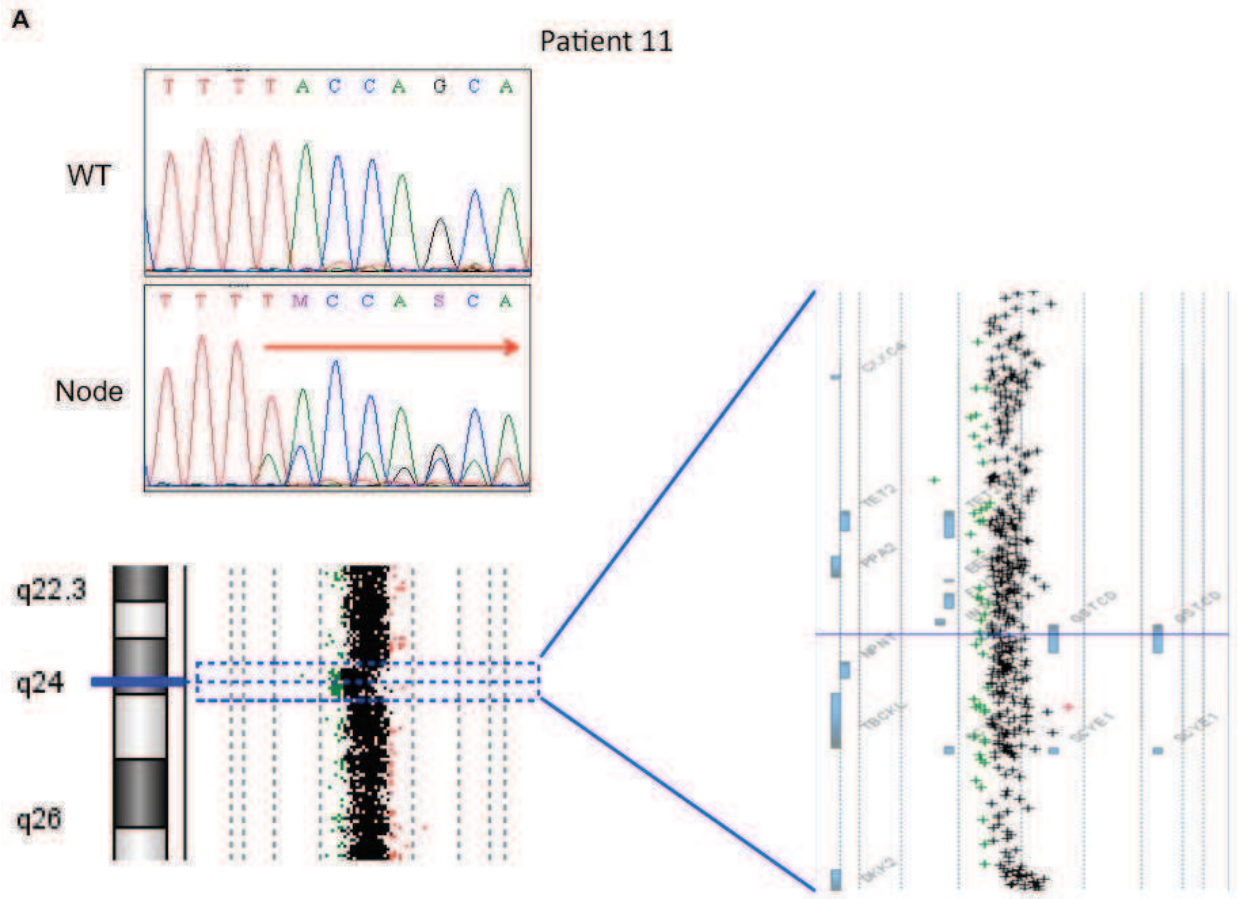
Parameters of animals between 4 and 12 months old are indicated.

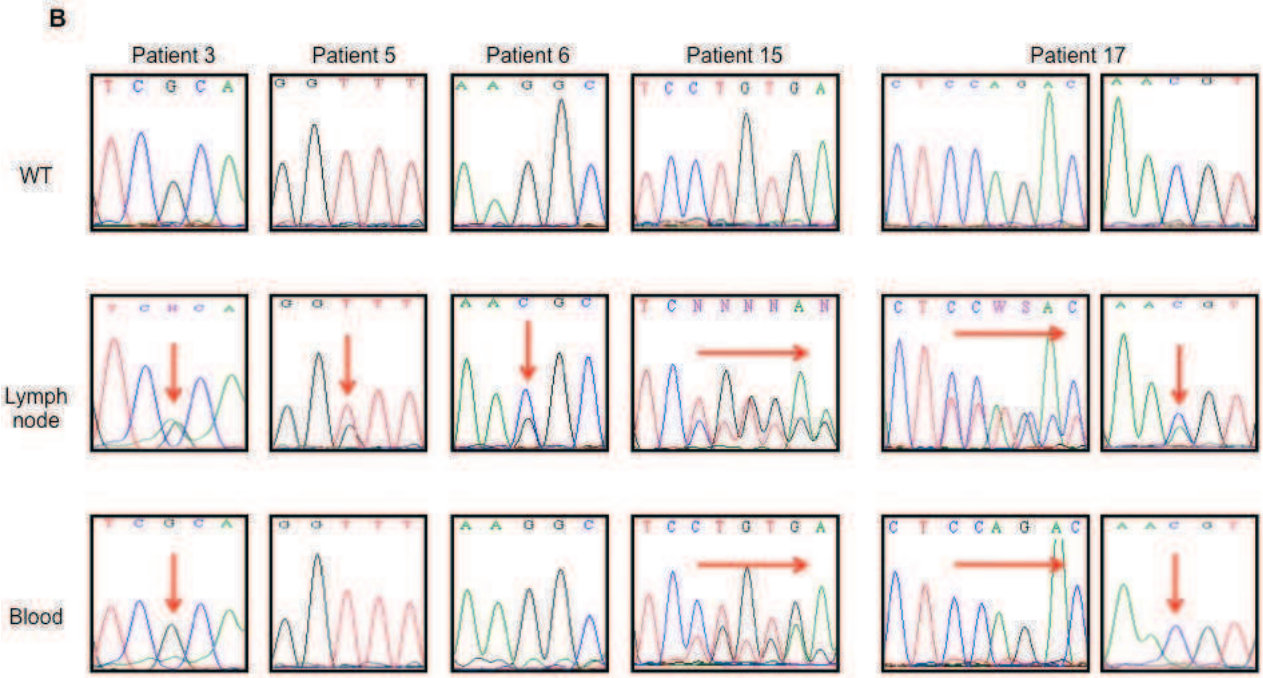


Parameters		Secondary recipients (n=3)
WBC	x 10^3 / µl	18.71 ± 15.63
RBC	x 10^6 / µl	4.13 ± 0.86
Hemoglobin	g/dl	21.4 ± 5.3
Hematocrit	%	7.3 ± 2.0
Platelets	x 10^3 / µl	208 ± 71
BM cellularity	x 10^6 cells	51.2 ± 6.7
Spleen weight	(mg)	525 ± 49
Liver weight	(g)	5.69 ± 0.63

Figure S4: Gene-trap disease transplantation to secondary recipients (related to Figure 4).

A: Kaplan-Meier survival curve of secondary recipients transplanted with 1x10^6 *Tet2*$^{LacZ/wt}$ hematopoietic splenocytes.
B: Hematologic parameters, BM cellularity, and spleen and liver weight of moribund secondary *Tet2*$^{LacZ/wt}$ recipients, 12 to 15 weeks after transplantation (n=3).
C: Flow cytometry analysis of hematopoietic stem and progenitor cells of moribund recipient mouse, 12 weeks post-transplantation.
D: Flow cytometry profile of myelo-monocytic and erythroid lineages in the spleen and blood of *Tet2*$^{LacZ/wt}$ recipient mouse.


A
Patient 11
WT
Node
q22.3
q24
q26


B
Patient 3
Patient 5
Patient 6
Patient 15
Patient 17
WT
Lymph node
Blood

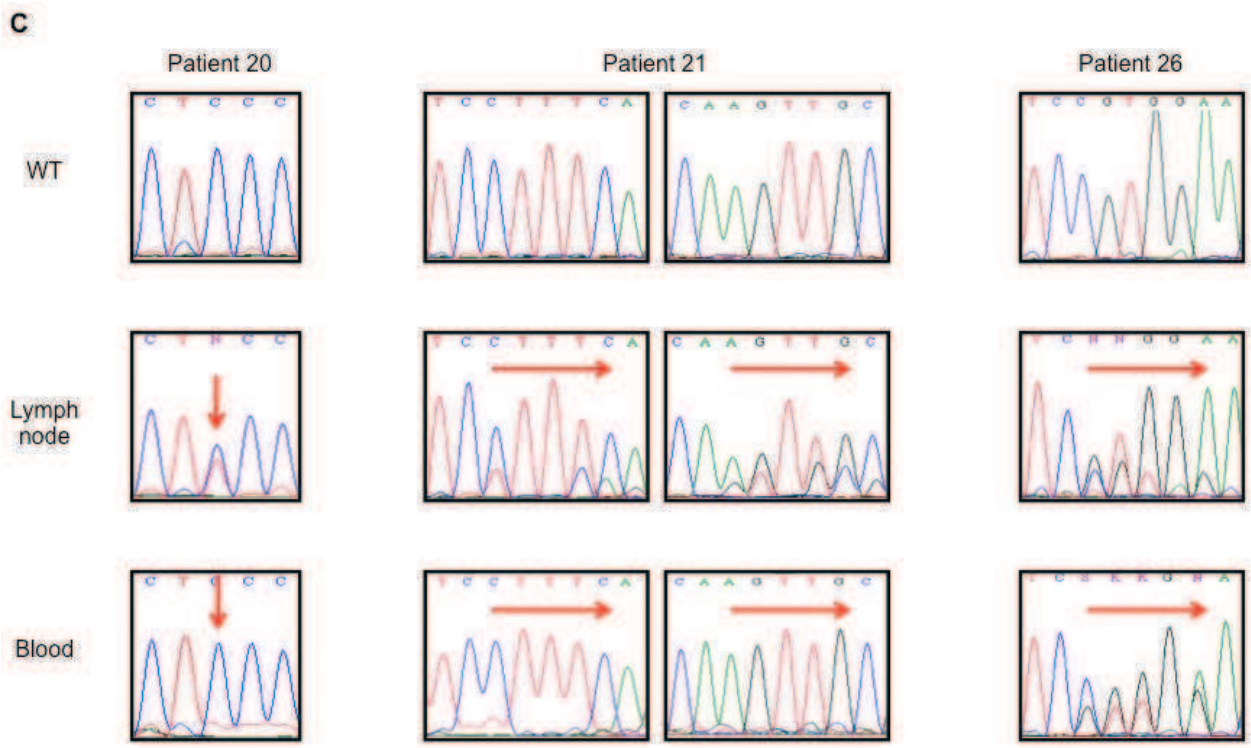


Figure S5: Sequencing of patient samples (related to Figure 5).

A: Sequence and DNA microarray analyses of DNA from patient 11.
DNA microarray analysis shows loss of one copy of the region containing *TET2*
B: Sequence trace of the *TET2* mutations found in patients with lymphoid malignancies.
C: Sequence trace of the *TET2* mutations found in patients with lymphoid malignancies.
Arrows indicate sequence variations.

	Tumor sample					Matched DNA [1]	
Patient #	Sample	Diagnosis	Mutation Type	Nucleotide change	Consequence	TET2 mutation	Residual tumor2
1	node	DLBCL	Nonsense	c.3087C>T	p.Gln743X	NA	NA
2 *	node	DLBCL	Frameshift + splice	c.[2202delG(+)4663+1G>A]	p.Glu448fs	Trace	No
3 *	node	DLBCL	Nonsense	c.5406C>T	p.Arg1516X	Yes	Yes
4 *	node	DLBCL	Nonsense	c.3506C>T	p.Gln886X	Yes	No
5 *	node	DLBCL	Splice	c.4814+2T>G	-	No	No
6 *	node	FL	Missense	c.5116C>G	p.Pro1419Arg	No	No
7	node	AITL	Nonsense + Frameshift	c.[3192C>T(+)3628_3629insCATA]	p.[Gln778X(+)Asn923fs]	NA	NA
8	blood	AITL	Nonsense	c.5193C>T	p.Gln1445X	NA	NA
9	node	AITL	Frameshift	c.3215delT	p.Phe785fs	NA	NA
10 *	node	AITL	Frameshift x2	c.[1893_1896delAAGC]+[4527delG]	[p.Lys345fs]+[p.Ala1223fs]	Trace	No
11	node	AITL	Frameshift	c.6564delT	p.Tyr1902fs	NA	NA
12	node	AITL	Frameshift x2	c.[2505delA]+[2524delC]	[p.Thr549fs]+[p.Pro555fs]	NA	NA
13 *	node	AITL	Frameshift	c.5523_5524insA	p.Glu1555fs	Yes	No
14	node	AITL	Frameshift	c.3756_3757del CA	p.Gln966fs	NA	NA
15 *	node	AITL	Frameshift	c.1642delC	p.Ser261fs	Yes	Yes
16 *	node	AITL	Splice	c.4815-2delA	-	Trace	No
17 *	node	PCTL, NOS	Frameshift + missense	c.[3131_3137delCCAGACT]+[5109G>T]	[p.Leu757fs]+[p.Val1417Phe]	Trace	Yes
18	node	PCTL, NOS	Nonsense x2	c.[3747C>T]+[5331A>T]	[p.Gln963X]+[p.Lys1491X]	NA	NA
19	node	PCTL, NOS	Frameshift + nonsense	c.[1700_1701insT(+)3606C>T]	p.[Asn281fs(+)Gln916X]	NA	NA
20 *	node	PCTL, NOS	Missense	c.6553C>T	p.Ser1898Phe	Trace	Yes
21 *	node	PCTL, NOS	Frameshift x2	c.[1805delC(+)3602delT]	p.[Ser315fs(+)Leu914fs]	Trace	Yes
22	node	PCTL, NOS	Nonsense	c.5100C>T	p.Gln1414X	NA	NA
23	skin	Sezary	Missense + Nonsense	c.[5053T>C(+)5253C>T]	p.[Leu1398Pro(+)Arg1465X]	NA	NA
24	blood	Sezary	Nonsense	c.2636C>T	p.Gln593X	NA	NA
25	node	TLBL	missense	c.6745C>T	p.Pro1962Leu	NA	NA
26 *	node	Unspecified T-lymphoma	Frameshift	c.1511delC	p.Ser217fs	Yes	NA
27	blood	Unspecified T-lymphoma	Frameshift + nonsense	c.[2301C>T(+)3142delC]	p.[Gln481X(+)Pro761fs]	NA	NA

Table S2: *TET2* mutations in patients with lymphoid malignancies (related to Figure 5).

* Matched DNA available. 1: At diagnosis or remission: samples correspond respectively to whole blood and cytapheresis samples. 2: Clonality analysis (TCR/IgH rearrangement or BCL2-IGH transcript). NA: Not Applicable.

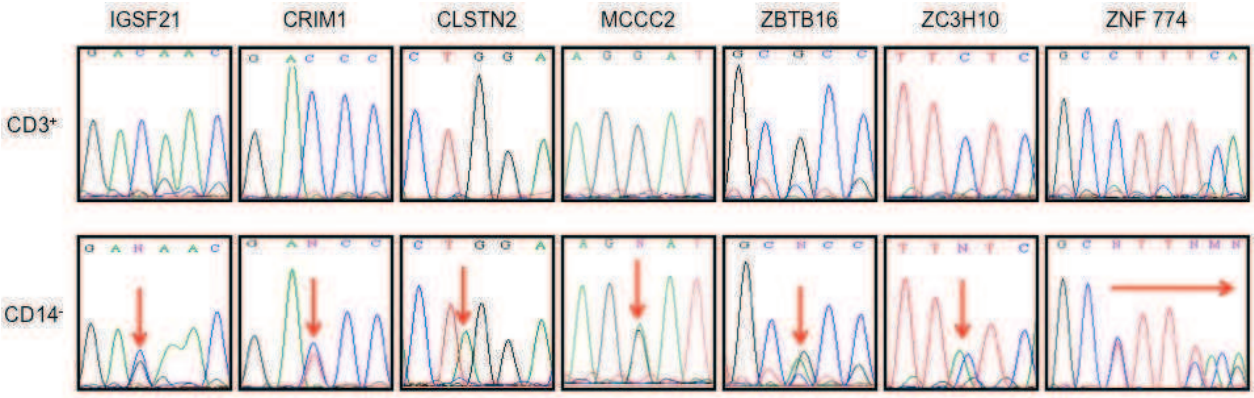


Figure S6: Sequence trace using Sanger sequencing confirming the mutations identified by exome sequencing (related to Figure 6).

Analysis of $CD3^+$ non-tumoral and $CD14^-$ tumoral purified population is shown. Arrows indicate sequence variations.

Patient #	Diagnosis	Age	Cytogenetics	Stage	BM infiltration	Associated hemopathy	Time of associated hemopathy
2	GCB DLBCL	77	normal	IV	no	RAEB then AMLFAB 5a	5 months after B-cell lymphoma's
14	AITL	62	N.D.	IV	yes	Myelofibrosis then RAEB	4 years before T-cell lymphoma's
15	AITL	76	del (20)(q12)	IV	yes	Sideroblastic anemia	3 years before T-cell lymphoma's
18	PCTL, NOS	56	t(6;15)(q21;q23)	III	no	Hodgkin lymphoma	6 years before T-cell lymphoma's
21	PCTL, NOS	73	hyperploidy with del (6q)	IV	yes	T cutaneous lymphoma then THRBCL	8 years before T-cell lymphoma's

Table S3: Patients with multiple diseases (related to Figure 6)

GCB DLBCL: Germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma, AITL: Angioimmunoblastic T-cell lymphoma, PCTL-NOS: Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, RAEB: Refractory anemia with excess blasts, AML: Acute myeloid leukemia, TCRBCL: T-cell-rich B-cell lymphoma. BM: Bone marrow.

Supplemental Experimental Procedures

Generation of the *Tet2*^{LacZ} and *Tet2*^{floxed} alleles and animal analyses

Retro-orbital blood collection was performed under anesthesia with isoflurane and complete blood counts were obtained using an MS9-5 hematology analyzer (Melet Schloesing Technologies). Peripheral blood smears were stained with May-Grunwald-Giemsa. Hematopoietic organs were fixed in FineFIX (Millestone) and histopathology analyses, including Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) staining and von Willebrand factor immunostaining, were performed at the Institut Gustave Roussy histopathology facility. Mice were sacrificed at various time-points (from 2 to 12 months-old) or due to moribund condition.

Flow cytometry and cell sorting

The following antibody combination were used: allophycocyanin (APC)–CD117 (c-Kit, clone 2B8), phycoerythrin (PE)-Cy™ 7–Sca-1 (Ly-6A/E, clone D7, from eBioscience), fluorescein isothyocyanate (FITC)–CD34 (clone RAM34, eBioscience) and PE–FcγRII/III (CD16/CD32, clone 2.4G2) for myeloid progenitor cells; PE–IL7-Rα (CD127, clone A7R34) for common lymphoid progenitor cells; PE–CD135 (Flk-2/Flt-3, clone A2F10.1), PE–CD150 (clone TC15-12F12.2), FITC–CD48 (BCM1, clone HM48-1) for hematopoietic stem cells and progenitors; FITC–CD11b (also known as Mac-1, clone M1/70) and APC–Gr-1 (Ly-6C and Ly-6G, clone RB6-8C5) for myeloid cells; PE-Cy™ 7–CD11b, FITC–Ly-6C (clone AL-21) and PE–Ly-6G (clone 1A8) for monocytes and granulocytes; FITC–CD71 (transferrin receptor, clone C2) and APC–Ter119 (clone TER-119) for erythroid cells; FITC–CD41 (clone MWReg30) and PE–CD42b (GPIbα, clone Xia-G5, Emfret Analytics) for megakaryocytes; APC–CD19 (clone 1D3, from BioLegend), PacificBlue–CD45R/B220 (clone RA3-6B2), FITC–IgM (clone AF6-78), PE-Cy™ 7–CD93 (early B lineage, clone AA4.1, from BioLegend) and PE–CD43 (leukosialin, clone eBioR2/60, from eBioscience) for B lymphoid cells; APC–CD8α (clone 53-6.7), FITC–CD4 (clone RM4-5) and PE–TCR β chain (clone H57-597) for T lymphoid cells; APC–CD44 (clone IM7) and PE-Cy™ 7–CD25 (clone PC61) for double-negative thymocyte progenitors.

Nucleic acid methods

Reads from the Illumina sequencing run were mapped using the BWA Software on the hg19 human reference with at maximum 2 mismatches in the first 32 bases of the sequences, and 5 in total. 58,6 % of the reads were mapped within the 200 bases of the SureSelect probes for the tumor fraction with a mean depth of 180x, and 55,2 % of the reads from the non tumor fraction, at a mean depth of 140 x.
Mapping results were converted to the BAM format; SNP and Indel calling was performed by Samtools and filtered using a depth threshold of 10, SNP / Indels supported by at least 3 reads in forward and 3 reads in reverse, a minimum root mean square on the mapping qualities of the reads overlapping the position of 25 for SNP, and 10 for Indel and a maximum 2 SNP's and no Indel within 10 bp window for the SNP, and no Indel within 30 bp window for the Indel.

3.3. Article 3 : Recurrent *TET2* mutations in peripheral T-Cell lymphoma correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters

Dans notre première série de patients, les mutations de *TET2* étaient majoritairement observées dans deux sous-types particuliers de lymphomes T périphériques (PTCL) : l'AITL et le PTCL, NOS. Les objectifs de ce travail étaient donc de préciser la fréquence des mutations de *TET2* dans une plus large série de PTCL, de rechercher une éventuelle association à un phénotype particulier et d'évaluer l'impact pronostique des anomalies de *TET2*.

Sur une cohorte de 190 patients avec PTCL, 64 (34%) étaient mutés pour *TET2*. Comme attendu, les mutations de *TET2* étaient surreprésentées dans les AITL (47%) et dans un sous-groupe de PTCL, NOS dit « TFH-like » (58%) qui expriment des marqueurs de TFH et se rapprochent donc sur le plan phénotypique des AITL. Les mutations de *TET2* sont donc associées de manière significative au phénotype TFH ($p < 0,0001$).

La présence de mutations *TET2* est corrélée à un stade avancé de la maladie, une thrombopénie, la présence de symptômes généraux et des scores péjoratifs d'index pronostique.

Sur le plan pronostique, les mutations de *TET2* sont associées à une moins bonne PFS, et ce de manière encore plus significative dans le sous-groupe des PTCL à phénotype TFH, mais n'influencent pas la survie globale.

En conclusion, ce travail confirme la fréquence élevée des mutations de *TET2* dans les lymphomes T périphériques, et en particulier dans le sous-groupe des PTCL avec phénotype TFH qui regroupe les AITL et les PTCL, NOS « TFH-like ». Nos résultats renforcent le lien existant entre AITL et PTCL, NOS « TFH-like » et posent la question d'un rôle spécifique de TET2 dans la différenciation des lymphocytes T en TFH. Le statut *TET2* peut également être considéré comme un nouveau biomarqueur spécifique des PTCL à phénotype TFH et ainsi aider à la classification des lymphomes T.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on September 2, 2012. For personal use only.

Brief report

Recurrent *TET2* mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with T_{FH}-like features and adverse clinical parameters

*François Lemonnier,[1,2] *Lucile Couronné,[3] Marie Parrens,[4] Jean-Philippe Jaïs,[5] Marion Travert,[1,2] Laurence Lamant,[6] Olivier Tournillac,[7] Therese Rousset,[8] Bettina Fabiani,[9] Rob A. Cairns,[10] Tak Mak,[10] Christian Bastard,[11] Olivier A. Bernard,[3] †Laurence de Leval,[12] and †Philippe Gaulard[1,2,13]

[1]Inserm U955, Créteil, France; [2]Université Paris Est, Créteil, France; [3]Inserm U985, Institut Gustave Roussy; Université Paris, Villejuif, France; [4]Département de Pathologie, Hôpital Pessac, Bordeaux, France; [5]Département de Statistiques. Hôpital Necker, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France; [6]Département de Pathologie, Hôpital Purpan, Toulouse, France; [7]Service de Thérapie Cellulaire et d'Hématologie Clinique Adulte, Université d'Auvergne, Inserm CIC-501, Centre Hospitalier Universitaire Clermont-Ferrand Hôpital Estaing, Clermont-Ferrand, France; [8]Département d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire Gui de Chauliac, Montpellier, France; [9]Département d'Anatomie Pathologique, Hôpital Saint-Antoine, AP-HP, Paris, France; [10]Campbell Family Institute for Breast Cancer Research at Princess Margaret Hospital, University Health Network, Toronto, ON; [11]Inserm U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; [12]Institut de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland; and [13]Département de Pathologie, Groupe Henri-Mondor Albert-Chenevier, AP-HP, Créteil, France

Inactivating mutations of the *Ten-Eleven Translocation 2* (*TET2*) gene were first identified in myeloid malignancies and more recently in peripheral T-cell lymphomas (PTCLs). In the present study, we investigated the presence of *TET2* coding sequence mutations and their clinical relevance in a large cohort of 190 PTCL patients. *TET2* mutations were identified in 40 of 86 (47%) cases of angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and in 22 of 58 (38%) cases of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified (PTCL-NOS), but were absent in all other PTCL entities, with the exception of 2 of 10 cases of enteropathy-associated T-cell lymphoma. Among PTCL-NOS, a heterogeneous group of lymphoma-comprising cases likely to derive from Th follicular (T_{FH}) cells similarly to AITL, *TET2* mutations were more frequent when PTCL-NOS expressed T_{FH} markers and/or had features reminiscent of AITL (58% vs 24%, $P = .01$). In the AITL and PTCL-NOS subgroups, *TET2* mutations were associated with advanced-stage disease, thrombocytopenia, high International Prognostic Index scores, and a shorter progression-free survival. (*Blood*. 2012;120(7):1466-1469)

Introduction

Inactivating mutations of the *Ten-Eleven Translocation 2* (*TET2*) gene were first identified in myeloid malignancies.[1-2] *TET2* encodes a 2 oxoglutarate/Fe^{2+}–dependent oxygenase that catalyses the oxidation of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine,[3-5] and its inactivation in mice results in expansion of the hematopoietic progenitor cells and in pleiotropic abnormalities affecting both myeloid and lymphoid lineages.[6-8] Recently, *TET2* mutations have been reported in human lymphomas with a higher frequency in T cell– than B cell–derived neoplasms (12% vs 2%).[7,9] Among peripheral T-cell lymphomas (PTCLs), the mutations identified were almost exclusively in the angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and PTCL, not otherwise specified (PTCL-NOS) subtypes, the 2 most common PTCL entities in Western countries.[10] These mutations were demonstrated in tumor cells, with evidence that they may be acquired either in early $CD34^+$ progenitors or at later steps of lymphoid development.[7]

In the present study, we extended the analysis of *TET2* mutations to a larger, independent series of PTCL samples to correlate mutational status with pathologic features and clinical outcome.

Methods

Patients and tumor samples

A series of 190 PTCL patients with frozen lymphoma samples available at diagnosis were selected within the framework of a multicentric T-celllymphoma consortium (Tenomic). The study was approved by the local ethic committee (CPP Ile de France IX 08-009). Clinical data were collected retrospectively. All cases were reviewed and a consensus diagnosis was made at a multihead microscope by 3 hematopathologists according to the criteria of the 2008 World Health Organization classification.[11]

Within PTCL-NOS, a group without typical morphology of AITL but expressing Th follicular (T_{FH}) cell markers (ie, PD1, BCL6, and/or CXCL13) and/or having some other features reminiscent of AITL (ie, the presence of 2 of the following criteria: $CD20^+$ large B cells, EBV-encoded small RNAs $(EBER)^+$ cells, CD21 and/or CD23 follicular dendritic cell expansion, or CD10 expression), was designated "T_{FH}-like" PTCL-NOS.

TET2 genotyping

DNA was extracted from several frozen tissue sections with morphologic control using QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) and an aliquot amplified by linear amplification. Analysis of the coding sequences of *TET2* was

Submitted February 21, 2012; accepted June 21, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, July 3, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-02-408542.

*F.L. and L.C. contributed equally to this work.

†L.d.L. and P.G. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on September 2, 2012. For personal use only.

Table 1. *TET2* mutations in the different PTCL entities

		TET2 mutation	
PTCL entity	**n**	**n**	**%**
AITL	86	40	47
PTCL NOS*	58	22	38
T_{FH}-like	24	14	58
Others	34	8	24
ALCL	18	0	0
EATL*	10	2	20
Extranodal NK/T	12	0	0
HSTL	6	0	0
Total	190	64	34

ALCL indicates anaplastic large-cell lymphoma; HSTL, hepatosplenic T-cell lymphoma; EATL, enteropathy-associated T-cell lymphoma; and extranodal NK/T, extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal-type.

**TET2* mutations were found in 3 extranodal tissue samples (1 skin, 1 spleen, and 1 liver) diagnosed as PTCL-NOS and in 2 intestinal tissue samples diagnosed as EATL.

performed by direct sequencing of the PCR fragments and candidate mutations were confirmed by sequencing, an independent PCR product was amplified from native genomic DNA as described previously.[7] Frameshift, nonsense mutations, mutations in splice site, and missense mutations (only those affecting the evolutionary conserved regions of the protein) were considered. Single nucleotide polymorphisms either published previously or recorded in the National Center for Biotechnology Information Single Nucleotide Polymorphism database were excluded.

Statistical analysis

Continuous and dichotomic variables were compared with the Wilcoxon sum-rank test or Cochrane Armitage and χ^2 or Fisher exact tests. Overall and progression-free survival (PFS) were estimated using the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. All tests were 2-sided and $P < .05$ was considered significant.

Results and discussion

TET2 mutations were found in 64 of 190 samples at diagnosis (34%). The frequency of *TET2* mutations was extremely variable according to the diagnosis category. *TET2* mutations were present in 40 of 86 (47%) cases of AITL, in 22 of 58 (38%) cases of PTCL-NOS, and in 2 of 10 (20%) cases of enteropathy-associated T-cell lymphoma. In contrast, no mutation was observed in any of the 18 anaplastic large-cell lymphomas (12 ALK-positive and 6 ALK-negative), the 12 extranodal NK/T lymphomas, nasal-type, or the 6 hepatosplenic T-cell lymphomas tested (Table 1).

Interestingly, and in accordance with previous results,[7] the highest frequency of mutations was found in AITL, which is thought to derive from T_{FH} cells normally present in germinal centers.[12-14] Within the large group of PTCL-NOS, it is also now recognized that a subset has "T_{FH}-like" features in the form of a molecular profile bearing imprints of the T_{FH} cell signature, the expression of T_{FH}-associated molecules,[15-17] and/or overlapping pathologic features.[16] Therefore, we questioned whether *TET2* mutations were correlated with T_{FH}-like features in PTCL-NOS. Among the 58 PTCL-NOS in our series, 24 were classified as "T_{FH}-like" PTCL-NOS. *TET2* mutations were present in 14 of 24 (58%) of the T_{FH}-like PTCL subgroup compared with 8 of 34 (22%) of those lacking AITL features and T_{FH}-markers. Therefore, *TET2* mutations in PTCL appear to be correlated with T_{FH} derivation (ie, they occur at a higher frequency in AITL and T_{FH}-like PTCL-NOS), than in non–T_{FH}-like PTCL-NOS and other PTCL entities (49% vs 12.5%, $P < .0001$).

Among the 64 PTCL patients with *TET2* mutations, 37 had single mutations and 27 had 2 or more mutations. *TET2* mutations were mainly insertions/deletions generating frameshift and nonsense mutations similar to those found in myeloid malignancies (supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Eighteen of 19 missense mutations were predicted as probably damaging by the Polyphen-2 software (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) and one as possibly damaging. For 3 mutated patients with available biopsy at relapse, an identical pattern of *TET2* mutations was found in paired samples (supplemental Figure 1), suggesting that TET2 mutations are associated with the main driving clone.

When focusing on AITL and PTCL-NOS patients (n = 144), 62 patients had *TET2* mutations and 82 were *TET2* wild-type. Clinical factors associated with *TET2* mutated status (Table 2 and supplemental Figure 2) were advanced-stage disease ($P = .02$), increased number of involved extranodal sites ($P = .017$), presence of B symptoms ($P = .02$), thrombocytopenia ($P = .04$), high International Prognosis Index ($P = .028$) and Prognosis Model for PTCL-NOS[18] ($P = .025$) scores, indicating that *TET2* mutations are associated with adverse clinical parameters at presentation. Despite incomplete clinical data and heterogeneous therapies in this multicentric retrospective cohort, anthracycline-based chemotherapy was the most common regimen in both the mutated and nonmutated groups (73% and 70%, respectively). *TET2*-mutated patients with AITL or PTCL-NOS appeared to have a shorter PFS ($P = .04$) than *TET2* wild-type patients, but no significant difference in overall survival was observed ($P = .1$; supplemental Figure 2). The association among *TET2* mutations, poor prognosis clinical parameters, and outcome was even stronger when focusing on the group of patients with AITL and T_{FH}-like PTCL-NOS. In this group, *TET2* mutations were associated with a shorter PFS ($P = .022$) and a trend to a shorter overall survival ($P = .058$; supplemental Table 2 and supplemental Figure 3)

We recently reported recurrent *IDH2* mutations in AITL.[19] These mutations alter IDH enzymatic function and may result in the functional inactivation of TET protein activity.[20] In acute myeloid leukemia, *IDH* and *TET2* mutations are reported to be mutually exclusive.[20] Of the 31 AITL samples in the present study also analyzed for *IDH2* mutations,[19] 6 had both *IDH2* and *TET2* mutations, 2 were *IDH2* mutated/*TET2* wild-type, and 10 were *TET2* mutated/*IDH2* wild-type, indicating that both mutations can accumulate in AITL. Ultimately, both *IDH2* and *TET2* mutations, which are recurrent in AITL and in T_{FH}-derived PTCL, may deregulate the control of chromatin structure. This situation may be reminiscent of that observed in B-cell lymphomas, in which mutations of several genes involving epigenetic changes and chromatin remodeling, such as *CREEBP*, *EP300*,[21] *EZH2*,[22] *MLL2*, or *MEF2B*,[23] have been described recently.

In addition to similarities in their ontogeny, AITLs and a subset of T_{FH}-like PTCLs share common oncogenic alterations, including *TET2* abnormalities, further supporting their close relationship. The strong association among *TET2* mutations, AITL, and T_{FH}-like PTCL may provide molecular rationale to merge together AITL and PTCL-NOS–expressing T_{FH} markers, as has been suggested previously,[15-16] and to refine the spectrum of AITL. Overall, the identification of frequent *TET2* mutations in AITL and other T_{FH}-related PTCLs extends the importance of epigenetic alterations in lymphomagenesis. The results of the present study suggest that in these diseases, in which conventional chemotherapies are ineffective[24] in most patients, the use of new agents such as demethylating agents should be considered.

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on September 2, 2012. For personal use only.

Table 2. Clinical data according to *TET2* status in AITL and PTCL-NOS patients

	TET2 mutation		*TET2* wild-type		*P*
n	62		82		
Sex					
Male	38	61%	43	52%	.18*
Female	24	39%	39	48%	
Median age, y	67		65		.3†
Stage					
1	0	0%	4	5%	.028‡
2	0	0%	3	4%	
3	11	21%	17	23%	
4	42	79%	49	67%	
Median no. of extranodal localizations	2		1		.056†
Lactate dehydrogenase					
Elevated	41	76%	46	65%	.24*
Normal	13	24%	25	35%	
Hemoglobin					
≥ 10 g/dL	35	74%	33	60%	.14*
< 10 g/dL	12	26%	22	40%	
Platelet count					
≥ 150 000/mm^3	34	72%	48	89%	.04*
< 150 000/mm^3	13	28%	6	11%	
Direct Coombs test					
Positive	14	52%	13	43%	.6*
Negative	13	48%	17	57%	
Hypergammaglobulinemia					
Yes	11	32%	12	33%	> .999*
No	23	68%	24	67%	
B symptoms					
Yes	40	78%	38	58%	.028*
No	11	22%	27	42%	
Performance status					
0-1	22	44%	41	62%	.06*
2-4	28	56%	25	38%	
International Prognosis Index score					
0	0	0%	4	6%	.0062†
1	2	4%	4	6%	
2	8	16%	11	16%	
3	10	20%	22	33%	
4	19	37%	23	34%	
5	12	24%	3	4%	
Prognosis Model for PTCL[18]					
0	2	5%	4	9%	.0045†
1	3	7%	11	24%	
2	9	21%	13	29%	
3	18	43%	13	29%	
4	10	24%	4	9%	
Treatment					
Anthracycline-based regimen	37	69%	40	58%	.5*
Anthracycline-based regimen and frontline transplantation	2	4%	8	12%	
Other combination of chemotherapy	7	13%	8	12%	
Single-agent chemotherapy	5	9%	7	10%	
Palliative treatment	3	6%	6	9%	
5-y overall survival	28%		31%		.11§
5-y PFS	10%		21%		.047§

*Fisher exact test.
†Wilcoxon sum-rank test.
‡Cochran Armitage test.
§Log-rank test.

Acknowledgments

The authors thank Virginie Fataccioli for the management of the TENOMIC program and Magalie Abrantes, Prof K Leroy (Tumor Tissue Bank), Jérome Cuvillier, and Nadine Vailhen for their assistance.

This study was supported in part by grants from the Institut National du Cancer, Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Fondation pour la recherche Médicale (FRM; équipe labellisée),

From bloodjournal.hematologylibrary.org at INSERM DISC on September 2, 2012. For personal use only.

and the Cancer Plan Research Program (Belgium; L.d.L.). F.L. was an M2 student receiving grants from Association pour la Recherche contre le Cancer, and M.T. received grants from FRM.

Authorship

Contribution: O.B., C.B., and P.G. designed the research: F.L., P.G., L.d.L., and M.P. analyzed and interpreted the results; L.C., T.M., and R.A.C. performed the study; L.L., O.T., T.R., B.F., and M.T. collected the data and/or the tumor samples; J.P.J. supervised statistical analysis; and F.L., L.d.L., and P.G. wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Pr Philippe Gaulard, Département de Pathologie, Hôpital Henri Mondor, Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France; e-mail: philippe.gaulard@hmn.aphp.fr.

References

1. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;360(22):2289-2301.
2. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood.* 2009; 114(1):144-147.
3. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* 2009;324(5929):930-935.
4. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science.* 2011;333(6047): 1300-1303.
5. Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, Aifantis I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell.* 2011;9(3):193-204.
6. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell.* 2011;20(1):11-24.
7. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell.* 2011;20(1):25-38.
8. Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood.* 2011;118(17):4509-4518.
9. Couronné L, Bastard C, Bernard OA. TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2012;366(1):95-96.
10. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4124-4130.
11. International Agency for Research on Cancer. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
12. Dupuis J, Boye K, Martin N, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(4):490-494.
13. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 2007;109(11):4952-4963.
14. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 2007;67(22): 10703-10710.
15. de Leval L, Gaulard P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008; 2008:272-279.
16. Rodríguez-Pinilla SM, Atienza L, Murillo C, et al. Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(12):1787-1799.
17. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2010; 115(5):1026-1036.
18. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood.* 2004;103(7):2474-2479.
19. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(8):1901-1903.
20. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18(6):553-567.
21. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature.* 2011; 471(7337):189-195.
22. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42(2): 181-185.
23. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011;476(7360): 298-303.
24. Mourad N, Mounier N, Briere J, et al. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood.* 2008;111(9):4463-4470.

Supplementary data

Appendix :

List of the participants to the Tenomic consortium belonging to the centers of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) and Groupe Ouest Est des Leucémies et Autres Maladies du Sang (GOELAMS) : A. Martin, Hôpital Avicenne, Bobigny ; I. Soubeyran, P. Soubeyran, Institut Bergonié, Bordeaux; P. Dechelotte, A. Pilon, O.Tournilhac, Hôtel-Dieu, Clermont Ferrand ; P. Gaulard, MH Delfau, A Plonquet, C. Haïoun, Hôpital H Mondor, Créteil; T. Petrella, L. Martin, JN Bastié, O Casasnovas CHU, Dijon; B. Fabre, D. Salameire, R. Gressin, D. Leroux, MC Jacob CHU, Grenoble ; L. de Leval, B. Bisig, G. Fillet, C. Bonnet, CHU Sart-Tilman, Liège ; M.C. Copin, B. Bouchindhomme, F. Morschhauser, CHU, Lille ; B. Petit, A. Jaccard, Hôpital Dupuytren, Limoges, F. Berger, B. Coiffier, CHU Sud, Lyon ; T. Rousset, P. Quittet, G. Cartron, Hôpital Gui de Chauliac-St Eloi, Montpellier ; S. Thiebault, B. Drenou, Hôpital E. Muller, Mulhouse ; K. Montagne, S. Bologna, CHU de Brabois, Nancy ; C. Bossard, S. Le Gouill, Hôtel-Dieu, Nantes ; T. Molina, Hôtel-Dieu, Paris ; J. Brière, D. Sibon, C. Gisselbrecht, Hôpital St Louis, Paris ; B. Fabiani, A Aline-Fardin, P. Coppo, Hôpital Saint-Antoine, Paris ; F. Charlotte, J. Gabarre, Hôpital Pitié-Salpétrière, Paris ; J. Bruneau, D. Canioni, V. Verkarre, E Macintyre, V. Asnafi, O. Hermine, R. Delarue, F Suarez, JP Jaïs, Hôpital Necker, Paris ; M. Parrens, JP Merlio, E Laharanne, K. Bouabdallah, Hôpital Haut Lévêque, Bordeaux ; S.Maugendre-Caulet, P. Tas, T. Lamy, CHU Pontchaillou, Rennes ; JM Picquenot, F. Jardin, C. Bastard, Centre H Becquerel, Rouen ; M. Peoch', J. Cornillon, CHU, Saint Etienne ; L. Lamant, G. Laurent, Lucie Oberic, Hôpital Purpan, Toulouse ; J.Bosq, P. Dartigues, V. Ribrag, Institut G Roussy, Villejuif ; M. Patey, A. Delmer, Hôpital R. Debré, Reims ; JF Emile, K. Jondeau, Hôpital Ambroise Paré, Boulogne ; MC Rousselet, Mathilde Hunault, CHU, Angers ; C. Badoual, Hôpital européen Georges Pompidou, Paris ; C. Legendre, S. Castaigne, AL Taksin, CH Versailles, Le Chesnay ; J. Vadrot, A. Devidas, CH Sud francilien, Corbeil ;
F Lemonnier, M Travert, INSERM U955, Créteil ; P Dessen, G Meurice, Institut G Roussy, Villejuif ; M Delorenzi, E Missiaglia, N Houhou, Swiss Institut of Bioinformatics, Lausanne ; F Radvanyi, E Chapeaublanc, Institut Curie, Paris ; S Spicuglia, CIML, Marseille ; J Soulier, Hôpital St Louis, Paris ; C Thibault, IGBMC, Illkirsch.
V Fataccioli, project coordinator, Hôpital Henri Mondor, Créteil

Figure S1:

TET2 mutations are stable and also present at relapse stage in patients 351 and 179.

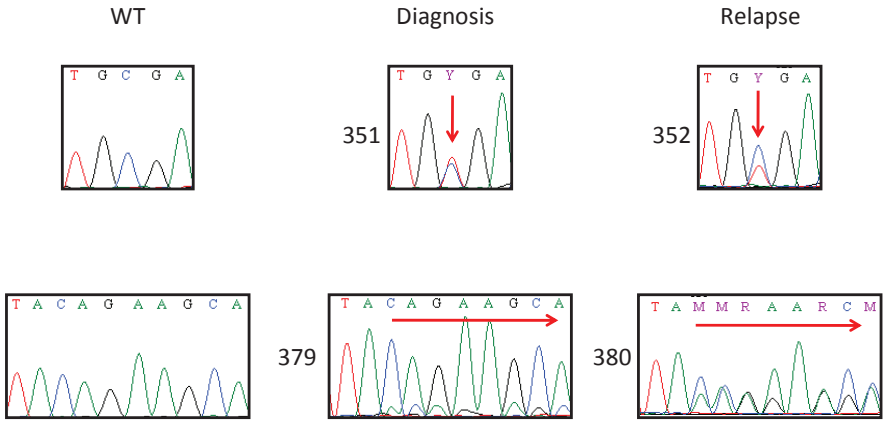


Table S1: Distribution of the mutations observed in PTCL.

	N	%
Frameshift	21	33%
Missense	7	11%
Nonsense	8	13%
Splice	1	2%
Frameshift X2	9	14%
Missense x 2	1	2%
Frameshift + missense	6	9%
Frameshift + nonsense	4	6%
Missense + nonsense	5	8%
Nonsense + Frameshift + Missense	1	2%
Nonsense + Splice	1	2%
Total	64	100%

Figure S2: A) Overall survival and B) Progression-free survival of AITL and PTCL-NOS patients according to the *TET2* status.

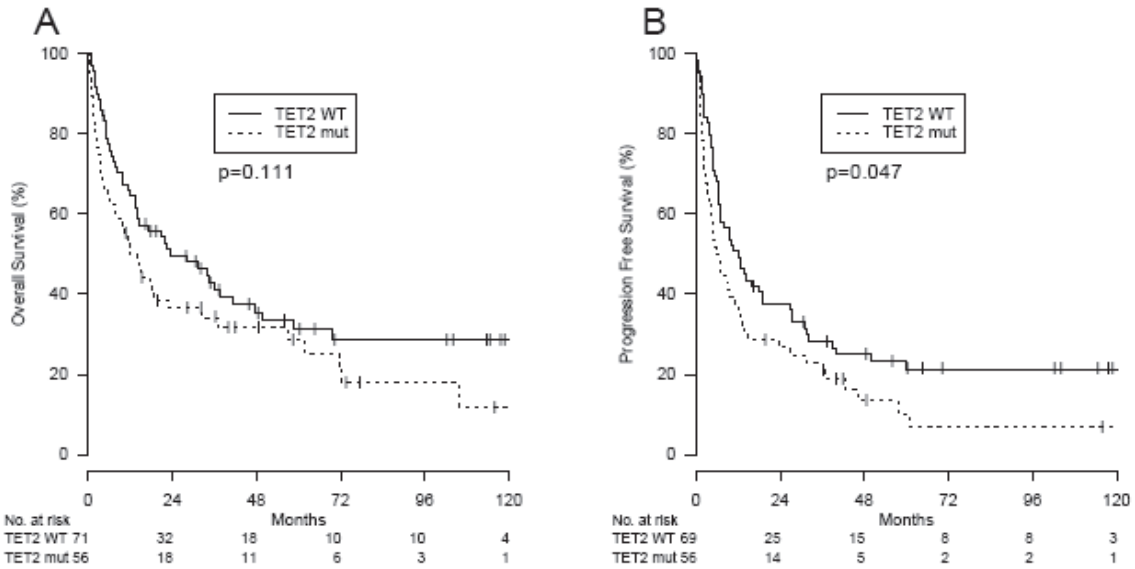


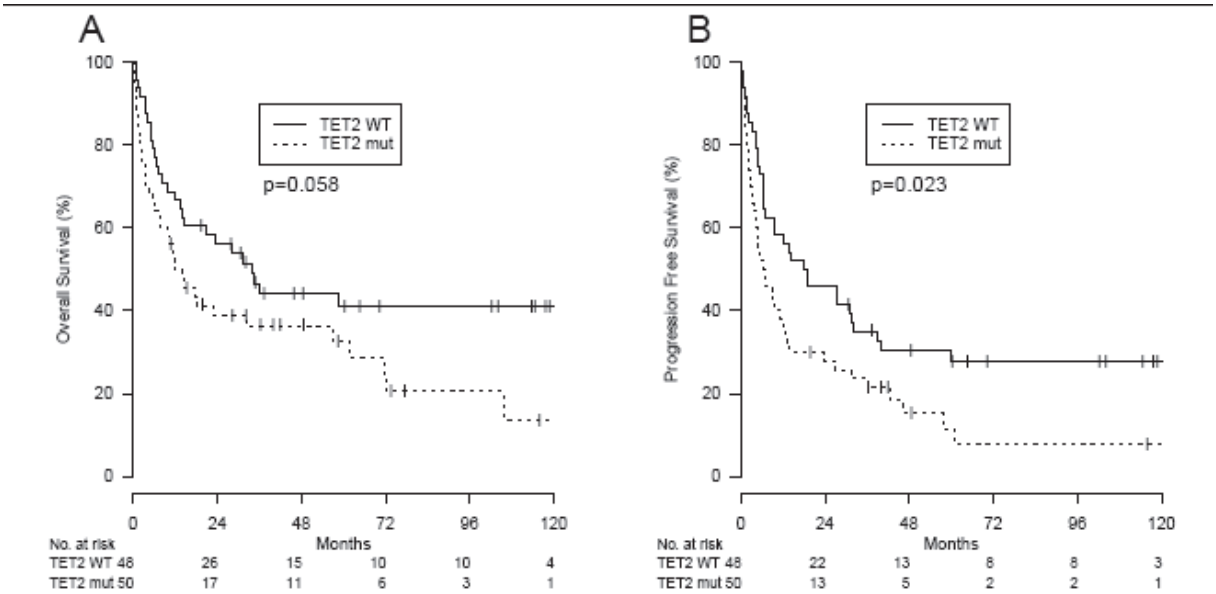
Table S2: Clinical data according to WT versus mutated *TET2* status in AITL and T_{FH}-like PTCL-NOS patients.

[1] : Fisher exact test, [2] : Wilcoxon sum rank test, [3] :Cochran Armitage test, [4] : Khi-2 test, [5]: log rank test

	TET2 mutation		TET2 WT		
N	54		56		
Sex					
Male	35	65%	23	41%	p=0,02[1]
Female	19	35%	33	59%	
Age (median)	68		68		p=0,89[2]
Stage					
1	0	0%	2	4%	p=0,045[3]
2	0	0%	2	4%	
3	10	21%	13	27%	
4	37	79%	32	65%	
Number of extra nodal localisations (median)	2		1		p=0,0727[2]
Lactate dehydrogenase					
Elevated	34	71%	32	67%	p=0,66[1]
Normal	14	29%	16	33%	
Hemoglobin					
≥10g/dL	29	71%	22	56%	p=0,24[1]
<10g/dL	12	29%	17	44%	
Platelet count					
≥150000/mm3	29	71%	35	92%	p=0,02[1]
<150000/mm3	12	29%	3	8%	
Direct Coombs test					
Positive	13	52%	13	54%	p=0,92[1]
Negative	12	48%	11	46%	
Hypergammaglobulinemia					
Yes	10	33%	11	42%	p=0,58[1]
No	20	67%	15	58%	
B symptoms					
Yes	35	78%	30	65%	p=0,16[1]
No	10	22%	16	35%	
Performans status					
0-1	19	43%	27	59%	p=0,14[1]
2-4	25	57%	19	41%	
International Prognosis Index					
0	0	0%	1	2%	p=0,0285[2]
1	2	4%	4	9%	
2	6	13%	7	15%	
3	10	22%	16	35%	
4	17	38%	15	33%	
5	10	22%	3	7%	
Prognosis Model for PTCL[18]					
0	2	5%	1	3%	p=0,0255[2]
1	2	5%	7	23%	
2	8	22%	11	37%	
3	16	43%	7	23%	
4	9	24%	4	13%	
Treatment					
Anthracycline based regimen	34	71%	24	50%	p=0,15[1]
Anthracycline based regimen and frontline transplantation	2	4%	7	15%	

Other combination of chemotherapy	5	10%	7	15%	
Single agent chemotherapy	5	10%	4	8%	
Palliative treatment	2	4%	6	13%	
5 years OS	32%		40%		p=0,0583[5]
5 Years PFS	11%		28%		p=0,0226[5]

Fig S3: A) Overall survival and B) Progression-free survival of AITL and T_{FH}-like PTCL patients according to *TET2* status.



3.4. Article 4 : *TET2* and *DNMT3A* mutations in human T-cell lymphoma

Les lymphomes T correspondent à un groupe d'entités hétérogènes de mauvais pronostic et mal caractérisées sur le plan moléculaire.[56] Nos précédents résultats indiquent que des mutations de *TET2* sont retrouvées chez 12% des cas de lymphome T, ce qui en fait l'évènement oncogénique le plus récurrent dans ce type de pathologie. Par ailleurs, nos données chez la souris et chez les patients suggèrent que les anomalies de *TET2* coopèrent avec d'autres évènements génétiques lors de la transformation tumorale.

Afin d'identifier de tels évènements au cours de la lymphomagenèse T, nous avons opté pour une approche ciblée de type « gène candidat » en nous focalisant sur l'analyse de gènes qui comme *TET2*, codent pour des protéines impliquées dans le contrôle épigénétique de la transcription. Notre choix s'est porté sur deux d'entre eux : *IDH* et *DNMT3A*.
Des mutations *IDH1* et *IDH2* sont en effet observées dans les hémopathies myéloïdes et sont mutuellement exclusives de celles de *TET2.*[153-159] Pour autant, ces protéines semblent, sur le plan fonctionnel, étroitement liées, puisque l'activité catalytique de TET2 est inhibée par le 2-hydroxyglutarate (2HG), un métabolite produit par les mutants IDH1/2 (Figure 15).[54,161]
Le gène *DNMT3A* code pour une DNA-méthyltransférase dont le rôle est d'ajouter un groupement méthyl aux cytosines (Figure 15). De plus, des mutations de *DNMT3A* ont été observées dans le même type d'hémopathies myéloïdes que celles de TET2.[172,173,178-183]

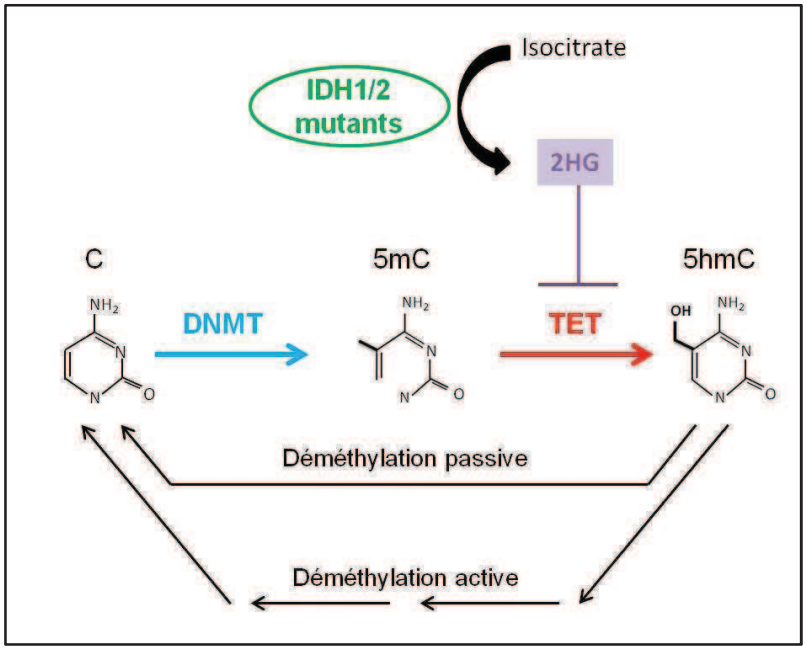


Figure 15 : Représentation schématique des fonctions des protéines DNMT, IDH et TET.

Nous avons donc analysé la séquence codante de *DNMT3A, IDH1* et *IDH2* dans une cohorte de 96 patients atteints de lymphomes T.

Nous n'avons pas détecté de mutation *IDH2* mais avons identifié des mutations d'*IDH1* chez 2 patients.

Sur les 96 lymphomes T, 11 (9 AITL et 2 non classifiés) étaient mutés pour *DNMT3A* soit 11% des cas. Dans notre série, les mutations *DNMT3A* sont significativement associées à la présence de mutations du gène *TET2* puisque 8 des 11 patients mutés pour *DNMT3A* ont également une mutation du gène *TET2*. ($p<10-4$, test exact de Fisher).

Chez un patient doublement muté *TET2-DNMT3A*, l'analyse de cellules isolées du lymphome a permis de montrer que les deux mutations sont présentes dans la même cellule. Chez deux patients pour lesquels un tri des sous-populations hématopoïétiques était possible, la mutation de *DNMT3A* est également observée dans la fraction des lymphocytes B CD19+, indiquant qu'elle survient précocement dans la différenciation lymphoïde. Enfin, deux patients doublement mutés pour *TET2* et *DNMT3A* avaient développé antérieurement à leur lymphome T un syndrome myélodysplasique. Chez ces deux patients, la mutation *DNMT3A* était également observée lors de la phase de myélodysplasie.

Nos données confirment que chez certains patients atteints de lymphome T, l'évènement oncogénique initiateur survient dans un progéniteur hématopoïétique précoce. La présence chez certains patients mutés d'une double pathologie suggère également de possibles voies de transformation communes aux lymphomes T et aux hémopathies myéloïdes. Enfin, la cooccurence des mutations de *TET2* et *DNMT3A* dans les lymphomes T pourrait avoir de réelles implications cliniques : diagnostiques pour l'aide à une nouvelle classification moléculaire et thérapeutiques, avec l'utilisation d'agents déméthylants qui pourraient se montrer efficaces dans de telles pathologies.

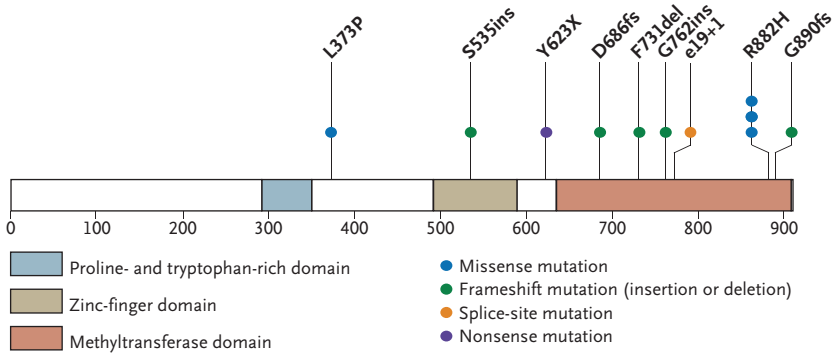
Since publication of their article, the authors report no further potential conflict of interest.

1. Joly D, Méjean A, Corréas JM, et al. Progress in nephron sparing therapy for renal cell carcinoma and von Hippel-Lindau disease. J Urol 2011;185:2056-60.
2. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: a need to reassess treatment effect. J Natl Cancer Inst 2006;98:1331-4.
3. Sun M, Thuret R, Abdollah F, et al. Age-adjusted incidence, mortality, and survival rates of stage-specific renal cell carcinoma in North America: a trend analysis. Eur Urol 2011;59:135-41.
4. Todres ID, Catlin EA, Thiel MM. The intensivist in a spiritual care training program adapted for clinicians. Crit Care Med 2005;33:2733-6.

TET2 and *DNMT3A* Mutations in Human T-Cell Lymphoma

TO THE EDITOR: Despite the poor prognosis of T-cell lymphomas, the genetic basis of these cancers is poorly defined.[1] We have found acquired *TET2* mutations in both human myeloid cancers[2] and T-cell lymphoma.[3] TET proteins are involved in the epigenetic control of transcription, at least through the oxidation of methylated cytosines and DNA demethylation.[4] The catalytic activity of the TET proteins is inhibited by 2-hydroxyglutarate, an oncogenic metabolite produced by the mutated forms of the IDH1 and IDH2 enzymes. *IDH* mutations are observed in myeloid cancers, but involvement in T-cell lymphoma has not been reported. We investigated the status of these genes in a cohort of 96 patients with T-cell lymphoma, including 18 with *TET2* mutations. Two *IDH1* mutations were detected, in an extranodal cutaneous lymphoma and in a not-otherwise-specified lymphoma.

We next investigated the status of the *DNMT3A* gene, which is mutated in human myeloid cancers[5] and whose product is involved in cytosine methylation. Eleven of the 96 patients (11%) had a *DNMT3A* mutation (Fig. 1). In addition, analyses of sequential samples from the same patients suggested an acquired nature in 4 cases (see the



Patients with *DNMT3A* Mutations	Diagnosis	*TET2* Status	*DNMT3A* Mutation Type	Nucleotide Change	Consequence
7	AITL	Mutated	Nonsense	c.2207C→A	p.Tyr623X
14	AITL	Mutated	Missense	c.2983G→A	p.Arg882His
15	AITL	Mutated	Deletion	c.2531_2533delTTC	p.Phe731del
16	AITL	Mutated	Insertion	c.1942_1943insACGACGACGACGGCTACCAGT	p.Ser535delinsTyrAspAspAspGlyTyrGInSer
17	PTCL,NOS	Mutated	Frameshift	c.2396_2402delCGTCCGC	p.Asp686fs
18	PTCL,NOS	Mutated	Frameshift	c.3006_3007delGG	p.Gly890fs
22	PTCL,NOS	Mutated	Missense	c.2983G→A	p.Arg882His
26	Unclassified T-cell lymphoma	Mutated	Missense	c.1456T→C	p.Leu373Pro
28	PTCL,NOS	Wild type	Missense	c.2983G→A	p.Arg882His
29	PTCL,NOS	Wild type	Splice	c.2660+1G→A	—
30	Unclassified T-cell lymphoma	Wild type	Insertion	c.2622_2623insCCATGG	p.Gly762delinsAlaMetGly

Figure 1. *DNMT3A* Mutations in 96 Patients with T-Cell Lymphoma, and *TET2* Status in Those with *DNMT3A* Mutations.
Each circle (top of figure) represents one patient with a *DNMT3A* mutation. Patients are from the study by Quivoron et al.,[3] except Patients 28 through 30. AITL denotes angioimmunoblastic T-cell lymphoma, PTCL peripheral T-cell lymphoma, and NOS not otherwise specified.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at INSERM DISC DOC on July 7, 2012. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Supplementary Appendix, available with the full text of this letter at NEJM.org). Nine of these lymphomas were of the angioimmunoblastic and not-otherwise-specified subtypes, and 2 were unclassified. Eight of the 11 patients with *DNMT3A* mutations (73%) also had *TET2* mutations; the association between the two mutations was significant (P<0.001 by Fisher's exact test). Furthermore, single-cell analyses showed the presence of *TET2* and *DNMT3A* mutations in 2 out of the 10 cells analyzed (see the Supplementary Appendix) in Patient 15. In Patients 15 and 30, the *DNMT3A* mutations were detected in the CD19+ blood fraction, indicating that they were acquired early in lymphoid differentiation. Patients 14 and 15, both of whom carry *TET2* and *DNMT3A* mutations, had a previous history of myelodysplastic syndrome. Analyses of DNA from the myelodysplastic-syndrome phase revealed both mutations to be present in Patient 14, but only the *DNMT3A* mutation was noted in Patient 15 (see the Supplementary Appendix). These data indicate that the two diseases have a common ancestry and that the *DNMT3A* mutation predates the *TET2* mutation in Patient 15.

Our data extend the common mutations linking T-cell lymphoma and myeloid cancer and provide a further basis for the molecular classification of T-cell lymphomas. They also suggest an oncogenic cooperation between *TET2* and *DNMT3A* mutations that may involve deregulation of the cytosine methylation and demethylation processes. These data may also have clinical implications; treatment with demethylating agents should be considered in the subset of patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma or peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, who have mutations in these genes.

Lucile Couronné, M.D.

Institut Gustave Roussy
Villejuif, France

Christian Bastard, M.D., Ph.D.

Centre Henri Becquerel
Rouen, France

Olivier A. Bernard, Ph.D.

INSERM Unité 985
Villejuif, France
olivier.bernard@inserm.fr

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

1. Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. Peripheral T-cell lymphoma. Blood 2011;117:6756-67.
2. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in *TET2* in myeloid cancers. N Engl J Med 2009;360:2289-301.
3. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. Cancer Cell 2011;20:25-38.
4. Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, Aifantis I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. Cell Stem Cell 2011;9:193-204.
5. Shah MY, Licht JD. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. Nat Genet 2011;43:289-90.

Correspondence Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society.

INSTRUCTIONS FOR LETTERS TO THE EDITOR

Letters to the Editor are considered for publication, subject to editing and abridgment, provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Please note the following:

- Letters in reference to a *Journal* article must not exceed 175 words (excluding references) and must be received within 3 weeks after publication of the article.
- Letters not related to a *Journal* article must not exceed 400 words.
- A letter can have no more than five references and one figure or table.
- A letter can be signed by no more than three authors.
- Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. Disclosures will be published with the letters. (For authors of *Journal* articles who are responding to letters, we will only publish new relevant relationships that have developed since publication of the article.)
- Include your full mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address with your letter.
- All letters must be submitted at authors.NEJM.org.

Letters that do not adhere to these instructions will not be considered. We will notify you when we have made a decision about possible publication. Letters regarding a recent *Journal* article may be shared with the authors of that article. We are unable to provide prepublication proofs. Submission of a letter constitutes permission for the Massachusetts Medical Society, its licensees, and its assignees to use it in the *Journal*'s various print and electronic publications and in collections, revisions, and any other form or medium.

NOTICES

Notices submitted for publication should contain a mailing address and telephone number of a contact person or department. We regret that we are unable to publish all notices received. Notices also appear on the Journal's *website (NEJM.org/medical-conference). The listings can be viewed in their entirety or filtered by specialty, location, or month.*

RADBOUD UNIVERSITY NIJMEGEN MEDICAL CENTER

The following courses will be offered in Nijmegen, the Netherlands: "Suffering, Death, and Palliative Care" (Feb. 14–17) and "Human Genetics and Medical Technology" (March 12–15).

Contact Simone Naber, IQ healthcare, Radboud University Nijmegen Medical Center, P.O. Box 9101, IQ 114, 6500 HB Nijmegen, the Netherlands; or call (31) 24 36 13359; or e-mail s.naber@iq.umcn.nl; or see http://www.iqhealthcare.nl or http://www.masterbioethics.org.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at INSERM DISC DOC on July 7, 2012. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2012 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Supplementary Appendix

This appendix has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

Supplement to: Couronné L, Bastard C, Bernard OA. *TET2* and *DNMT3A* mutations in human T-cell lymphoma. N Engl J Med 2012;366:95-6.

Table of contents

• Figure A: *DNMT3A* sequences comparison between tumor (lymph node) and non-tumor (blood) samples. Page 2

•Figure B: Sequence analyses of *TET2* and *DNMT3A* mutations in fractionated lymph node of patient #15. Page 3

• Figure C: Sequence analyses of the *DNMT3A* mutation in fractionated blood sample of patient #30. Page 4

• Figure D: Analyses of *TET2* and *DNMT3A* mutations in patients #14 and #15 at the time of myelodysplastic and T-lymphoma diseases. Sequences comparison between concomitant lymph node and blood samples of patient #16. Page 5

Figure A: *DNMT3A* sequences comparison between tumor (lymph node) and non-tumor (blood) samples. The variations of the signal ratio between normal and mutated nucleotides suggest the acquired nature of the mutations. Mutations are indicated by a vertical arrow (single nucleotide mutation) or an horizontal arrow (Insertion/deletion events). Note that clonal T-cell Receptor (TCR) rearrangement was detected in the blood sample of patient 17. Wild type sequences are shown for comparison purposes.

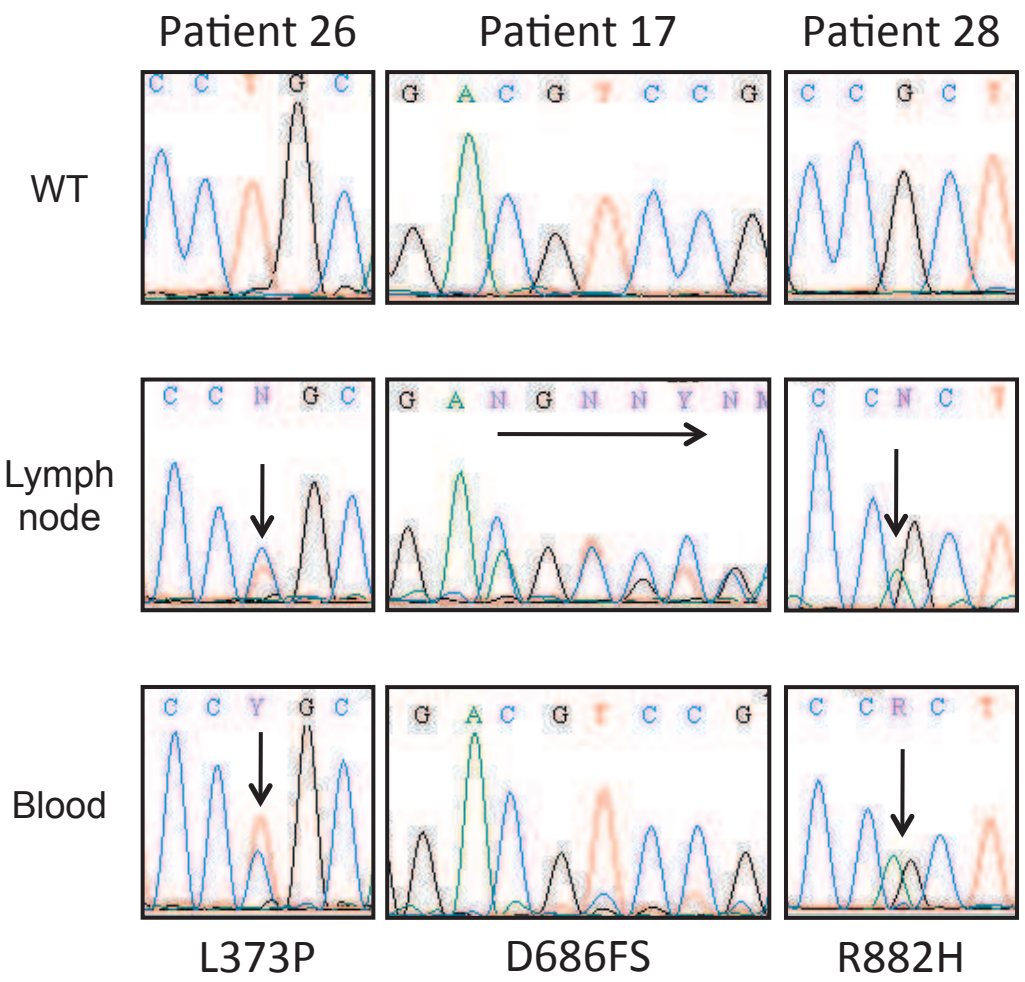


Figure B: Sequence analyses of *TET2* and *DNMT3A* mutations in fractionated lymph node of patients #15. Cells were sorted with Miltenyi beads or by fluorescence activated sorting, when indicated. Both mutations are observed in CD19+ (B lymphocytes) and CD19-CD3- fractions. 2 out of 10 single cell analyses were also positive for both mutations, indicating they are present in the same cell.

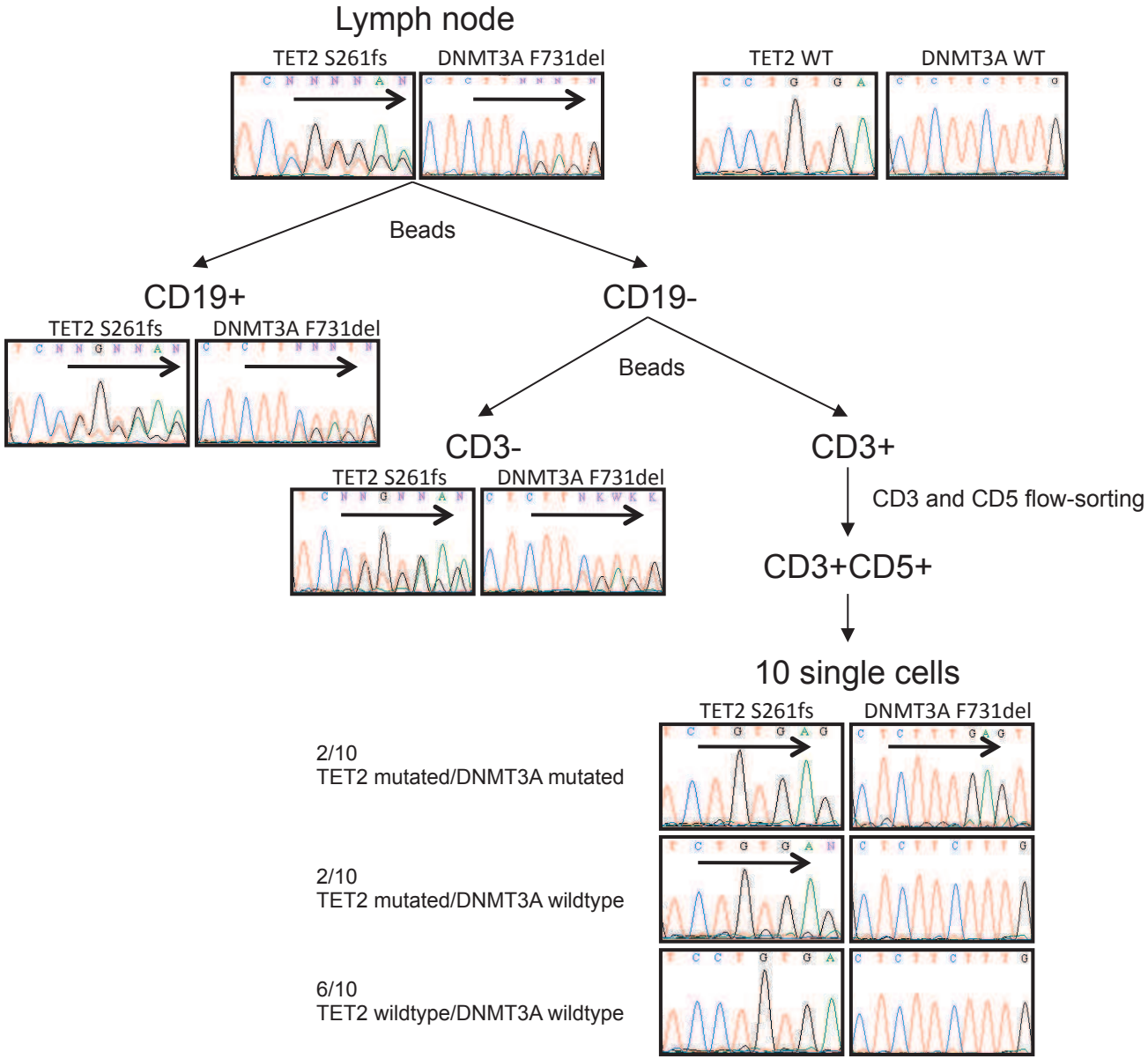


Figure C: Sequence analyses of the *DNMT3A* mutation in fractionated blood sample of patient #30. The mutations is readily observed at a variable ratio in CD34+,CD3+ and CD19+ fractions, but not in the CD34-,CD3-,CD19- fraction, suggesting both its acquired nature and an early occurrence during hematopoietic differentiation.

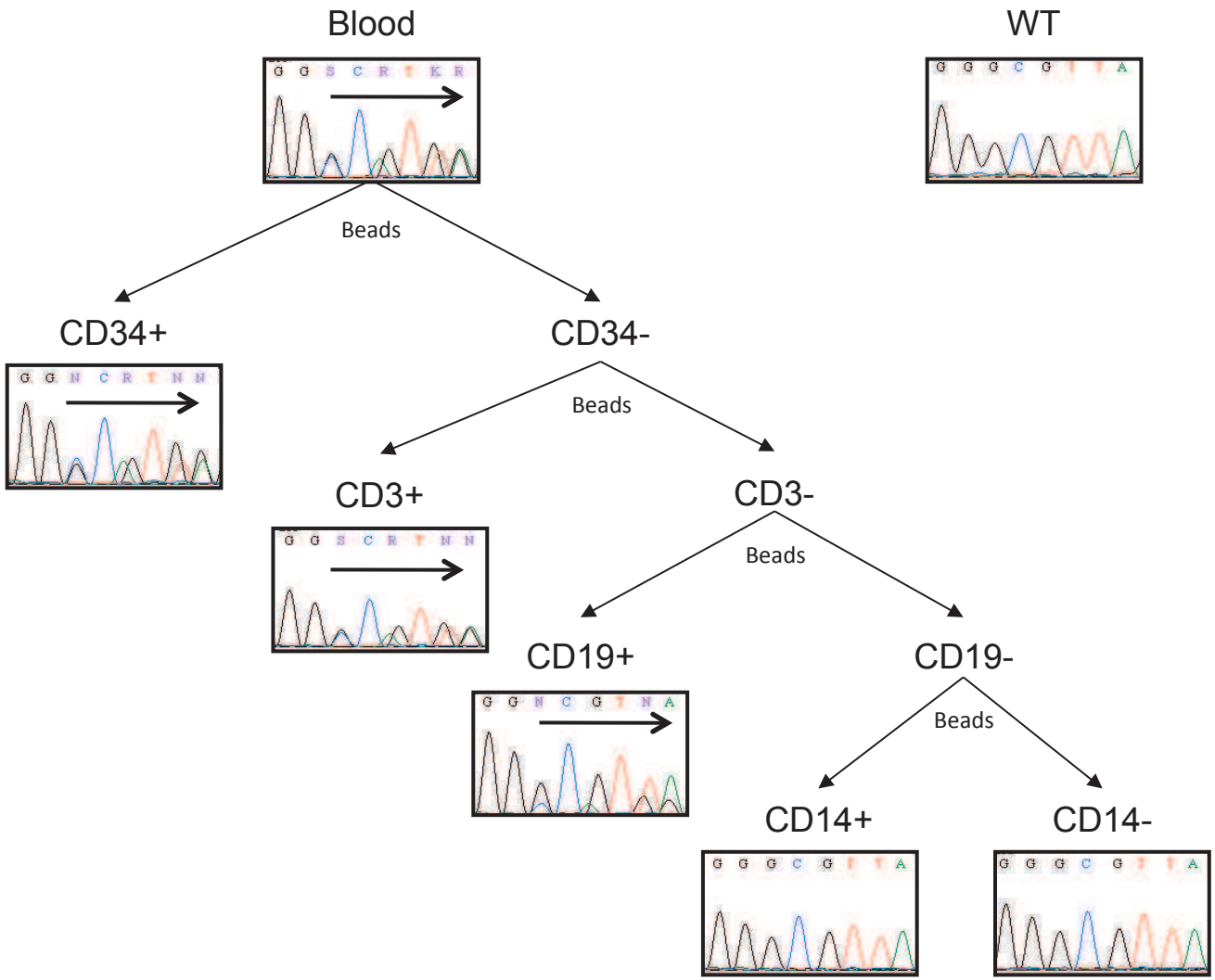
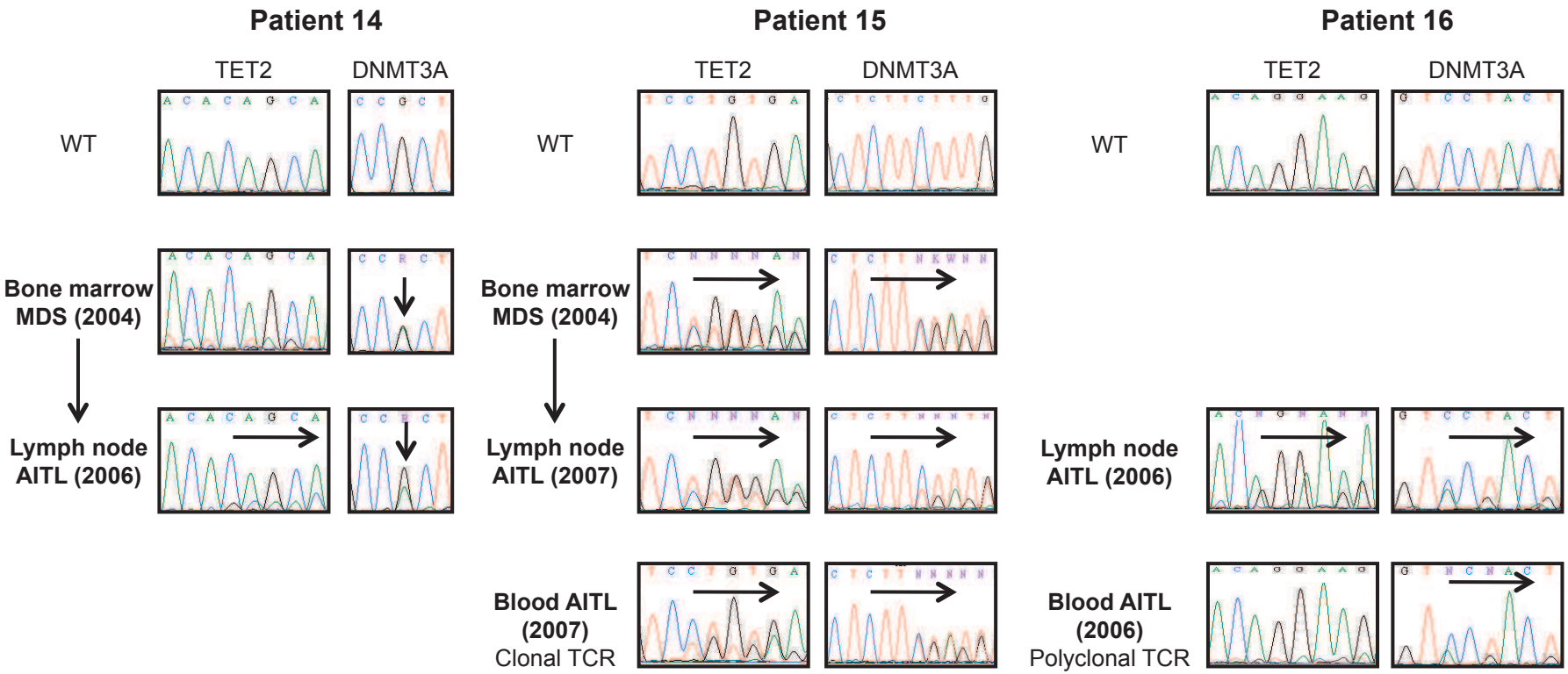


Figure D: Analyses of *TET2* and *DNMT3A* mutations in patient #15 showed the presence of both mutations in both the myelodysplastic and the T-lymphoma diseases. In patient #14, the *TET2* mutation is present only in the lymph node sample.
Sequences comparison between concomitant lymph node and blood samples of patient #16 showed *DNMT3A* mutation in both samples, whereas the *TET2* mutation is seen only in the tumor sample. These data indicate that either the *TET2* mutation is secondary to the *DNMT3A* mutation or that the two mutations are in different cells.



4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le gène *TET2* a été identifié comme un gène suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les hémopathies myéloïdes. Notre travail a permis d'identifier des mutations du gène TET2 dans les hémopathies lymphoïdes matures, en particulier celles de type T.

Nous avons pu montrer que les anomalies du gène *TET2* pouvaient cibler, dans certains cas, le compartiment des cellules souches hématopoïétiques, à la fois dans les hémopathies myéloïdes mais aussi dans les hémopathies lymphoïdes.

4.1. Implication de la CSH au cours de la pathogenèse des hémopathies lymphoïdes

Les cellules définies comme étant à l'origine de la tumeur sont celles portant les mutations dites « driver » qui, par opposition aux mutations « passenger » sont directement impliquées dans le développement de la maladie. Chez les patients atteints de leucémies aiguës myéloides, les cellules à l'origine de la tumeur semblent dériver de progéniteurs ou de CSH qui ont conservé leur potentiel d'autorenouvellement mais ont perdu leur capacité de différenciation.[198,199]

En revanche, dans les pathologies lymphoïdes, les cellules tumorales présentent un réarrangement du locus *TCR* ou de l'*IgH* suggérant que les cellules à l'origine de la tumeur proviennent de cellules déjà engagées vers la lignée lymphoïde. En outre, les cellules lymphoïdes peuvent facilement accumuler des anomalies génétiques, probablement parce qu'elles ont une durée de vie plus longue que celle des cellules myéloïdes et sont capables d'une expansion clonale avec conservation des capacités d'autorenouvellement.[200] En raison des propriétés particulières des cellules lymphoïdes, l'implication de la CSH dans la lymphomagenèse avait jusqu'alors été peu étudiée.

4.1.1. CSH et LLC

Récemment, le travail du groupe d'Akashi[201] a permis de montrer que les CSH pouvaient également jouer un rôle dans une hémopathie lymphoïde mature B telle que la leucémie lymphoïde chronique (LLC). L'analyse des moelles osseuses des patients atteints de LLC a d'abord mis en évidence une proportion plus importante de progéniteurs pro-B CD10+CD19+, multipliée par 5 par rapport aux sujets contrôles. Le locus *IgH* des CSH CD34+CD38- purifiées des patients avec LLC est en configuration germinale contrairement à celui des pro-B et des cellules de LLC CD34-CD19+, où sont respectivement détectés un réarrangement polyclonal et un réarrangement clonal. Ces données suggèrent que les clones de LLC sont sélectionnés *in vivo* au sein des pro-B polyclonaux.

La transplantation dans des souris immunodéficientes NOD SCID IL2Rgamma-/- (NSG) de CSH de patients atteints de LLC, définies sur leur phénotype (CD34+CD38- ou CD34+CD38-CD90) a permis le développement de clones B, CD5+ ou CD5-, contrairement aux contrôles où la proportion de cellules B CD5+ est très faible (<1%). Chez les souris « LLC », le réarrangement de l'*IgH* passe de polyclonal à clonal au cours de la différenciation des pro-B en B matures. De plus, plusieurs clones B sont observés avec des réarrangements *VDJ* distincts de ceux retrouvés chez les patients. Enfin, la transplantation des CSH provenant d'un seul patient avec LLC dans plusieurs souris montre que les réarrangements *VDJ* des clones B obtenus diffèrent entre les souris. L'ensemble de ces résultats indique qu'un processus de sélection clonale survient également en contexte de xénogreffe.

Par des xénogreffes sériées de CSH de patients avec LLC, le groupe d'Akashi a pu montrer que ces cellules regreffaient et donnaient naissance à chaque passage, à des clones B CD5+ et CD5-. Ces résultats démontrent que les CSH « LLC » ont conservé leur capacité d'autorenouvellement.

Le profil d'expression de ces cellules montre une surexpression de facteurs requis dans le développement lymphoïde précoce B, laissant supposer que ces CSH sont pré-engagées vers le lignage B.

L'absence d'anomalies détectées en FISH indique que les évènements génétiques récurrents dans la LLC, telles que la del13q14 ou la del11q23, surviennent en fait plus tardivement dans la maladie.

En conclusion, ce modèle de xénogreffe de CSH « LLC » permet en fait le développement d'une maladie se rapprochant plus de la lymphocytose B monoclonale (MBL), un stade précurseur de la LLC, que d'une réelle LLC. L'anomalie génétique primitive à l'origine de la MBL doit probablement être acquise au niveau d'une CSH ayant conservé ses capacités d'autorenouvellement. Ces CSH « LLC » produisent des B polyclonaux en nombre important puis certains clones B subissent une sélection et une expansion *in vivo*. Enfin, la survenue d'anomalies chromosomiques additionnelles permet la progression de la MBL en LLC (Figure 16).

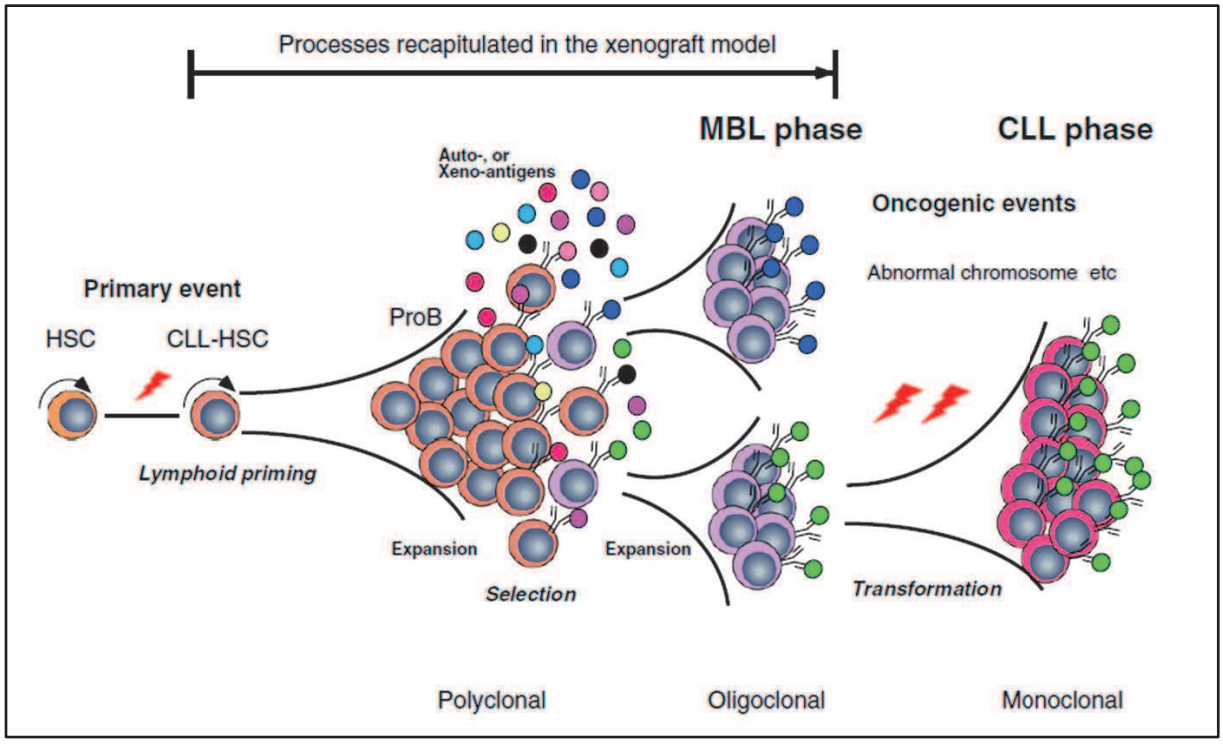


Figure 16 : Représentation schématique du développement de la LLC humaine basée sur un modèle de xénogreffe.[201] Les CSH « LLC » acquièrent des évènements génétiques à l'origine de l'expansion des pro-B polyclonaux. Les clones B sont ensuite sélectionnés *in vivo* en réponse à la stimulation par des auto- ou xéno-antigènes, ceci récapitulant le développement d'une MBL. Des anomalies additionnelles telles que des aberrations chromosomiques jouent par la suite probablement un rôle dans la progression de la MBL vers la LLC. Le modèle de xénogreffe ne permet pas de récapituler cette dernière étape.

Bien que n'ayant pas identifié d'évènement oncogénique précis touchant la CSH dans la LLC, les résultats du groupe d'Akashi vont dans le sens des nôtres. En effet nous avons montré que les anomalies de *TET2* ciblent la CSH chez certains patients atteints de lymphomes B ou T et conduisent au développement d'une hématopoïèse monoclonale. Comme dans les LLC, nous avons montré que dans certains cas, d'autres événements génétiques additionnels, tels qu'une inactivation de l'autre copie de *TET2* ou une mutation de *DNMT3A,* étaient nécessaires à la transformation tumorale.

4.1.2. CSH et lymphomes

Nos données indiquent que, y compris dans des pathologies lymphoïdes matures, la cellule souche hématopoïétique est fortement impliquée dans le processus de pathogenèse. Les travaux de Li *et al*[202] corroborent cette hypothèse selon laquelle les CSH des patients atteints de lymphomes peuvent être la cible d'événements génétiques primaires qui conduisent à la modulation de certaines de leurs fonctions. En effet, l'objectif de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'apparition de leucémie aiguë myéloïde (LAM) ou de syndrome myélodysplasique (SMD) post autogreffe chez des patients

atteints de lymphomes non Hodgkiniens. Les auteurs ont donc comparé les profils d'expression des CD34+ des patients ayant développé une LAM ou un SMD après l'autogreffe avec ceux des patients indemnes de toute pathologie, et ce à différents points de la maladie, avant l'autogreffe et après l'autogreffe lors de l'apparition de la LAM ou du SMD. De façon intéressante, il existe déjà des différences significatives entre les deux groupes avant l'autogreffe et donc avant le développement de la LAM ou du SMD, en particulier sur l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation hématopoïétique tels que *CEBP, HOX* ou *WNT*, dans le métabolisme mitochondrial, la phosphorylation oxydative, la réparation de l'ADN ou encore les points de contrôle du cycle cellulaire. Le modèle des auteurs est que l'exposition des CSH à des chimiothérapies antérieures conduit à une dysfonction mitochondriale et à l'augmentation des dérivés oxydatifs de l'oxygène, entraînant à son tour une augmentation des dommages cellulaires et des lésions de l'ADN, ce qui favorise la diminution de l'hématopoïèse et l'accumulation de mutations pouvant contribuer au développement de LAM ou de SMD.

Compte tenu de nos résultats, une hypothèse alternative est que les CSH de ces patients ont déjà été la cible d'évènements oncogéniques précurseurs, tels que des mutations de *TET2,* en partie à l'origine de la pathologie lymphomateuse et que sous l'effet de chimiothérapies ultérieures, le clone acquiert d'autres mutations à l'origine de la pathologie myéloïde post autogreffe.

4.1.3. Gènes mutés dans les hémopathies myéloïdes et lymphoïdes

Récemment des mutations du gène *SF3B1*, qui code pour un composant du spliceosome, ont été décrites à la fois dans les LLC avec une fréquence aux alentours de 10-15%[203-205] mais aussi dans diverses pathologies myéloïdes, en particulier dans les SMD où la fréquence des mutations de *SF3B1* peut atteindre 70% chez les patients avec anémie à sidéroblastes.[10,206-211]

De même le gène *EZH2* qui code pour l'unité catalytique du complexe Polycomb PRC2, une H3K27 méthyltransférase, est retrouvé muté à la fois dans les lymphomes B avec des mutations monoalléliques activatrices touchant la tyrosine 641[212] mais également dans les SMD et myélofibroses avec dans ces pathologies, des mutations « perte de fonction ».[213-215]

Ainsi des mutations de gènes impliqués dans le contrôle épigénétique de la transcription (*TET2, DNMT3A, EZH2*) ou plus directement dans le processus de transcription via le spliceosome (*SF3B1*) sont rapportées chez des patients avec maladie myéloïde mais aussi lymphoïde. Ces résultats suggèrent une atteinte précoce de la CSH au cours de la

pathogenèse mais aussi des voies de transformation communes entre ces deux types d'hémopathies. Ceci n'est probablement pas généralisable à tous les patients mais semble pouvoir s'appliquer à un petit nombre de nos cas mutés pour *TET2* ayant développé de manière séquentielle ou concomitante des pathologies myéloïde et lymphoïde.
Il apparaît ainsi que les anomalies de *TET2* mais aussi très probablement des mutations d'autres gènes conduisent au développement d'une hématopoïèse clonale qui fait le lit d'hémopathies à la fois myéloïdes et lymphoïdes.

4.2. Hétérogénéité tumorale

Notre modèle de lymphomagenèse s'appuie donc sur le modèle classique de cellule souche cancéreuse mais intègre également d'autres mécanismes tels que la sélection clonale par des évènements génétiques additionnels. De plus, le destin des cellules tumorales d'AITL et PTCL, NOS semble également étroitement lié à bon nombre de facteurs environnementaux, tels que l'impact du microenvironnement tumoral ou l'importance de la dysimmunité associée. L'imbrication de ces différents processus conduit à une grande hétérogénéité tumorale, qu'on pouvait déjà soupçonner à l'échelle du patient sur les examens histologiques ou cytogénétiques d'AITL ou de PTCL, NOS. Cette hétérogénéité tumorale semble être commune à beaucoup de cancers et ce via divers mécanismes.

4.2.1. Hétérogénéité intratumorale

En effet, tous les cancers ne suivent pas exactement le modèle de cellule souche et surtout d'autres mécanismes plus ou moins associés peuvent rendre compte de l'hétérogénéité intratumorale (Figure 17).
Des altérations génétiques et/ou épigénétiques peuvent être à l'origine de différences phénotypiques et fonctionnelles parmi les cellules d'une même tumeur. Ce processus conduit le plus souvent à sélectionner au sein de la tumeur le clone le plus agressif. Ce mécanisme d'évolution et de sélection clonale a été bien montré dans les leucémies aiguës lymphoïdes B mais également plus récemment dans les leucémies aiguës myéloïdes.[216-219]
Des facteurs extrinsèques (par exemple, la présence d'une vascularisation adjacente) peuvent également influencer les propriétés des cellules tumorales.[220]

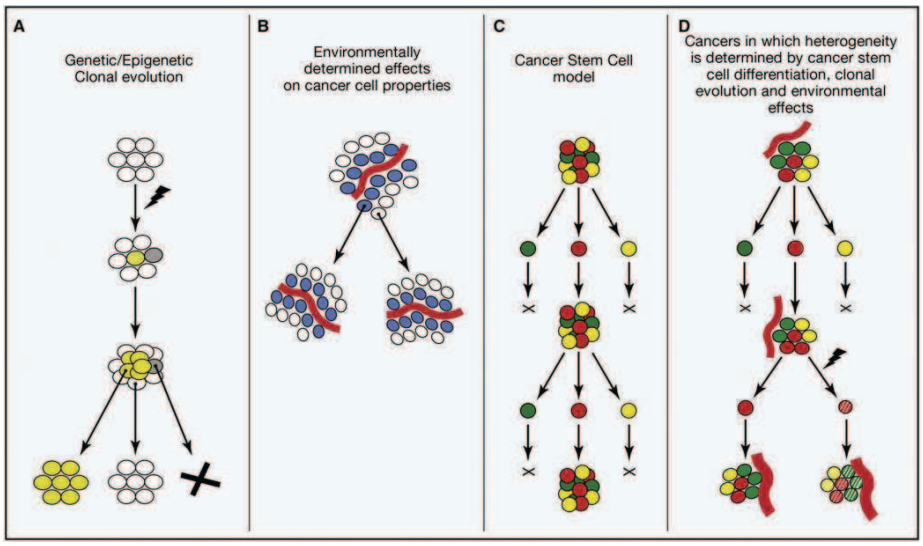


Figure 17 : Sources d'hétérogénéité intratumorale.[220]
A : Sélection clonale par des évènements génétiques et/ou épigénétiques aléatoires.
B : Facteurs extrinsèques environnementaux modifiant les propriétés des cellules tumorales.
C : Modèle classique hiérarchique de cellule souche cancéreuse avec une population minoritaire de cellules dites tumorigènes, capables de reproduire la maladie, et une population de cellules non tumorigènes.
D : Combinaison des 3 mécanismes précédents. Les sources d'hétérogénéité intratumorale ne sont pas mutuellement exclusives.

Enfin, au sein de certains cancers avec une organisation hiérarchique, la possibilité de réversion voire de transition entre les différents états cellulaires constitue un autre mécanisme d'hétérogénéité et il est dans ces cas très difficile de tester le modèle dit de « cellule souche cancéreuse » (Figure 18).[220]

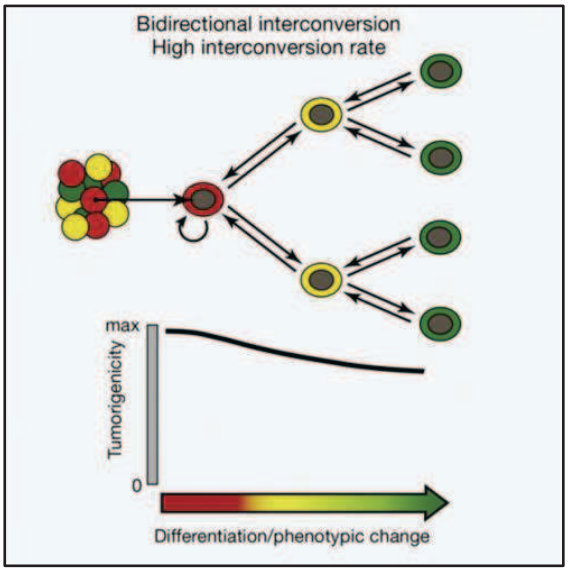


Figure 18 : Influence des transitions possibles entre les différents états cellulaires sur l'organisation hiérarchique du cancer.[220]

4.2.2. Hétérogénéité intertumorale

L'hétérogénéité est à la fois intratumorale mais aussi intertumorale, c'est-à-dire que tous les cancers d'un même type ne vont pas suivre exactement le même modèle. En particulier, l'origine de la souche cancéreuse influence clairement le phénotype des cellules tumorigènes.

Certains cancers peuvent provenir de la transformation de cellules souches normales par des mutations qui suractivent les programmes d'autorenouvellement tandis que d'autres dérivent de progéniteurs ou de cellules plus différenciées ayant acquis des mutations leur permettant d'exprimer de manière ectopique ces mêmes programmes.[198,221]

La localisation de la cellule d'origine peut également influencer les propriétés de la tumeur. Par exemple, les médulloblastomes se subdivisent en deux groupes : ceux dont la cellule d'origine se trouve dans les précurseurs cérébelleux, qui se caractérisent par une activation de la voie Sonic Hedgehog et ceux dont la cellule d'origine se localise dans le tronc cérébral, qui sont associés à une activation de la voie Wnt/Beta-caténine.[222]

Enfin, des différences temporelles peuvent être aussi à l'origine de cette hétérogénéité. En effet, les propriétés de « souchitude » et d'autorenouvellement se modifient avec l'âge,[223,224] ce qui influe sur le type de mutations capables d'initier le cancer. C'est probablement pour cette raison que certaines mutations initiatrices de tumeur ne sont observées que chez les personnes âgées alors que d'autres surviennent à tout âge ou plus particulièrement chez les enfants.[225]

4.3. Poursuite du travail

Compte tenu des données et résultats déjà obtenus, nous allons continuer nos travaux de recherche selon plusieurs axes.

4.3.1. Modélisation du processus de lymphomagenèse *in vivo*

Le processus de lymphomagenèse T paraît complexe, faisant intervenir un système hiérarchique partant de la CSH, des anomalies génétiques additionnelles, une sélection clonale, mais aussi d'autres acteurs responsables de l'hétérogénéité tumorale tels que le stroma péritumoral, les facteurs de croissance et chimiokines ou encore le système immunitaire.

Afin de le modéliser, nous avons opté pour un système classique de tumorigenèse *in vivo*, la xénogreffe de cellules humaines dans des souris hautement immunodéficientes de type NOD-SCID IL2Rgamma-/- (NSG). Nous allons donc transplanter des cellules tumorales de lymphome T issues du sang, si elles sont circulantes, ou de biopsies ganglionnaires.

Nos données indiquant une probable atteinte de la CSH dans les lymphomes T, nous allons également tenter de greffer des cellules progénitrices CD34+ de patients afin de savoir si ces cellules sont capables à elles seules de reproduire la maladie.

Ce procédé a tout de même quelques limites. La réalisation de xénogreffes de cellules humaines cancéreuses dans des souris immunodéficientes est en effet un bon moyen d'évaluer leur capacité tumorigène. Dans la plupart des cas, on utilise des souris hautement immunodéficientes telles que des NOD SCID IL2Rgamma-/- ou des NOD SCID traitées avec un antiCD122 permettant la déplétion des NK, afin de s'affranchir de toute réponse immune qui entraînerait l'éradication rapide des cellules injectées. Néanmoins, ces techniques permettent de tester le potentiel intrinsèque des cellules à reproduire la tumeur mais ne préjugent en rien de la destinée de ces cellules chez les patients.[220] En effet, de nombreux facteurs extrinsèques peuvent intervenir tels que la réponse immune, le microenvironnement tumoral, ou l'acquisition de nouvelles mutations (Figure 19). Le modèle de xénogreffe ne reflète donc que partiellement le processus de tumorigenèse.

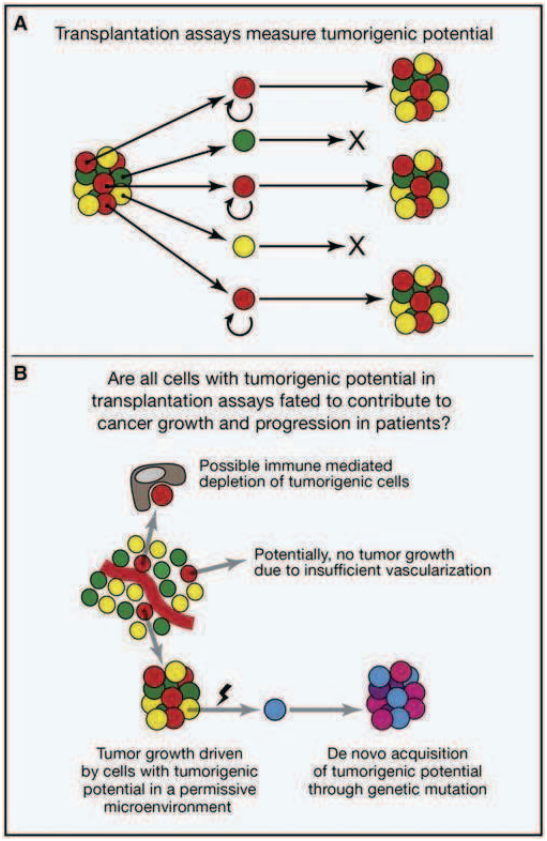


Figure 19 : Potentiel et destin des cellules tumorigènes.[220]
A : Le potentiel décrit ce que les cellules tumorales sont capables de faire dans un environnement permissif. Les modèles de xénogreffes permettent d'évaluer le potentiel des cellules à former des tumeurs.
B : Le destin reflète ce que les cellules font réellement dans un environnement spécifique. En effet, la plupart des cellules qui ont pourtant la capacité de former des tumeurs dans un contexte de xénogreffe, ne contribuent finalement pas au développement de la maladie chez le patient car elles ne sont pas dans un environnement permissif.

4.3.2. Modélisation de la coopération oncogénique *TET2-DNMT3A*

Chez les patients atteints de lymphome T, nous avons observé une association des mutations *TET2* et *DNMT3A*, ce qui suggère une potentielle coopération de ces deux types d'anomalies au cours de la lymphomagenèse T.

Afin de mieux comprendre leurs rôles dans le processus de transformation tumorale, nous avons modélisé cette coopération chez la souris par un système de transduction-transplantation. Nous avons utilisé des donneurs *Tet2*+/+ et *Tet2*-/- et avons transduit un vecteur vide, un vecteur contenant *DNMT3A* WT et un vecteur contenant le mutant *DNMT3A* R882H.

Ces transductions-transplantations sont résumées dans la Figure 20.

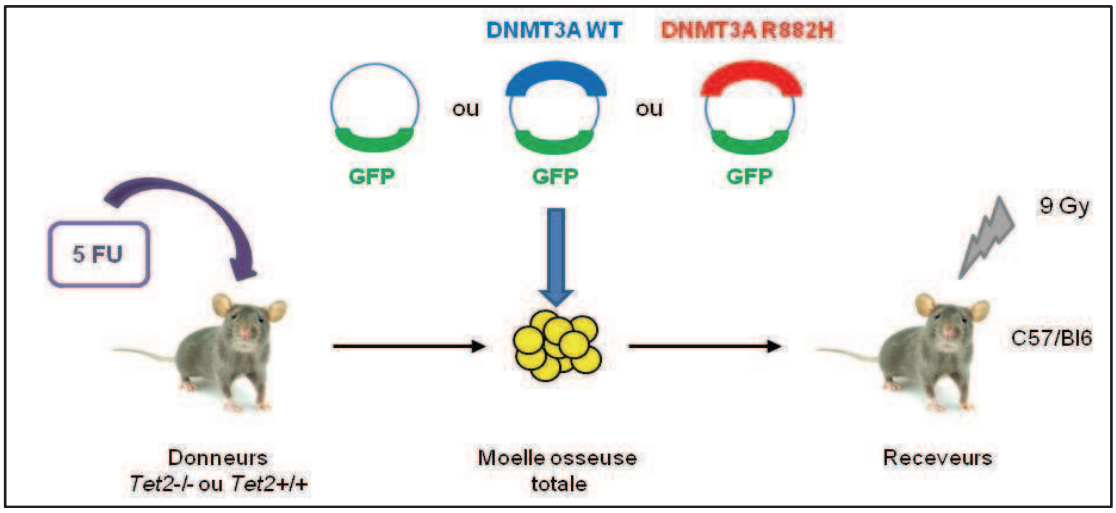


Figure 20 : Modélisation de la coopération oncogénique *TET2-DNMT3A* chez la souris. Les souris donneuses Tet2+/+ ou Tet2-/- ont été préalablement injectées au 5 fluoro-uracile (5 FU) afin d'enrichir leur moelle osseuse en progéniteurs hématopoïétiques. Six jours plus tard, ces souris ont été sacrifiées afin de récupérer les cellules primaires de moelle osseuse. Les cellules ont été infectées via deux spinoculations successives, réalisées à 24h d'intervalle, par les particules virales contenant les différentes constructions. Elles ont ensuite été réinjectées par voie intraveineuse à des souris receveuses préalablement irradiées à la dose de 9 Gy (dose létale).

Le monitoring de ces souris s'effectue par un prélèvement sanguin mensuel permettant de surveiller d'une part la numération sanguine (nombre de leucocytes, de plaquettes et taux d'hémoglobine) mais également d'évaluer le chimérisme et la prise de greffe par l'expression de la protéine fluorescente GFP. Les souris seront analysées quand elles présenteront des signes cliniques de maladie.

Les résultats préliminaires montrent une bonne prise de greffe pour toutes les conditions testées, que les donneurs soient *Tet2*-/- ou *Tet2*+/+ et quel que soit le vecteur rétroviral utilisé (vide, avec insert de *DNMT3A* WT ou avec insert de *DNMT3A* R882H)

4.3.3. Analyse du rôle de Tet2 dans la différenciation lymphoïde

Afin d'étudier le rôle spécifique de Tet2 au cours de la différenciation lymphoïde B et T, nous avons développé au laboratoire deux modèles murins dans lesquels *Tet2* est spécifiquement inactivé dans les lignages B et T (souris *Tet2* CD2cre) ou dans le lignage T seul (souris *Tet2* CD4cre). Les analyses de ces souris sont en cours.

4.4. Identification des mutations de *TET2* chez les patients : perspectives

4.4.1. Perspectives diagnostiques

Sur le plan diagnostique, compte tenu de l'association entre un taux bas de 5hmC et la présence de la mutation *TET2*,[139] on pourrait proposer un screening des patients par une étude de leur taux de 5hmC. Ce test serait probablement plus facile à mettre en place que le séquençage des 9 exons codants du gène qui comporte 16 PCR. La question est maintenant de savoir si le taux de 5hmC est corrélé au pronostic, comme peut l'être la présence de mutations *TET2* dans certains sous-groupes de pathologies. Si tel était le cas, ce marqueur permettrait une meilleure classification pronostique des hémopathies myéloïdes.

4.4.2. Perspectives thérapeutiques

Dans diverses pathologies, qu'elles soient myéloïdes ou lymphoïdes, il a été montré que les mutations de *TET2* pouvaient survenir dans un progéniteur précoce voire dans une cellule souche hématopoïétique.[31,36,38,144,226] Ces données pourraient radicalement modifier les approches thérapeutiques, en particulier dans des hémopathies dites « matures » telles que les lymphomes T ou encore les lymphomes B diffus à grandes cellules ou folliculaires, en incitant à développer des thérapies qui cibleraient la cellule souche hématopoïétique. De plus, le traitement de certains patients atteints de lymphomes peut comporter un recours à l'autogreffe, qui consiste en la réinjection d'un greffon riche en cellules CD34+. Ce greffon est prélevé en période de rémission clinique et est toujours testé pour la présence ou non de cellules tumorales circulantes par l'étude du réarrangement de l'*IgH* ou du *TCR*. Or il a été montré que chez certains patients, la mutation de *TET2* présente au niveau des cellules lymphomateuses l'était également au niveau des cellules CD34+ ; elle pouvait même être observée à un faible niveau dans des produits de cytaphérèse de patients dits « en rémission » au moment du prélèvement. Ces résultats pourraient expliquer une partie des rechutes après autogreffe.

Enfin, TET2 ayant un rôle certain dans le contrôle épigénétique de la transcription, l'on peut proposer que les patients mutés pour *TET2* soient plus sensibles aux thérapies ciblant les processus épigénétiques que les patients sauvages pour *TET2*. Les rares données de la

littérature ne permettent pas de répondre de façon claire. Une étude sur l'efficacité de la décitabine, un agent hypométhylant inhibiteur des DNA méthyltransférases, chez les patients atteints de LMMC n'a pas montré de différence de réponse selon la présence ou non d'une mutation de *TET2*.[227] Chez les patients souffrant de SMD, une première publication de 2010[228] retrouvait un impact péjoratif des mutations de *TET2* sur la réponse à l'azacitidine, un autre agent hypométhylant, mais chez seulement 12 patients analysés. Dans une série plus large de 38 cas, Voso *et al*[229] ne rapportaient pas de différence de réponse à l'azacitidine, entre les patients mutés pour *TET2* et ceux qui ne le sont pas. Enfin, Itzykson *et al*[53] ont montré dans une série de 86 patients atteints de SMD et LAM, que la présence d'une mutation de *TET2* était corrélée à un taux plus élevé de réponse à l'azacitidine mais n'influençait pas la durée de réponse ou la survie globale. Des études de cohortes plus homogènes et plus grandes sont probablement nécessaires pour établir ou non un éventuel impact des mutations de *TET2* sur la réponse aux agents hypométhylants. Néanmoins, il paraît légitime de se poser la question de l'utilisation de tels agents dans d'autres hémopathies avec mutations de *TET2*, en particulier dans les pathologies lymphoïdes.

4.4.3. Association des mutations *TET2, IDH2* et *DNMT3A*

Les fréquences de mutations observées dans les deux cohortes testées (articles 3 et 4) sont résumées dans le Tableau 8.

	Cohorte article 3	**Cohorte article 4**
Nombre de patients	77*	96
Pathologie	Lymphome T	Lymphome T
Patients mutés *TET2*	31 (40%)	18 (19%)
Patients mutés *IDH1*	0 (0%)	2 (2%)
Patients mutés *IDH2*	8 (10%)	0 (0%)
Patients mutés *DNMT3A*	12 (16%) ¤	11 (11%)
Patients mutés *TET2* et *DNMT3A*	10 (13%) ¤	8 (8%)
Patients mutés *TET2* et *IDH2*	6 (8%)	0 (0%)
Patients mutés *TET2, IDH2* et *DNMT3A*	4 (5%) ¤	0 (0%)
Remarques	Mutations *TET2* et *DNMT3A* associées aux sous-types AITL et PTCL, NOS TFH-like Mutations *IDH2* associées au sous-type AITL	Mutations *TET2* et *DNMT3A* associées aux sous-types AITL et PTCL, NOS

Tableau 8 : Taux de mutations de *TET2*, *IDH1/2* et *DNMT3A* observés dans les cohortes des articles 3 et 4. *Seule une fraction des patients analysés dans l'article 3 (77 sur 190) a été testée pour les quatre gènes. ¤ Données non publiées.

Il est à noter que ces deux séries de patients avec lymphome T ne sont pas comparables en termes de représentation de chaque sous-type histologique. En effet, la cohorte de l'article 3 comporte proportionnellement plus de lymphomes T angio-immunoblastiques (AITL) et de lymphomes T périphériques non spécifiés (PTCL, NOS), ce qui peut expliquer la fréquence plus élevée des mutations *TET2* dans cette série.

Nos résultats, issus de deux cohortes indépendantes, indiquent une association entre les mutations de *TET2* et celles de *DNMT3A* chez les patients atteints de lymphomes T, en particulier ceux avec AITL ou PTCL, NOS. Cette association semble spécifique de la pathologie lymphomateuse T et n'est pas retrouvée dans les hémopathies myéloïdes.

Les données concernant les mutations d'I*DH2* sont quant à elles plus difficiles à interpréter. Il est en effet connu que les mutations *IDH1-IDH2* et *TET2* sont mutuellement exclusives chez les patients atteints d'hémopathie myéloïde.[153-159] Cette observation semble cohérente avec le fait que les mutants IDH1/2 et TET2 ont des conséquences fonctionnelles très proches, sur le plan épigénétique mais aussi au niveau plus global de l'hématopoïèse.[54]

Dans notre première série de patients avec lymphomes T (articles 2 et 4), nous n'avions pas détecté de mutations *IDH2*. Dans la deuxième cohorte (article 3), sur les 31 patients testés avec AITL, des mutations d'*IDH2* étaient détectées dans 8 cas (26%) et étaient associées chez 6 d'entre eux, aux mutations de *TET2*. Ces résultats ont par la suite été confirmés dans une plus large cohorte par le groupe de Mak qui retrouvait des mutations du gène *IDH2* chez plus de 20% des patients (16/79) atteints d'AITL.[230] Dans cette étude, le statut *TET2* n'était pas connu. Il s'agissait de mutations hétérozygotes affectant essentiellement le hospot R172 (15/16). Aucune différence concernant la présentation clinique ou le pronostic n'était observée entre les patients *IDH2* mutés et les patients *IDH2* sauvages.

Ces discordances concernant la fréquence des mutations *IDH2* chez les patients avec lymphomes T peuvent être liées aux techniques de séquençage employées : pour la première cohorte, nous avions utilisé la technique classique de Sanger, alors que pour la seconde et celle du groupe de Mak, avait été utilisé le système de « Sequenom genotyping » qui semble plus sensible pour la détection de mutations faiblement représentées dans la population tumorale. En effet, le contingent tumoral dans les lymphomes T en particulier les AITL et les PTCL, NOS est peu représenté, ce qui peut poser des problèmes pour la détection de certaines mutations. Afin de déterminer la fréquence réelle des mutations *IDH2* chez les patients atteints d'AITL et leur éventuelle association aux mutations *TET2*, nous

avons choisi au laboratoire d'utiliser une technique de séquençage haut débit de plus grande sensibilité type Ion Torrent. Les analyses sont actuellement en cours.

L'autre possibilité est que les mutations *IDH2* ne se situent pas dans les cellules tumorales mais plutôt dans les cellules de l'infiltrat réactionnel, ce qui, là aussi, rend leur détection difficile. Afin de répondre à cette question, des analyses ultérieures de tri des différentes sous-populations présentes dans le tissu tumoral seront nécessaires.

5. CONCLUSION

Le gène *TET2* est muté dans environ 20% des hémopathies myéloïdes, et 12% des lymphomes T. La plupart des mutations sont acquises et conduisent à l'inactivation du gène. Les mutations de *TET2* sont principalement observées dans deux sous-types assez proches de lymphome T, l'AITL et le PTCL, NOS TFH-like. Ces deux entités semblent dériver de lymphocytes T Follicular helper, indiquant un éventuel rôle de TET2 au cours de la différenciation des T en TFH, et plus globalement au cours de la différenciation lymphoïde T.

Les mutations de *TET2* sont associées chez les patients atteints d'AITL ou de PTCL, NOS, aux mutations de *DNMT3A*. Les statuts mutationnels de *TET2* et *DNMT3A* pourraient donc servir de biomarqueurs dans le cadre d'une nouvelle classification moléculaire des lymphomes T. Bien que les protéines TET2 et DNMT3A soient toutes les deux impliquées dans le contrôle épigénétique de la transcription, leur lien fonctionnel et le rôle de chacune au cours de la lymphomagenèse restent à préciser.

Les résultats dans les modèles murins d'inactivation de *Tet2* ainsi que les observations chez les patients suggèrent que la protéine TET2 contrôle l'homéostasie du compartiment hématopoïétique. Ainsi, il apparaît que les mutations de *TET2* sont capables d'induire le développement d'une hématopoïèse clonale mais ne sont pas suffisantes au processus de transformation cellulaire. Selon notre hypothèse, les hémopathies malignes myéloïdes ou lymphoïdes se développeraient à partir d'une même atteinte du compartiment des cellules souches hématopoïétiques puis, la survenue d'autres événements génétiques serait responsable du phénotype myéloïde ou lymphoïde de la maladie.

Ce nouveau concept bouleverse le modèle classique de pathogenèse des lymphomes dans lequel la cellule initiatrice de la maladie était une cellule déjà engagée dans la lignée lymphoïde. Concernant le traitement, il y aurait donc un intérêt à cibler de façon plus précise la cellule souche hématopoïétique, y compris dans les pathologies lymphomateuses. De plus, compte tenu de la fonction des protéines TET2 et DNMT3A, des thérapies ciblées « épigénétiques » pourraient potentiellement être efficaces dans de telles maladies.

En conclusion, bien que de nombreux processus génétiques et épigénétiques restent à découvrir, nos travaux ont permis de poser quelques bases pour une meilleure compréhension de la lymphomagenèse T, l'objectif restant à terme de mieux prendre en charge les patients atteints de telles pathologies.

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111.

2. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, et al. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity*. 2001;15(4):659-669.

3. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 2005;121(2):295-306.

4. Mercher T, Cornejo MG, Sears C, et al. Notch signaling specifies megakaryocyte development from hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):314-326.

5. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.

6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951.

7. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):118-129.

8. Valent P, Wieser R. Update on genetic and molecular markers associated with myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):341-348.

9. Graubert TA, Shen D, Ding L, et al. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2012;44(1):53-57.

10. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69.

11. Damm F, Kosmider O, Gelsi-Boyer V, et al. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(14):3211-3218.

12. Hahn CN, Scott HS. Spliceosome mutations in hematopoietic malignancies. *Nat Genet*. 2012;44(1):9-10.

13. Thol F, Kade S, Schlarmann C, et al. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012;119(15):3578-3584.

14. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985;315(6020):550-554.

15. Davis RL, Konopka JB, Witte ON. Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. *Mol Cell Biol*. 1985;5(1):204-213.

16. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.

17. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):673-683.

18. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468.

19. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476.

20. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-1061.

21. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652-1660.

22. Jones AV, Kreil S, Zoi K, et al. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106(6):2162-2168.

23. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108(4):1377-1380.

24. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood*. 2007;110(1):375-379.

25. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009;114(1):144-147.

26. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFRA correlates. *Leukemia*. 2009;23(5):900-904.

27. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia*. 2009;23(7):1343-1345.

28. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia*. 2009;23(5):905-911.

29. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;113(25):6403-6410.

30. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009;41(7):838-842.

31. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360(22):2289-2301.

32. Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*. 2003;17(3):637-641.

33. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res*. 2002;62(14):4075-4080.

34. Viguie F, Aboura A, Bouscary D, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia*. 2005;19(8):1411-1415.

35. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-823.

36. Schaub FX, Looser R, Li S, et al. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;115(10):2003-2007.

37. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Cheok M, et al. TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*. 2009;114(15):3285-3291.

38. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*. 2010;116(19):3923-3932.

39. Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, et al. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*. 2010;28(24):3858-3865.

40. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica*. 2009;94(12):1676-1681.

41. Grossmann V, Kohlmann A, Eder C, et al. Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*. 2011;25(5):877-879.

42. Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117(21):e198-206.

43. Roche-Lestienne C, Marceau A, Labis E, et al. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011.

44. Chou WC, Chou SC, Liu CY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011.

45. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1373-1381.

46. Nibourel O, Kosmider O, Cheok M, et al. Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission. *Blood*. 2010;116(7):1132-1135.

47. Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1,185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011.

48. Couronne L, Lippert E, Andrieux J, et al. Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010;24(1):201-203.

49. Kosmider O, Delabesse E, de Mas VM, et al. TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study. *Haematologica*. 2011;96(7):1059-1063.

50. Langemeijer SM, Jansen JH, Hooijer J, et al. TET2 mutations in childhood leukemia. *Leukemia*. 2011;25(1):189-192.

51. Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, et al. Mutations of an E3 ubiquitin ligase c-Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(10):1969-1975.

52. Perez B, Kosmider O, Cassinat B, et al. Genetic typing of CBL, ASXL1, RUNX1, TET2 and JAK2 in juvenile myelomonocytic leukaemia reveals a genetic profile distinct from chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2010;151(5):460-468.

53. Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, et al. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2011;25(7):1147-1152.

54. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. 2010;18(6):553-567.

55. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-5032.

56. Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. Peripheral T-cell lymphoma. *Blood*. 2011;117(25):6756-6767.

57. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol*. 2008;26(25):4124-4130.

58. de Leval L, Gaulard P. Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas. *Histopathology*. 2011;58(1):49-68.

59. Gallamini A, Stelitano C, Calvi R, et al. Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood*. 2004;103(7):2474-2479.

60. Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al. CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. *Br J Haematol*. 1990;74(2):161-168.

61. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281-1284.

62. de Leval L, Gaulard P. Tricky and terrible T-cell tumors: these are thrilling times for testing: molecular pathology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:336-343.

63. Feldman AL, Dogan A, Smith DI, et al. Discovery of recurrent t(6;7)(p25.3;q32.3) translocations in ALK-negative anaplastic large cell lymphomas by massively parallel genomic sequencing. *Blood*. 2011;117(3):915-919.

64. Feldman AL, Law M, Remstein ED, et al. Recurrent translocations involving the IRF4 oncogene locus in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2009;23(3):574-580.

65. Wada DA, Law ME, Hsi ED, et al. Specificity of IRF4 translocations for primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma: a multicenter study of 204 skin biopsies. *Mod Pathol*. 2011;24(4):596-605.

66. Pham-Ledard A, Prochazkova-Carlotti M, Laharanne E, et al. IRF4 gene rearrangements define a subgroup of CD30-positive cutaneous T-cell lymphoma: a study of 54 cases. *J Invest Dermatol*. 2010;130(3):816-825.

67. Gualco G, Weiss LM, Bacchi CE. MUM1/IRF4: A Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(4):301-310.

68. Salaverria I, Bea S, Lopez-Guillermo A, et al. Genomic profiling reveals different genetic aberrations in systemic ALK-positive and ALK-negative anaplastic large cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2008;140(5):516-526.

69. Agnelli L, Mereu E, Pellegrino E, et al. Identification of a 3-gene model as a powerful diagnostic tool for the recognition of ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 2012;120(6):1274-1281.

70. Piva R, Agnelli L, Pellegrino E, et al. Gene expression profiling uncovers molecular classifiers for the recognition of anaplastic large-cell lymphoma within peripheral T-cell neoplasms. *J Clin Oncol*. 2010;28(9):1583-1590.

71. Mourad N, Mounier N, Briere J, et al. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood*. 2008;111(9):4463-4470.

72. de Leval L, Gaulard P. Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:272-279.

73. Brauninger A, Spieker T, Willenbrock K, et al. Survival and clonal expansion of mutating "forbidden" (immunoglobulin receptor-deficient) epstein-barr virus-infected b cells in angioimmunoblastic t cell lymphoma. *J Exp Med*. 2001;194(7):927-940.

74. Nelson M, Horsman DE, Weisenburger DD, et al. Cytogenetic abnormalities and clinical correlations in peripheral T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141(4):461-469.

75. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood*. 2002;99(2):627-633.

76. Ree HJ, Kadin ME, Kikuchi M, Ko YH, Suzumiya J, Go JH. Bcl-6 expression in reactive follicular hyperplasia, follicular lymphoma, and angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: heterogeneity of intrafollicular T-cells and their altered distribution in the pathogenesis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 1999;30(4):403-411.

77. Bisig B, Gaulard P, de Leval L. New biomarkers in T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2012;25(1):13-28.

78. Grogg KL, Attygalle AD, Macon WR, Remstein ED, Kurtin PJ, Dogan A. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a neoplasm of germinal-center T-helper cells? *Blood*. 2005;106(4):1501-1502.

79. Dupuis J, Boye K, Martin N, et al. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol*. 2006;30(4):490-494.

80. Roncador G, Garcia Verdes-Montenegro JF, Tedoldi S, et al. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92(8):1059-1066.

81. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(11):853-865.

82. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109(11):4952-4963.

83. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res*. 2007;67(22):10703-10710.

84. Streubel B, Vinatzer U, Willheim M, Raderer M, Chott A. Novel t(5;9)(q33;q22) fuses ITK to SYK in unspecified peripheral T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006;20(2):313-318.

85. Huang Y, Moreau A, Dupuis J, et al. Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2009;33(5):682-690.

86. Pechloff K, Holch J, Ferch U, et al. The fusion kinase ITK-SYK mimics a T cell receptor signal and drives oncogenesis in conditional mouse models of peripheral T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2010;207(5):1031-1044.

87. Dierks C, Adrian F, Fisch P, et al. The ITK-SYK fusion oncogene induces a T-cell lymphoproliferative disease in mice mimicking human disease. *Cancer Res*. 2010;70(15):6193-6204.

88. Feldman AL, Sun DX, Law ME, et al. Overexpression of Syk tyrosine kinase in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2008;22(6):1139-1143.

89. Pozzobon M, Marafioti T, Hansmann ML, Natkunam Y, Mason DY. Intracellular signalling molecules as immunohistochemical markers of normal and neoplastic human leucocytes in routine biopsy samples. *Br J Haematol*. 2004;124(4):519-533.

90. Geissinger E, Sadler P, Roth S, et al. Disturbed expression of the T-cell receptor/CD3 complex and associated signaling molecules in CD30+ T-cell lymphoproliferations. *Haematologica*. 2010;95(10):1697-1704.

91. Thorns C, Bastian B, Pinkel D, et al. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(1):37-44.

92. Zettl A, Rudiger T, Konrad MA, et al. Genomic profiling of peripheral T-cell lymphoma, unspecified, and anaplastic large T-cell lymphoma delineates novel recurrent chromosomal alterations. *Am J Pathol*. 2004;164(5):1837-1848.

93. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, et al. Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007;117(3):823-834.

94. Martinez-Delgado B, Cuadros M, Honrado E, et al. Differential expression of NF-kappaB pathway genes among peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia*. 2005;19(12):2254-2263.

95. Cuadros M, Dave SS, Jaffe ES, et al. Identification of a proliferation signature related to survival in nodal peripheral T-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3321-3329.

96. Iqbal J, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2010;115(5):1026-1036.

97. Mohr F, Dohner K, Buske C, Rawat VP. TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Exp Hematol*. 2011;39(3):272-281.

98. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935.

99. Langemeijer SM, Aslanyan MG, Jansen JH. TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2009;8(24):4044-4048.

100. Xu C, Bian C, Lam R, Dong A, Min J. The structural basis for selective binding of non-methylated CpG islands by the CFP1 CXXC domain. *Nat Commun*. 2011;2:227.

101. Xu Y, Wu F, Tan L, et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2011;42(4):451-464.

102. Zhang H, Zhang X, Clark E, Mulcahey M, Huang S, Shi YG. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell Res*. 2010;20(12):1390-1393.

103. Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle*. 2009;8(11):1698-1710.

104. Borst P, Sabatini R. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:235-251.

105. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-1133.

106. Yu M, Hon GC, Szulwach KE, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the Mammalian genome. *Cell*. 2012;149(6):1368-1380.

107. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009;324(5929):929-930.

108. Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, Aifantis I. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell Stem Cell*. 2011;9(3):193-204.

109. Valinluck V, Tsai HH, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res*. 2004;32(14):4100-4108.

110. He YF, Li BZ, Li Z, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-1307.

111. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 2011;333(6047):1300-1303.

112. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35334-35338.

113. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011;145(3):423-434.

114. Cortellino S, Xu J, Sannai M, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*. 2011;146(1):67-79.

115. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev*. 2011;25(23):2436-2452.

116. Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*. 2011;10(16):2662-2668.

117. Hashimoto H, Liu Y, Upadhyay AK, et al. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4841-4849.

118. Frauer C, Hoffmann T, Bultmann S, et al. Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain. *PLoS One*. 2011;6(6):e21306.

119. Yildirim O, Li R, Hung JH, et al. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2011;147(7):1498-1510.

120. Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):200-213.

121. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep*. 2012;13(1):28-35.

122. Wu H, Zhang Y. Tet1 and 5-hydroxymethylation: A genome-wide view in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle*. 2011;10(15):2428-2436.

123. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell*. 2011;9(2):166-175.

124. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*. 2011;473(7347):343-348.

125. Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 2011;473(7347):398-402.

126. Pastor WA, Pape UJ, Huang Y, et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*. 2011;473(7347):394-397.

127. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2011;25(7):679-684.

128. Wu H, D'Alessio AC, Ito S, et al. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*. 2011;473(7347):389-393.

129. Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007;448(7154):714-717.

130. Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep*. 2009;10(11):1235-1241.

131. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000;403(6769):501-502.

132. Oswald J, Engemann S, Lane N, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*. 2000;10(8):475-478.

133. Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(9):3642-3647.

134. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun*. 2011;2:241.

135. Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*. 2011;477(7366):606-610.

136. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol*. 2007;9(1):64-71.

137. Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*. 2011;334(6053):194.

138. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293(5532):1089-1093.

139. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*. 2010;468(7325):839-843.

140. Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011;118(9):2551-2555.

141. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, et al. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell*. 2011;20(1):11-24.

142. Ko M, Bandukwala HS, An J, et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(35):14566-14571.

143. Li Z, Cai X, Cai CL, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood*. 2011;118(17):4509-4518.

144. Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, et al. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell*. 2011;20(1):25-38.

145. Kunimoto H, Fukuchi Y, Sakurai M, et al. Tet2 disruption leads to enhanced self-renewal and altered differentiation of fetal liver hematopoietic stem cells. *Sci Rep*. 2012;2:273.

146. Shide K, Kameda T, Shimoda H, et al. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis. *Leukemia*. 2012.

147. Tang H, Araki K, Li Z, Yamamura K. Characterization of Ayu17-449 gene expression and resultant kidney pathology in a knockout mouse model. *Transgenic Res*. 2008;17(4):599-608.

148. Konstandin N, Bultmann S, Szwagierczak A, et al. Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2011.

149. Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2009;118(4):469-474.

150. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-1812.

151. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1597-1604.

152. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765-773.

153. Gross S, Cairns RA, Minden MD, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*. 2010;207(2):339-344.

154. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2348-2355.

155. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1058-1066.

156. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010;17(3):225-234.

157. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010;28(22):3636-3643.

158. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia*. 2010;24(7):1302-1309.

159. Wagner K, Damm F, Gohring G, et al. Impact of IDH1 R132 mutations and an IDH1 single nucleotide polymorphism in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: SNP rs11554137 is an adverse prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2356-2364.

160. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-744.

161. Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011;19(1):17-30.

162. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008;452(7189):877-881.

163. Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*. 2007;128(4):747-762.

164. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008;454(7205):766-770.

165. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21.

166. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514.

167. Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science*. 2007;317(5845):1760-1764.

168. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48350-48359.

169. Sharif J, Muto M, Takebayashi S, et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature*. 2007;450(7171):908-912.

170. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-257.

171. Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14412-14417.

172. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010;363(25):2424-2433.

173. Thol F, Damm F, Ludeking A, et al. Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29(21):2889-2896.

174. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. 2011;43(4):309-315.

175. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, et al. Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012;30(7):742-750.

176. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012;119(2):559-568.

177. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia*. 2012.

178. Jankowska AM, Makishima H, Tiu RV, et al. Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2 and DNMT3A. *Blood*. 2011.

179. Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012.

180. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2011;25(7):1153-1158.

181. Thol F, Winschel C, Ludeking A, et al. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2011;96(12):1870-1873.

182. Fried I, Bodner C, Pichler MM, et al. Frequency, onset and clinical impact of somatic DNMT3A mutations in therapy-related and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2012;97(2):246-250.

183. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1217-1219.

184. Holz-Schietinger C, Matje DM, Harrison MF, Reich NO. Oligomerization of DNMT3A controls the mechanism of de novo DNA methylation. *J Biol Chem*. 2011;286(48):41479-41488.

185. Holz-Schietinger C, Matje DM, Reich NO. Mutations in DNA methyltransferase (DNMT3A) observed in acute myeloid leukemia patients disrupt processive methylation. *J Biol Chem*. 2012.

186. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915-926.

187. Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, et al. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*. 2009;41(11):1207-1215.

188. Trowbridge JJ, Snow JW, Kim J, Orkin SH. DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(4):442-449.

189. Tadokoro Y, Ema H, Okano M, Li E, Nakauchi H. De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2007;204(4):715-722.

190. Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2012;44(1):23-31.

191. Trowbridge JJ, Orkin SH. Dnmt3a silences hematopoietic stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2012;44(1):13-14.

192. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1148-1159.

193. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-692.

194. Wu H, Coskun V, Tao J, et al. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*. 2010;329(5990):444-448.

195. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*. 2010;70(2):447-452.

196. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2010;115(14):2891-2900.

197. Pronier E, Quivoron C, Bernard OA, Villeval JL. JAK2V(1)F/TET2 mutations: does the order matter? *Haematologica*. 2011;96(5):638-640.

198. Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell*. 2004;6(6):587-596.

199. So CW, Karsunky H, Passegue E, Cozzio A, Weissman IL, Cleary ML. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell*. 2003;3(2):161-171.

200. Luckey CJ, Bhattacharya D, Goldrath AW, Weissman IL, Benoist C, Mathis D. Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3304-3309.

201. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246-259.

202. Li L, Li M, Sun C, et al. Altered hematopoietic cell gene expression precedes development of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia and identifies patients at risk. *Cancer Cell*. 2011;20(5):591-605.

203. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44(1):47-52.

204. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118(26):6904-6908.

205. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-2506.

206. Damm F, Thol F, Kosmider O, et al. SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications. *Leukemia*. 2012;26(5):1137-1140.

207. Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, et al. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients. *Leukemia*. 2012;26(5):1135-1137.

208. Malcovati L, Papaemmanuil E, Bowen DT, et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6239-6246.

209. Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1384-1395.

210. Patnaik MM, Lasho TL, Hodnefield JM, et al. SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. *Blood*. 2012;119(2):569-572.

211. Visconte V, Makishima H, Jankowska A, et al. SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts. *Leukemia*. 2012;26(3):542-545.

212. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*. 2010;42(2):181-185.

213. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Patel J, et al. Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2011;25(7):1200-1202.

214. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-726.

215. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2010;42(8):665-667.

216. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, et al. Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia. *Nature*. 2011;469(7330):356-361.

217. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-510.

218. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-313.

219. Notta F, Mullighan CG, Wang JC, et al. Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2011;469(7330):362-367.

220. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell*. 2012;21(3):283-296.

221. Wang Y, Krivtsov AV, Sinha AU, et al. The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science*. 2010;327(5973):1650-1653.

222. Gibson P, Tong Y, Robinson G, et al. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010;468(7327):1095-1099.

223. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2009;25:377-406.

224. Levi BP, Morrison SJ. Stem cells use distinct self-renewal programs at different ages. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2008;73:539-553.

225. Downing JR, Shannon KM. Acute leukemia: a pediatric perspective. *Cancer Cell*. 2002;2(6):437-445.

226. Schaub FX, Lehmann T, Looser R, Hao-Shen H, Tichelli A, Skoda RC. Transition to homozygosity does not appear to provide a clonal advantage to hematopoietic progenitors carrying mutations in TET2. *Blood*. 2011;117(6):2075-2076.

227. Braun T, Itzykson R, Renneville A, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase II trial. *Blood*. 2011.

228. Pollyea DA, Raval A, Kusler B, Gotlib JR, Alizadeh AA, Mitchell BS. Impact of TET2 mutations on mRNA expression and clinical outcomes in MDS patients treated with DNA methyltransferase inhibitors. *Hematol Oncol*. 2010.

229. Voso MT, Fabiani E, Piciocchi A, et al. Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-Azacytidine. *Leukemia*. 2011.

230. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, et al. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119(8):1901-1903.

Résumé

Les enzymes de la famille Ten-Eleven-Translocation (TET) sont des oxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate et du Fe (II) capables d'hydroxyler les cytosines méthylées. La conversion en 5-hydroxyméthylcytosines constituerait une étape vers la déméthylation et les protéines TET seraient donc impliquées dans le contrôle épigénétique de la transcription. Des mutations inactivatrices acquises du gène *TET2* ont été décrites dans environ 20% des hémopathies myéloïdes humaines.

L'analyse de deux modèles murins d'invalidation de Tet2 montre que Tet2 contrôle l'hydroxyméthylation et l'homéostasie du compartiment hématopoïétique. Son inactivation entraine des anomalies pléiotropiques des stades précoces et tardifs de l'hématopoïèse et le développement d'hémopathies myéloïdes. L'étude du statut de *TET2* chez une grande série de patients porteurs d'hémopathies lymphoïdes matures retrouve des mutations de ce gène chez 12% des cas de lymphomes T. Celles-ci sont significativement associées aux mutations du gène *DNMT3A* et sont plus fréquemment observées au sein de deux sous-types, le lymphome T angio-immunoblastique et le lymphome T périphérique non spécifié. L'analyse de populations triées montre la préexistence des mutations de *TET2* ou de *DNMT3A* dans les progéniteurs hématopoïétiques chez certains patients.

En conclusion, les mutations de *TET2* peuvent survenir dans des progéniteurs précoces, leur conférer un avantage sélectif par rapport aux progéniteurs sauvages et conduire au développement d'une hématopoïèse clonale. Des anomalies génétiques additionnelles semblent nécessaires à la transformation tumorale aussi bien myéloïde que lymphoïde. Ces deux types d'hémopathies pourraient donc se développer à partir d'une même atteinte du compartiment des cellules souches hématopoïétiques.

Abstract

The Ten-Eleven-Translocation (TET) enzymes belong to a family of oxygenases that are dependent on 2-oxoglutarate and Fe (II) and are able to oxidize methylcytosines. This may represent a step toward DNA demethylation and as such these proteins are involved in the epigenetic control of transcription. Acquired *TET2* loss-of-function mutations have been reported in about 20% of human myeloid malignancies.

Analysis of two *Tet2*-deficiency mouse models shows that Tet2 controls hydroxymethylation and homeostasis in the hematopoietic compartment. *Tet2* deficiency results in pleiotropic abnormalities of both early and late steps of hematopoiesis and leads to the development of myeloid disorders. The sequencing of *TET2* in a large series of patients with mature lymphoproliferations identifies *TET2* mutations in 12% of T-cell lymphoma. They are significantly associated with *DNMT3A* mutations and are more frequently observed in two subtypes, the angioimmunoblastic T-cell lymphoma and the peripheral T-cell lymphoma, not other specified. Analysis of flow-sorted populations shows the presence of *TET2* and *DNMT3A* alterations in hematopoietic progenitors in some patients.

In summary, *TET2* mutations may affect early progenitors, confer a selective advantage compared with controls progenitors and result in a clonal hematopoiesis. Some additional genetic events are likely required to the myeloid or lymphoid transformation. Both diseases could therefore arise from a common alteration of the hematopoietic stem cell compartment.

Frais de reprographie pris en charge par la taxe d'apprentissage collectée par l'IGR