



HAL
open science

Etude fonctionnelle de l'inactivation de TET2 au cours de l'hématopoïèse chez la souris

Cyril Quivoron

► **To cite this version:**

Cyril Quivoron. Etude fonctionnelle de l'inactivation de TET2 au cours de l'hématopoïèse chez la souris. Génétique. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA11T038. tel-00996633

HAL Id: tel-00996633

<https://theses.hal.science/tel-00996633>

Submitted on 26 May 2014

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.

UNIVERSITE PARIS XI – Faculté de Médecine PARIS-SUD

Ecole Doctorale de Cancérologie – Biologie, Médecine, Santé

Année 2012

Numéro attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□□□

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Génétique Cellulaire et Moléculaire

présentée par

Cyril QUIVORON

**ETUDE FONCTIONNELLE DE L'INACTIVATION DE TET2
AU COURS DE L'HEMATOPOIESE CHEZ LA SOURIS**

Thèse dirigée par le Dr **Olivier BERNARD**

et co-dirigée par le Dr **William VAINCHENKER**

Soutenue publiquement le 19 septembre 2012 à Villejuif

Membres du jury

Pr **Christian AUCLAIR**

Président de jury

Pr **Thierry FEST**

Rapporteur

Pr **Françoise MOREAU-GACHELIN**

Rapporteur

Dr **Jacques GHYSDAEL**

Examineur

Dr **Olivier BERNARD**

Directeur de thèse

UNIVERSITE PARIS XI – Faculté de Médecine PARIS-SUD

Ecole Doctorale de Cancérologie – Biologie, Médecine, Santé

Année 2012

Numéro attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□□□□□□□

THESE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Génétique Cellulaire et Moléculaire

présentée par

Cyril QUIVORON

**ETUDE FONCTIONNELLE DE L'INACTIVATION DE TET2
AU COURS DE L'HEMATOPOIESE CHEZ LA SOURIS**

Thèse dirigée par le Dr **Olivier BERNARD**

et co-dirigée par le Dr **William VAINCHENKER**

Soutenue publiquement le 19 septembre 2012 à Villejuif

Membres du jury

Pr **Christian AUCLAIR**

Président de jury

Pr **Thierry FEST**

Rapporteur

Pr **Françoise MOREAU-GACHELIN**

Rapporteur

Dr **Jacques GHYSDAEL**

Examineur

Dr **Olivier BERNARD**

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie, par ces quelques lignes, l'ensemble des personnes qui ont, de près ou de loin, permis l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du jury qui a accepté d'évaluer cette thèse de sciences. En premier lieu, je remercie très sincèrement Monsieur Christian Auclair de me faire l'honneur de présider ce jury ; Madame Françoise Moreau-Gachelin et Monsieur Thierry Fest pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit ; Monsieur Jacques Ghysdael d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Olivier Bernard, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Le soutien scientifique ainsi que la liberté et la confiance qu'il m'a accordés au cours ces quatre années m'ont permis d'apprendre beaucoup. Je remercie également chaleureusement William Vainchenker, mon co-directeur de thèse, qui ne pouvait malheureusement pas être présent lors de ma soutenance, et grâce à qui j'ai eu la chance de travailler sur un sujet aussi riche.

Je suis particulièrement reconnaissant de Thomas Mercher qui a toujours été patient et disponible, et qui m'a tant appris sur le travail avec ces petites souris. Je remercie également Virginie Penard-Lacronique pour ses conseils, ainsi que Stéphane de Botton, plein d'idées lors de nos réunions de laboratoire hebdomadaires.

Je souhaite remercier en particulier les membres de l'équipe « TET2 » : Frédéric, Laurianne, Lucile, Véro, qui m'a tout appris sur le travail de paillasse, ainsi que Cécile, qui a pris en charge la lourde tâche de s'occuper des (si nombreuses) lignées K427.

Merci également à tous les membres de l'unité U985 pour tous les bons moments passés à leurs côtés au laboratoire et qui ont su composer avec mes (parfois longs) silences : Sébastien, Clarisse, Vinciane, Cathy, Paola et Elena, ma voisine de bureau à qui je dois mes progrès à l'oral en anglais.

Merci aussi à toutes les autres personnes de l'IGR et de l'U1009 qui ont pu m'apporter de l'aide ou me donner un conseil, en particulier Philippe et Yann, les meilleurs pour déboucher le LSR, un outil essentiel de ce travail.

Un remerciement spécial pour Fédor qui a cru en moi, peut-être même plus que moi-même ; à Muriel Nicoletti de l'école doctorale et Nadia Iafrate de l'université Paris XI pour leur aide dans mes démarches administratives, ainsi qu'aux donateurs de la Société Française d'Hématologie et de la Ligue Nationale Contre le Cancer pour m'avoir permis de mener ce travail dans les meilleures conditions.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont permis de parcourir ce long chemin qu'est la thèse : ma famille et en particulier Danielle et mamie, mes sœurs Prisca et Nathalie, Henning, Mélissa, Solène, les brestois Gaëlle et Guillaume, et surtout Véro et Clément, présents à chaque instant à mes côtés, pour leur soutien et leur compréhension (même Clément).

PRINCIPALES ABREVIATIONS

2-HG	2-HydroxyGlutarate
2-OG	2-OxoGlutarate (<i>ou α-kétoglutarate</i>)
5caC	5-carboxyl-Cytosine
5fC	5-formyl-Cytosine
5hmC	5-hydroxymethyl-Cytosine
5mC	5-methyl-Cytosine
AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
AITL	AngioImmunoblastic T-cell Lymphoma (<i>lymphomes immuno-angioblastiques T</i>)
AML	Acute Myeloblastic Leukemia (<i>leucémie aiguë myéloïde</i>)
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASXL1	Additional Sex Combs-like 1
β-geo	β -galactosidase/neomycine
BER	Base Excision Repair
CD	Cluster of Differentiation
CMML	Chronic MyeloMonocytic Leukemia (<i>leucémie myélomonocytaire chronique</i>)
CMP	Common Myeloid Progenitors (<i>progéniteurs communs myéloïdes</i>)
CpG	Cytosine-phospho-Guanine
Cre	Cyclization recombinase
DNMT	DNA MethylTransferase
DSBH	Double-Strand β -Helix
E7.5	Embryonic day 7.5 (<i>jour embryonnaire 7,5</i>)
ES	Embryonic Stem (cells)
ET	Essential thrombocythemia (<i>thrombocytémie essentielle</i>)
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
GMP	Granulocytic-Monocytic Progenitors (<i>progéniteurs granulo-monocytaires</i>)
HSC	Hematopoietic Stem Cells (<i>cellules souches hématopoïétiques</i>)
HSPC	Hematopoietic Stem and Progenitors Cells (<i>cellules souches et progéniteurs</i>)

KO	Knock-Out
IDH	Isocitrate DeHydrogenase
LCX	Leukemia-associated protein with a CXXC domain
Lin	Lineage markers
LSK	Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-Kit ⁺
MBD	Methyl-Binding Domain
MDS	Myelodysplastic Syndrome (<i>syndrome myélodysplasique</i>)
MEP	Megakaryocytic-Erythroid Progenitors (<i>progéniteurs érythro-mégacaryocytaires</i>)
MPN	Myeloproliferative Neoplasm (<i>syndrome myéloprolifératif</i>)
MPP	Multipotent Progenitors (<i>progéniteurs hématopoïétiques multipotents</i>)
NOD-SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined ImmunoDeficiency
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
p	bras court
pb	paire de base
PcG	Protéines du groupe Polycomb
PMF	Primary Myelofibrosis (<i>myélofibrose primitive, ou splénomégalie myéloïde</i>)
PRC	Polycomb Repressive Complex
PV	<i>Polycythemia Vera</i> (maladie de Vaquez, ou polyglobulie primitive)
q	bras long
t	translocation
TET	Ten-Eleven Translocation
TDG	Thymine DNA Glycosylase
UTX	Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat gene X chromosome-linked

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1	Représentation hiérarchique de l'hématopoïèse.	3
Figure 2	Modèles révisés de l'hématopoïèse.	4
Figure 3	Régulation de l'auto-renouvellement des HSC.	7
Figure 4	Méthylation de l'ADN par les enzymes DNMT.	10
Figure 5	Principe de coopération oncogénique dans les hémopathies malignes.	13
Figure 6	Origine des cellules B selon les différentes formes de lymphomes.	14
Tableau I	Récurrence des mutations de certains gènes dans les hémopathies myéloïdes.	15
Tableau II	Signification des mutations des gènes <i>ASXL1</i> , <i>EZH2</i> et <i>DNMT3A</i> .	21
Figure 7	Structure et isoformes du gène <i>TET2</i> .	26
Figure 8	Dioxygénases de la famille TET chez l'Homme.	27
Figure 9	Oxydation des cytosines modifiées par les dioxygénases TET.	27
Figure 10	Rôle des hydroxyméthyl-cytosines dans la déméthylation de l'ADN.	30
Figure 11	Voies de déméthylation initiées par l'oxydation des cytosines méthylées.	32
Figure 12	Déméthylation et reprogrammation au cours du développement.	33
Figure 13	Fonction de TET1 dans la déméthylation de l'ADN.	34
Figure 14	Rôle de TET1 dans la régulation de l'expression.	35
Tableau III	Fréquence des mutations du gène <i>TET2</i> dans les hémopathies myéloïdes.	40
Figure 15	Stratégies d'inactivation du gène <i>Tet2</i> chez la souris.	81

REMERCIEMENTS	i
PRINCIPALES ABREVIATIONS	iii
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX	v
INTRODUCTION	1
I. LE SYSTEME HEMATOPOÏETIQUE	1
A) Présentation générale de l'hématopoïèse	1
1- Cellules souches hématopoïétiques	2
2- Différenciation hématopoïétique	3
B) Régulation de l'hématopoïèse	5
1- Voies de signalisation et micro-environnement médullaire	5
<i>a. Interactions cellulaires</i>	5
<i>b. Molécules diffusibles et récepteurs membranaires</i>	6
2- Modulation des programmes d'expression génique	6
<i>a. Facteurs de transcription</i>	7
<i>b. Modifications des histones</i>	8
<i>c. Méthylation de l'ADN</i>	9
II. LES HEMOPATHIES MALIGNES	12
A) Leucémogénèse et coopération oncogénique	13
B) Hémopathies malignes myéloïdes	15
1- Syndromes myéloprolifératifs	15
2- Syndromes myélodysplasiques	17
<i>α Formes frontières syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs</i>	18
3- Leucémies aiguës myéloïdes	19
C) Mutations de gènes associés à la régulation épigénétique de la transcription	21
1- Modifications des histones	21
<i>a. ASXL1 (Additional Sex Combs-like 1)</i>	21
<i>b. EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2)</i>	23
2- Méthylation de l'ADN	24
<i>α DNMT3A (DNA Methyltransferase 3A)</i>	24

III. LE GENE <i>TET2</i> ET SON IMPORTANCE AU COURS DE L'HEMATOPOÏÈSE	25
A) Gènes de la famille TET	27
B) Rôle biologique de l'hydroxyméthylation	28
1- Abondance relative et distribution génomique des hydroxyméthyl-cytosines	28
2- Déméthylation de l'ADN et régulation de la transcription	30
a. Voies de déméthylation passive et active	30
* Oxydations des cytosines méthylées, excision et réparation de l'ADN	31
* Désamination des 5hmC, excision par la glycosylase TDG et réparation	31
b. Rôle de TET3 dans la déméthylation de l'ADN chez le zygote	33
c. Rôle de TET1 dans la biologie des cellules souches embryonnaires	34
* Distribution génomique de TET1 dans les cellules ES	34
* Rôle de TET1 dans le maintien du potentiel de pluripotence	36
C) Inactivation du gène <i>TET2</i> dans les hémopathies malignes	38
1- Importance des mutations dans les hémopathies	38
2- Conséquences fonctionnelles des mutations de <i>TET2</i>	41
a. Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN	41
b. Rôle des mutations des gènes IDH1 et IDH2	42
c. Auto-renouvellement des HSC et myélopoïèse	43
But du travail	44
RESULTATS	
Article 1	45
TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis	
DISCUSSION	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	89
ANNEXES	117
Article 2 TET2, a tumor suppressor in hematological disorders	117
Article 3 <i>In cauda venenum</i> ou de l'importance de (1a) TET(2)	123

INTRODUCTION

I. LE SYSTEME HEMATOPOÏETIQUE

L'hématopoïèse se définit comme l'ensemble des processus physiologiques concourant à la maturation et la libération des cellules hématopoïétiques dans le sang. Elle permet le remplacement continu et régulé des cellules matures tout au long de la vie d'un individu. Il existe divers types de cellules différenciées qui assurent des fonctions essentielles dans l'organisme. Les globules rouges (érythrocytes) permettent l'oxygénation des tissus ; les plaquettes (thrombocytes) interviennent dans la coagulation sanguine ; les globules blancs (leucocytes) protègent l'organisme contre les infections et contrôlent le développement tumoral. L'ensemble de ces cellules matures a pour origine commune les cellules souches hématopoïétiques (HSC), un contingent de cellules multipotentes situées dans la moelle osseuse chez l'adulte. Ces cellules présentent deux propriétés essentielles : une capacité d'auto-renouvellement (*i.e.* de multiplication à l'identique permettant de maintenir une réserve constante de HSC) et une capacité de différenciation vers les lignées hématopoïétiques différentes (multipotence).

Le système hématopoïétique est généralement défini comme un système hiérarchique, possédant à son sommet les HSC qui engendrent successivement les progéniteurs et les précurseurs des lignées. L'homéostasie de ce système nécessite un équilibre entre auto-renouvellement et engagement des HSC dans la différenciation. Cette balance est contrôlée par de multiples facteurs externes du micro-environnement médullaire (molécules diffusibles et d'adhésion) qui modulent l'expression de facteurs internes (activation/répression séquentielle de facteurs de transcription).

A) Présentation générale de l'hématopoïèse

Chez les mammifères, différents sites assurent la production de cellules sanguines au cours de l'embryogénèse. L'hématopoïèse primitive débute au niveau du sac vitellin par la génération de cellules érythroïdes exprimant une hémoglobine embryonnaire. Les progéniteurs à l'origine de ces cellules présentent un potentiel de différenciation restreint vers les lignées myéloïdes {Cumano *et al.*, 1996}. Ils apparaissent entre les stades E7-E7.5 du développement embryonnaire et proviennent des hémangioblastes, des précurseurs bipotents dérivés du mésoderme à l'origine de cellules hématopoïétiques et endothéliales.

Les progéniteurs à l'origine de l'hématopoïèse définitive émergent de la région de l'aorte dorsale appelée splanchnopleure para-aortique (P-Sp) puis aorte-gonade-mésonephros (AGM) au moment où se met en place la circulation sanguine de l'embryon {Adamo *et al.*, 2009}. Contrairement aux précurseurs primitifs myélo-érythroïdes, ces cellules présentent les deux propriétés essentielles à la mise en place d'une hématopoïèse définitive : elles sont capables de reconstituer à long terme l'hématopoïèse de souris irradiées et sont multipotentes {Sánchez *et al.*, 1996}. Une première vague de ces cellules colonise le foie fœtal et permet la production de cellules hématopoïétiques au cours du développement *in utero* {Mikkola and Orkin, 2006}. Enfin, les cellules progénitrices colonisent le thymus et la moelle osseuse, qui devient le site exclusif de développement des cellules souches et de l'hématopoïèse après la naissance (pour revue {Cumano and Godin, 2007}).

1- Cellules souches hématopoïétiques

L'existence des HSC a été démontrée en 1961 chez la souris par des expériences de reconstitution hématopoïétique d'animaux irradiés léthalement à partir de cellules médullaires de donneurs syngéniques {Till and McCulloch, 1961}. Les HSC sont donc définies fonctionnellement par leur capacité à reconstituer l'ensemble des lignées hématopoïétiques après greffe dans des souris receveuses. Ces cellules représentent 0,01 à 0,05% des cellules de la moelle osseuse mais elles se distinguent des autres cellules hématopoïétiques par l'absence de marqueurs spécifiques des lignages matures (elles sont dites « *Lineage negative* », ou Lin⁻) et l'expression de marqueurs propres, ce qui permet l'étude de leurs propriétés biologiques {Morrison and Weissman, 1994}. Les premiers utilisés pour isoler les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (HSPC) ont été les récepteurs Sca-1 (*Stem Cell Antigen*), c-Kit et Thy1.1, définissant le compartiment Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺Thy1.1^{low} (LSK) {Spangrude *et al.*, 1988}.

Les HSC les plus immatures capables de reconstitution à long terme (*i.e.* à plus de 16 semaines – LT-HSC (Figure 1) sont enrichies dans la fraction cellulaire d'immunophénotype LSK CD150⁺CD48⁻Flt-3/Flk-2⁻CD34^{-low} {Osawa *et al.*, 1996} et représentent 1/3 à 1/5^e des cellules souches médullaires {Kiel *et al.*, 2005}. Elles se distinguent des ST-HSC enrichies dans la fraction LSK CD150⁻CD48⁻Flt-3/Flk-2^{-low}CD34⁺, capables de reconstituer le système hématopoïétique à plus court terme (*i.e.* de 8 à 12 semaines). L'engagement des LT- vers les ST-HSC s'accompagne d'une diminution de la fréquence des cellules quiescentes et d'une réduction de leur capacité d'auto-renouvellement, ce qui explique en partie les différences de potentiel de reconstitution des HSC {Passegué *et al.*, 2005}.

2- Différenciation hématopoïétique

Les HSC sont capables de divisions cellulaires asymétriques, processus au cours duquel une cellule-mère génère deux cellules-filles au destin différent : l'une d'elles se maintient en tant que cellule souche tandis que l'autre perd ses capacités d'auto-renouvellement et s'engage de façon irréversible dans la différenciation hématopoïétique {Schroeder, 2007}. Les ST-HSC (considérées comme une première étape d'engagement dans la différenciation) donnent naissance aux progéniteurs multipotents (MPP), des cellules définies par le phénotype LSK Flt-3/Flk-2⁺CD34⁺ {Christensen and Weissman, 2001} (Figure 1).

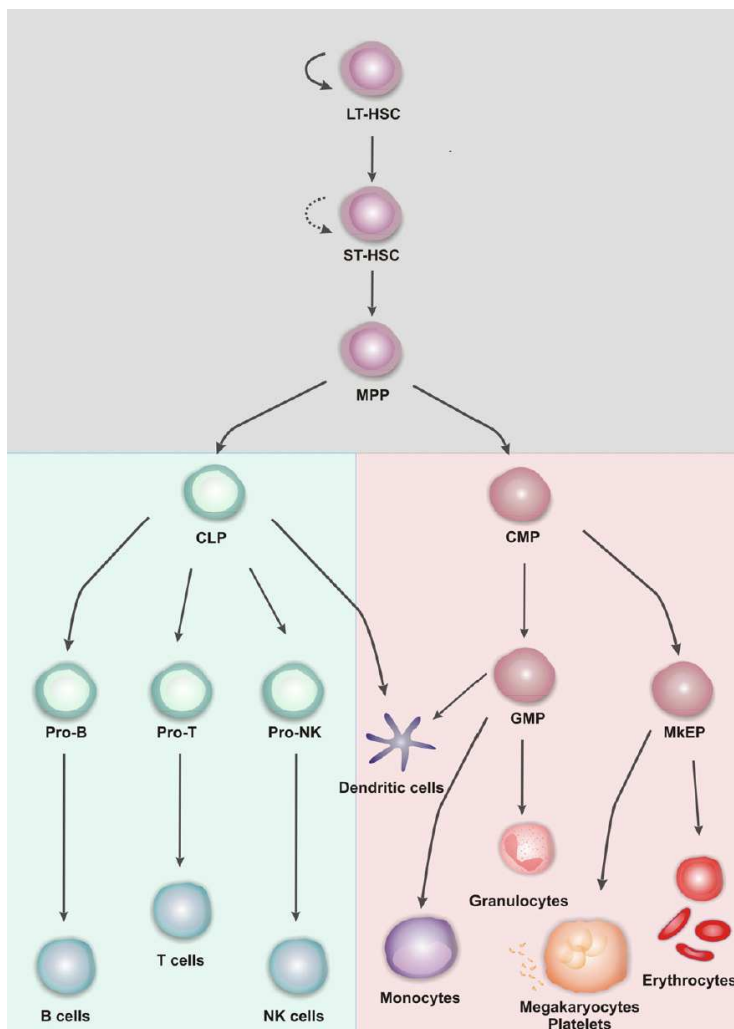


Figure 1 Représentation hiérarchique de l'hématopoïèse. {Luc et al., 2008}

Le compartiment des LSK (correspondant aux cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, ou HSPC) est représenté sur fond gris, les précurseurs et les cellules matures des lignées lymphoïdes et myéloïdes sur fond vert et rose, respectivement. LT-HSC: Long-Term Hematopoietic Stem Cells, ST-HSC: Short-Term HSC, MPP: Multipotent Progenitor cells, CLP: Common Lymphoid Progenitor cells, CMP: Common Myeloid Progenitor cells, GMP: Granulocytic-Monocytic Progenitor cells, MkEP: Megakaryocytic-Erythroid Progenitor cells.

Dans le modèle hiérarchique conventionnel de l'hématopoïèse, les lignées myéloïdes et lymphoïdes dérivent de l'engagement des MPP vers les progéniteurs communs myéloïdes (CMP {Akashi *et al.*, 2000} et lymphoïdes (CLP {Kondo *et al.*, 1997}. La fraction CLP $\text{Lin}^- \text{cKit}^+ \text{Sca1}^{\text{low}} \text{IL-7R}\alpha^+$ est caractérisée par l'expression du récepteur à l'interleukine (IL)-7, essentiel à l'expansion des précurseurs lymphoïdes précoces et au développement des lymphocytes B et T matures {Puel *et al.*, 1998}. Les progéniteurs myéloïdes granulo-monocytaire (GMP) et érythro-mégacaryocytaire (MEP) proviennent des CMP. Ces trois populations $\text{Lin}^- \text{Sca1}^- \text{c-Kit}^+ \text{IL-7R}\alpha^-$ se distinguent par l'expression différentielle des marqueurs CD34, FcγRIII/CD16 et FcγRII/CD32 : les CMP sont $\text{Fc}\gamma\text{RIII/II}^{\text{low}} \text{CD34}^+$, les GMP $\text{Fc}\gamma\text{RIII/II}^{\text{hi}} \text{CD34}^+$ et les MEP $\text{Fc}\gamma\text{RIII/II}^{\text{low}} \text{CD34}^-$ {Akashi *et al.*, 2000}.

L'existence de cellules progénitrices dépourvues de capacité de différenciation érythro-mégacaryocytaire a conduit à l'identification d'un progéniteur multipotent commun aux lignées lymphoïdes et granulo-monocytaires, les LMPP {Adolfsson *et al.*, 2005}. La découverte de cette population a mis en évidence l'hétérogénéité des cellules progénitrices et l'existence d'autres voies possibles de différenciation des lignées lymphoïdes et myéloïdes, à l'origine de modèles révisés de l'hématopoïèse (Figure 2).

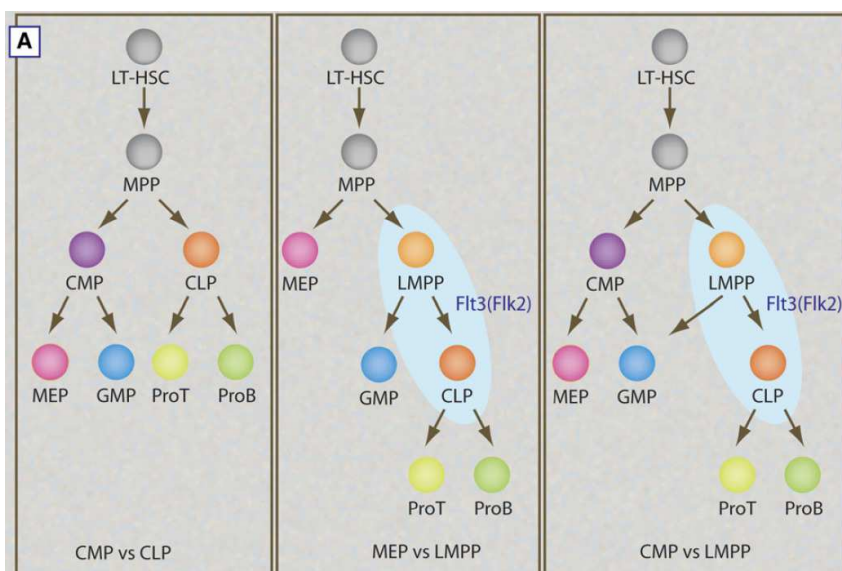


Figure 2 Modèles révisés de l'hématopoïèse. Adapté de {Iwasaki and Akashi, 2007}

En comparaison avec l'organisation classique de la différenciation hématopoïétique (modèle CMP vs. CLP – panel de gauche), la population LMPP est à l'origine des populations GMP et CLP dans le modèle MEP vs. LMPP (panel central), les MEP émergeant directement de la fraction MPP, indépendamment des CMP. Un autre modèle plus proche de la hiérarchie conventionnelle place la population LMPP comme progéniteurs communs aux populations CLP et GMP (cette dernière dérivant principalement des CMP) (panel de droite).

B) Régulation de l'hématopoïèse

Le développement des cellules hématopoïétiques est contrôlé par des facteurs extrinsèques (micro-environnement médullaire, facteurs circulants) et des facteurs intrinsèques (facteurs de transcription et co-facteurs permettant de modifier l'état de la chromatine). Deux hypothèses non exclusives ont été proposées pour décrire l'engagement des cellules souches et progénitrices dans la différenciation hématopoïétique : i) un modèle stochastique, dans lequel une cellule progénitrice s'engage de façon aléatoire dans une voie de différenciation avant d'être sélectionnée et amplifiée au sein d'un environnement permissif, et ii) un modèle instructif attribuant au micro-environnement et aux facteurs de transcription un rôle direct dans la différenciation cellulaire {Iwasaki *et al.*, 2003}.

1- Voies de signalisation et micro-environnement médullaire

a. Interactions cellulaires

Le micro-environnement médullaire est constitué de divers types cellulaires soutenant l'hématopoïèse et organisés en niches hématopoïétiques {Kiel and Morrison, 2008}. Ces cellules maintiennent les propriétés de quiescence et d'auto-renouvellement des HSC dans la région de l'endosteum trabéculaire (niche ostéoblastique) {Arai and Suda, 2007}, ainsi que la prolifération et la différenciation/maturation des progéniteurs près des zones de sinusoides péri-vasculaires (niche endothéliale/vasculaire) {Kopp *et al.*, 2005}. Les cellules constituant le micro-environnement médullaire dérivent d'une cellule souche mésenchymateuse, à l'origine des cellules endothéliales, des ostéoblastes, ainsi que des fibroblastes et des adipocytes (constituant le stroma médullaire). Le maintien des cellules hématopoïétiques dans ces structures repose sur les interactions entre les molécules d'adhésion que ces cellules expriment (intégrines, N-cadhérine, sélectines...) et les composants de la matrice extracellulaire sécrétée par les cellules du micro-environnement (ostéopontine, laminine, fibronectines,...).

b. Molécules diffusibles et récepteurs membranaires

Les cytokines sécrétées par les cellules médullaires (ou synthétisées à distance) jouent un rôle important dans l'homéostasie du système hématopoïétique. La famille des cytokines comprend les interleukines, les interférons, les facteurs de nécrose (TNF), les facteurs de croissance (*Colony-Stimulating Factor*, ou CSF), les chimiokines et certaines hormones comme la thrombopoïétine (TPO) et l'érythropoïétine (EPO). Ce sont des glycoprotéines solubles agissant sur les cellules hématopoïétiques par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires dont l'expression varie selon le stade de différenciation. L'activité biologique des complexes cytokine/récepteur est pléiotropique et souvent redondante. Ils jouent un rôle sur la survie, la croissance, la différenciation et la maturation des cellules hématopoïétiques. Certaines cytokines présentent une activité précoce au cours de l'hématopoïèse, comme la cytokine SCF (*Stem Cell Factor*). D'autres agissent plus tardivement et sont essentielles pour la myélopoïèse (GM-CSF (*Granulo-Monocytic – CSF*), G-CSF (*Granulocytic – CSF*) et M-CSF (*Monocytic – CSF*), ainsi que la mégacaryopoïèse (TPO) ou l'érythropoïèse (EPO).

Les récepteurs des cytokines de type I sont dépourvus d'activité catalytique intrinsèque et sont associés aux protéines de la famille Janus kinase (JAK). Cette famille ubiquitaire est composée de 4 tyrosine kinases (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2), nécessaires à la maturation, l'adressage et la stabilisation des récepteurs membranaires auxquels elles sont associées ainsi qu'à la transduction du signal. La fixation du ligand à son récepteur induit son oligomérisation et provoque un changement conformationnel permettant l'activation des kinases JAK et des voies de signalisations intracellulaires en aval, comme la voie PI3K (et son effecteur Akt/PKB, une sérine/thréonine kinase) ou la voie des MAP et ERK kinases. L'activation des récepteurs induit également la phosphorylation et la translocation nucléaire des effecteurs des JAK, les facteurs de transcription STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*).

2- Modulation des programmes d'expression génique

L'intégration par la cellule des diverses voies de signalisation activées détermine *in fine* la réponse à son environnement (quiescence, apoptose, prolifération ou différenciation cellulaire). Il est admis que l'engagement dans la différenciation hématopoïétique est liée à la modulation de programmes d'expression génique spécifiques, au cours desquels certains gènes sont activés – déterminant une voie de différenciation, et d'autres réprimés – inhibant l'auto-renouvellement d'une part, et assurant une spécification de lignage correcte d'autre part (Figure 3).

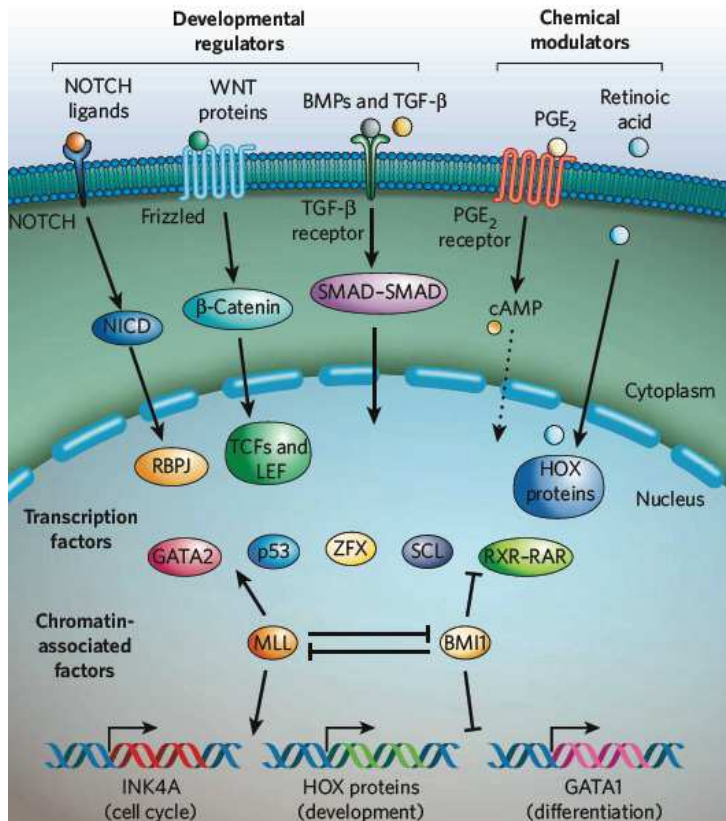


Figure 3 Régulation de l'auto-renouvellement des HSC. {Zon, 2008}

Les voies de signalisation engagées par les médiateurs (voies Wnt, TGFβ, acide rétinolique) et les interactions cellulaires (voie Notch) modulent l'activité de facteurs de transcription (GATA-2, p53) et de régulateurs épigénétiques (MLL, Bmi-1) au cours du développement des cellules hématopoïétiques.

a. Facteurs de transcription

Des modèles d'inactivation ou de surexpression génique ont permis de mieux comprendre le rôle des facteurs de transcription dans le système hématopoïétique {Rosenbauer and Tenen, 2007}. De nombreux réseaux importants au cours de l'hématopoïèse sont actuellement connus {Wilson *et al.*, 2010}. Ces facteurs interviennent à différents niveaux dans l'hématopoïèse et peuvent agir de façon synergique ou antagoniste. Ils induisent l'expression coordonnée de gènes qui maintiennent la quiescence et l'auto-renouvellement des HSC, ou qui aboutissent à la spécification de différenciation des progéniteurs immatures engagés {Nakajima, 2011}. Certains sont ainsi essentiels pour la fonction des HSC (SCL/TAL-1, LMO2, TEL/ETV6, RUNX1/CBFα) et d'autres sont requis pour l'engagement dans la différenciation des lignées myéloïdes (GATA-1, C/EBPα, PU.1...) et lymphoïdes (Ikaros, GATA-3, PAX5...). Ces facteurs de transcription recrutent *in fine* les facteurs généraux de la transcription et certains co-facteurs permettant de modifier la structure chromatinienne (régulateurs épigénétiques).

Les modifications épigénétiques affectent l'état transcriptionnel des gènes, sans altérer la séquence nucléotidique de l'ADN. Elles reposent sur le déplacement des nucléosomes, les modifications post-traductionnelles de la queue amino-terminale des histones et la méthylation des cytosines de l'ADN. Il existe quatre familles de facteurs de remodelage de la chromatine permettant de remanier les nucléosomes que sont les complexes ATP-dépendant SWI/SNF, ISWI, CHD et INO80 {Clapier and Cairns, 2009}. Les modifications covalentes des histones H2A, H2B, H3 et H4 permettent de contrôler l'accès à la chromatine {Kouzarides, 2007}. Elles sont de différents types (acétylation, méthylation, phosphorylation, SUMOylation, β -N-acétylglucosamination...) et peuvent être associées aux marques de méthylation de l'ADN et à la condensation de la chromatine {Sakabe *et al.*, 2010}.

b. Modification des histones

Les gènes appartenant au groupe ETP (*Enhancers of Trithorax and Polycomb*) sont importants pour le contrôle de l'activité transcriptionnelle de nombreux gènes, dont ceux du développement. Les cibles les mieux caractérisées sont les facteurs de transcription homéotiques (gènes *Hox*) {Bracken *et al.*, 2006}. Dans les cellules souches pluripotentes de l'embryon, certains gènes du développement sont dans un état transcriptionnel dit « bivalent » car ils sont associés à la méthylation des lysines K4 et K27 de l'histone H3 {Bernstein *et al.*, 2005}. Le rôle de ces marques épigénétiques dans le contrôle de la transcription est opposé. La marque activatrice H3K4me3 provient de l'activité d'histone méthyltransférases, dont celle codée par le gène *MLL* situé en 11q23 chez l'Homme, un locus fréquemment remanié dans les leucémies aiguës. La marque répressive H3K27me3 résulte de l'activité des sous-unités catalytiques EZH1 ou EZH2 du complexe Polycomb PRC2 {Cui *et al.*, 2009 ; Weishaupt *et al.*, 2010}.

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) jouent un rôle clé dans le contrôle de l'auto-renouvellement et du maintien de la multipotence des HSC {Sparmann and van Lohuizen, 2006}. Ces protéines forment deux types de complexes multimériques, appelés PRC1 et PRC2 {Schuettengruber *et al.*, 2007}. Le complexe PRC2 est responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), une marque reconnue par les protéines à chromodomaine Cbx du complexe PRC1 permettant la mono-ubiquitinylation de l'histone H2A de la lysine K119 (H2AK119ub) {Wang *et al.*, 2004}. Le recrutement des complexes Polycomb à leurs gènes cibles serait médié par les protéines de la famille Jumonji JARID2 {Shen *et al.*, 2009}. Elles font partie du complexe PRC2 et sont associées aux protéines SUZ12 et EED, indispensables à l'activité catalytique de la sous-unité EZH2. Le *knock-out* (KO) des gènes *Ezh2*, *Suz12* et *Eed* est léthal chez la souris (E7.5-E8.5) {Faust *et al.*, 1995 ; O'Carroll *et al.*, 2001 ; Pasini *et al.*, 2004}.

Les complexes PRC1 et PRC2 contrôlent l'expression de mêmes loci mais ils peuvent agir de façon indépendante {Boyer *et al.*, 2006 ; Ku *et al.*, 2008}. Cette distinction fonctionnelle est importante dans le système hématopoïétique, où la perte de diverses sous-unités du complexe PRC2 augmente l'activité des HSPC {Kamminga *et al.*, 2006 ; Majewski *et al.*, 2008} alors que la perte de Bmi-1 (l'une des sous-unités PSC (*Posterior Sex Combs*) de PRC1) inhibe l'auto-renouvellement des HSC normales et leucémiques {Lessard *et al.*, 1999 ; Lessard and Sauvageau, 2003}. En revanche, Mel-18 (une autre sous-unité PSC) limite les capacités d'auto-renouvellement des HSC {Kajiume *et al.*, 2009}.

Les protéines PcG sont également essentielles pour la spécification de lignage des cellules progénitrices commises. En réponse à un signal de différenciation, les facteurs de transcription lignage-spécifiques permettent le recrutement des complexes PRC à leurs gènes cibles {Bracken *et al.*, 2006}. Par exemple, la délétion de la sous-unité Bmi-1 conduit à l'activation prématurée de facteurs de transcription de la lignée lymphoïde B (Pax5 et Ebf1) {Oguro *et al.*, 2010}. Ce rôle dans la spécification de la différenciation repose aussi sur la capacité des complexes PRC à recruter les enzymes de la machinerie de méthylation de l'ADN aux sites Polycomb {Viré *et al.*, 2006 ; Mohammad *et al.*, 2009}.

c. Méthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation des cytosines affecte préférentiellement les cytosines du dinucléotide cytosine/guanine (CpG) dans les cellules somatiques. Elle existe aussi dans un contexte non-CpG (CpA principalement) dans les cellules souches embryonnaires (ES) humaines et murines {Ramsahoye *et al.*, 2000}, mais son rôle n'est pas connu {Laurent *et al.*, 2010}. Chez les mammifères, les CpG sont majoritairement méthylés et sont sous-représentés dans le génome (0,8 à 1% des nucléotides), compte-tenu de leurs propriétés mutagènes liées à la déamination spontanée des cytosines méthylées en thymine. Ils sont situés au niveau des séquences répétées et/ou mobiles du génome (séquences de type transposon). La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel pour le maintien de la stabilité du génome et la répression transcriptionnelle des gènes soumis à empreinte (gène dont l'expression dépend de son origine parentale) (pour revue {Lim and Maher, 2010}). En revanche, la méthylation des CpG situés dans les régions intragéniques est associée à l'activité transcriptionnelle des gènes {Wu *et al.*, 2010}.

Des séquences d'ADN présentant une densité importante de CpG (appelées « îlots CpG ») sont enrichies au niveau des régions régulatrices de certains gènes {Lister *et al.*, 2009}. La méthylation de ces CpG est associée à la répression de la transcription, du fait du « déplacement » des facteurs de transcription ainsi que de la fixation de protéines reconnaissant les CpG méthylés. Ces protéines à domaine MBD sont capables de recruter des enzymes modifiant l'architecture de la chromatine, comme les histones déacétylases {Wade, 2001}.

Chez les mammifères, les marques de méthylation sont éliminées puis à nouveau établies au cours du développement embryonnaire au stade pré-implantatoire, et enfin dans les cellules germinales primordiales {Morgan *et al.*, 2005}. Des mécanismes de maintenance assurent par la suite la transmission des motifs de méthylation de l'ADN à chaque division cellulaire. La méthylation des cytosines en position 5 est assurée par les ADN méthyltransférases (DNMT) {Okano *et al.*, 1998}. Elles appartiennent à une famille de cinq gènes chez les mammifères {Goll and Bestor, 2005}. Les enzymes *de novo* DNMT3a et DNMT3b établissent les patrons de méthylation {Okano *et al.*, 1999} et DNMT1 permet de reproduire ces profils à chaque réplication {Lei *et al.*, 1996} (Figure 4). Les deux autres membres de la famille sont dépourvues d'activité spécifique de l'ADN : DNMT3L est un cofacteur des enzymes *de novo* et DNMT2 présente une activité enzymatique spécifique de l'ARN chez les vertébrés {Goll *et al.*, 2006}.

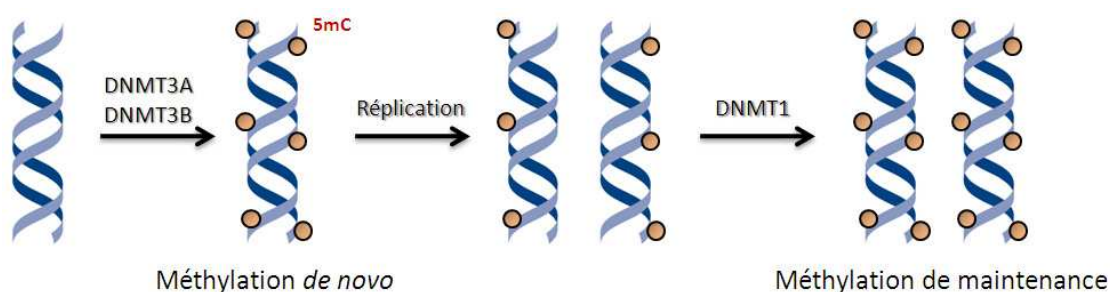


Figure 4 Méthylation de l'ADN par les enzymes DNMT. Adapté de {Wu and Zhang, 2010}

L'étude de modèles murins permettant l'inactivation des gènes *Dnmt* ont permis d'établir le rôle de ces enzymes au cours du développement. La perte de fonction des enzymes *Dnmt* est létale au stade embryonnaire (*Dnmt1* et *Dnmt3b* : à E8.5 et E14.5-E18.5, respectivement) ou péri-natal (*Dnmt3a* : 4 semaines après la naissance) {Li *et al.*, 1992 ; Okano *et al.*, 1999}. Les cellules ES murines triple KO pour les enzymes *Dnmt* conservent leur potentiel d'auto-renouvellement {Tsumura *et al.*, 2006} mais ne sont pas capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires {Jackson *et al.*, 2004}.

Des modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la régulation de la méthylation au cours de l'hématopoïèse. L'ADN méthyltransférase Dnmt1 est essentielle pour maintenir l'auto-renouvellement des HSC {Bröske *et al.*, 2009 ; Trowbridge *et al.*, 2009}. L'inactivation simultanée des deux enzymes Dnmt3a et Dnmt3b dans le système hématopoïétique inhibe l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices mais n'altère pas leur potentiel de différenciation vers les lignées lymphoïdes et myéloïdes {Tadokoro *et al.*, 2007}. L'inactivation de *Dnmt3a* seul conduit à une expansion du compartiment des HSC et une altération de leur capacité de différenciation, liées à la déméthylation et la surexpression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des HSC {Challen *et al.*, 2011}.

L'altération des modifications des histones et de la méthylation est fréquemment observée dans les cellules cancéreuses {Jones and Baylin, 2007}. L'hyperméthylation des îlots CpG des régions promotrices est un mécanisme d'inactivation de gènes de type suppresseur de tumeur {Esteller, 2008 ; Lujambio *et al.*, 2010}. L'hypométhylation des séquences répétées et péri-centromériques du génome des cellules tumorales est à l'origine d'une instabilité génétique qui favorise les pertes d'hétérozygotie et les réarrangements chromosomiques {Gaudet *et al.*, 2003}. L'identification de profils de méthylation modifiés dans les cellules transformées présente un intérêt diagnostique, pronostic et thérapeutique important dans les hémopathies malignes, en particulier dans les syndromes myélodysplasiques et les leucémies aiguës myéloïdes {Jiang *et al.*, 2009 ; Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011}.

II. LES HEMOPATHIES MALIGNES

La transformation tumorale est un processus multi-étapes résultant de l'accumulation et de la coopération d'anomalies moléculaires qui conduisent progressivement une cellule normale vers un phénotype transformé (pour revue {[Hanahan and Weinberg, 2011](#)}). Deux types de gènes sont impliqués dans la tumorigénèse selon les conséquences fonctionnelles des mutations qui les concernent. Certaines anomalies affectent les gènes de type suppresseur de tumeur et entraînent une perte de fonction de la protéine concernée. Selon le modèle de Knudson, les deux copies d'un gène de ce type doivent être inactivées pour intervenir dans la transformation cellulaire {[Knudson, 1971](#)}. L'haplo-insuffisance (c'est-à-dire l'inactivation d'un seul allèle) peut toutefois être suffisante au processus de transformation {[Berger and Pandolfi, 2011](#)}. D'autres anomalies ciblent les oncogènes, une version modifiée de gènes cellulaires « normaux ». La mutation activatrice d'une seule copie d'un gène de ce type suffit à sa participation à la transformation.

Chez l'Homme, les oncogènes ont d'abord été caractérisés par l'étude des anomalies cytogénétiques retrouvées dans les cellules tumorales {[Fröhling and Döhner, 2008](#)}. Ces anomalies chromosomiques peuvent être de nombre (monosomie, trisomie, hyperploïdie...) ou de structure (translocations, inversions,...). Les translocations sont les remaniements les plus fréquemment retrouvés dans les échantillons de patients atteints d'hémopathies malignes (en particulier de leucémies aiguës). La juxtaposition de séquences d'ADN provenant de deux chromosomes différents peut conduire soit à l'expression ectopique ou la surexpression d'un gène normal (acquisition de propriétés dominantes positive ou négative), soit à la création d'un gène de fusion et l'expression d'une protéine chimérique. Des mutations géniques ponctuelles peuvent également affecter certains gènes associés à la régulation de mécanismes cellulaires essentiels.

Les hémopathies malignes humaines sont des maladies acquises des cellules souches ou progénitrices plus ou moins engagées dans la différenciation hématopoïétique. Elles se caractérisent par la présence d'anomalies acquises, clonales et récurrentes (translocations chromosomiques, mutations ponctuelles). Les fonctions exercées par les gènes affectés sont variées : contrôle du cycle cellulaire, signalisation intracellulaire (récepteurs membranaires, protéines à activité tyrosine kinase) ou régulation de l'expression génique (facteurs de transcription, régulateurs transcriptionnels et modificateurs chromatinien) {[Blume-Jensen and Hunter, 2001](#)}. Selon la classification *French-American-British* (FAB), les hémopathies malignes sont classées en fonction de la lignée cellulaire atteinte (myéloïde ou lymphoïde), de la présence ou non de dysplasies, du caractère chronique ou aiguë de la pathologie et du stade d'arrêt de différenciation des cellules blastiques (leucémies aiguës) {[Vardiman et al., 2009](#)}.

A) Leucémogénèse et coopération oncogénique

Dans le système hématopoïétique, les anomalies moléculaires nécessaires à la transformation d'une cellule normale conduisent généralement à la dérégulation de certains gènes exerçant des fonctions essentielles au contrôle de l'hématopoïèse. A quelques exceptions bien caractérisées (comme les translocations t(15;17)(q24;q21) ou t(9;22)(q34;q11.2), à l'origine de la fusion des gènes *PML/RARA* et *BCR/ABL*, respectivement), la survenue d'une anomalie moléculaire ne suffit pas à elle seule à transformer une cellule progénitrice hématopoïétique {Dash *et al.*, 2002 ; Kelly *et al.*, 2002 ; Stubbs *et al.*, 2008}.

Schématiquement, la leucémogénèse repose sur la coopération fonctionnelle d'au moins deux types d'anomalies acquises par les progéniteurs hématopoïétiques, les unes conférant un avantage prolifératif et/ou de survie (classe I) et les autres bloquant la différenciation (classe II) {Kelly and Gilliland, 2002} (Figure 5). Les mutations de classe I affectent des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (protéines à activité tyrosine kinase et effecteurs). Celles de classe II ciblent des gènes codant pour des facteurs de transcription ou des régulateurs épigénétiques de la transcription {Okuda *et al.*, 1998 ; Castilla *et al.*, 1999}.

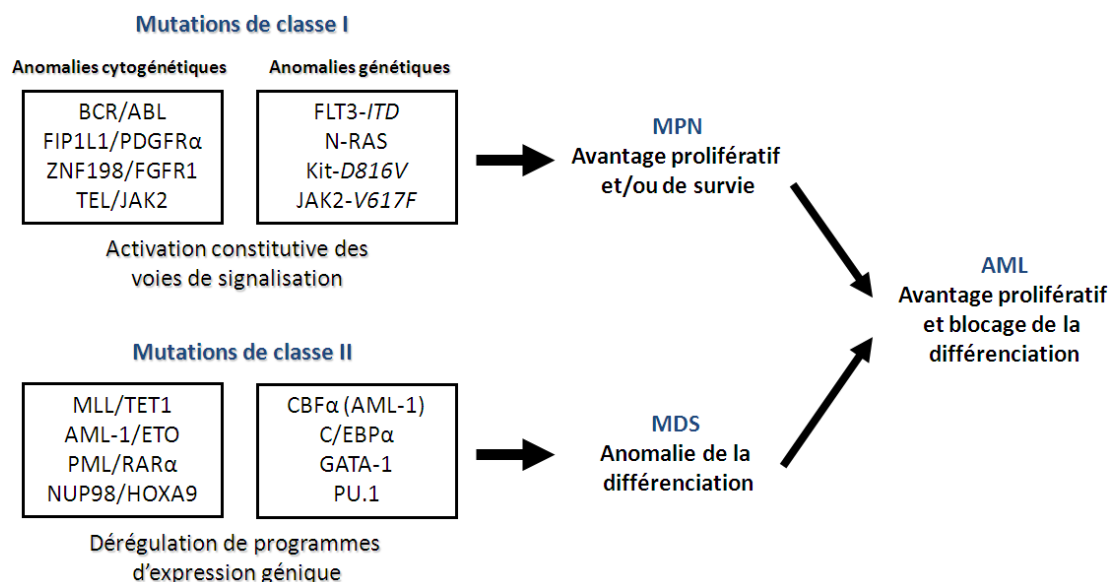


Figure 5 Principe de coopération oncogénique dans les hémopathies malignes. Adapté de {Chalandon and Schwaller, 2005}.

Schématiquement, les mutations conférant un avantage prolifératif et/ou de survie (classe I) conduisent aux syndromes myéloprolifératifs (MPN) ; celles altérant la différenciation (classe II) aux syndromes myélodysplasiques (MDS). La survenue d'évènements de ces deux classes est associée à la transformation blastique des cellules immatures (leucémies aiguës myéloïdes : AML).

Les hémopathies lymphoïdes ont dans la majorité des cas pour origine une cellule lymphoïde B, les autres étant d'origine T (5% des cas) (pour revue {Küppers *et al.*, 2005}). Un envahissement médullaire supérieur à 20% par des cellules blastiques définit une leucémie aiguë lymphoïde tandis qu'une atteinte extramédullaire caractérise un lymphome. Il existe de nombreux types de lymphomes B, classés selon la lymphomagénèse et la réponse aux traitements associés. La plupart dérivent d'une cellule B du centre germinatif ou post-centre germinatif, à l'exception des lymphomes du manteau (Figure 6). Ces pathologies sont principalement associées à la dérégulation de l'expression de protéines impliquées dans la prolifération (comme MYC) et la survie cellulaire (comme BCL2), à la suite de translocations chromosomiques impliquant les gènes des immunoglobulines {Willis and Dyer, 2000}. Les lymphomes B diffus à grande cellules (DLBCL) et les lymphomes folliculaires sont parmi les formes les plus fréquentes {Jaffe, 2009}.

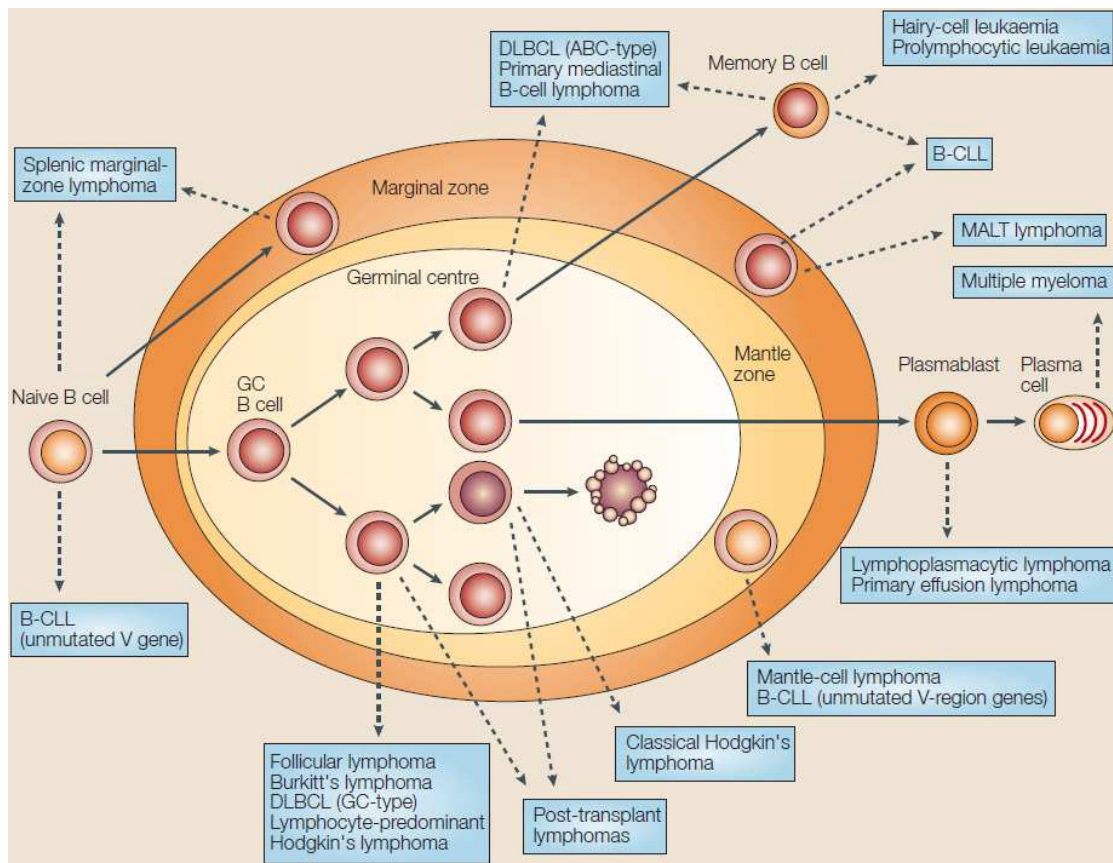


Figure 6 Origine des cellules B selon les différentes formes de lymphomes. {Küppers *et al.*, 2005}.

DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma, ABC: *in vitro*-Activated B Cells, GC: Germinal Center, B-CLL: B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia, MALT: extranodal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue.

B) Hémopathies malignes myéloïdes

Selon la classification OMS des hémopathies malignes, il existe quatre types d'hémopathies myéloïdes : les syndromes myéloprolifératifs (MPN), les syndromes myélodysplasiques (MDS), les formes frontières MDS/MPN comme les leucémies myélo-monocytaires chroniques (CMML) et les leucémies aiguës myéloïdes (AML). La transformation des progéniteurs myéloïdes est souvent associée à l'expression d'une protéine de fusion ou à des mutations de gènes codant pour des effecteurs majeurs de l'hématopoïèse (kinases, facteurs de transcription, modificateurs chromatinien et gènes du spliceosome) (Tableau I).

Tableau I Réurrence des mutations de certains gènes dans les hémopathies myéloïdes.

	<i>JAK2</i>	<i>CBL</i>	<i>RAS</i>	<i>RUNX1</i>	<i>ASXL1</i>	<i>EZH2</i>	<i>UTX</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>TET2</i>	<i>IDH</i>	Spliceosome
MPN	80%	2%	-	-	10% ^(*4)	5% ^(*4)	-	5% ^(*4)	10%	1%	<i>SF3B1</i> ^(*1)
MDS	2%	2%	10%	10%	20%	5%	-	10%	20%	5%	80% ^(*2)
CMML	10%	15%	20%	20%	45%	10%	10%	2%	45%	5%	<i>SRSF2</i> ^(*3)
AML	2%	10%	10%	5%	5%	-	-	20%	15%	20%	<i>SF3B1</i> ^(*1)

Fréquence des mutations	0-2%	2-5%	5-10%	10-30%	> 30%
-------------------------	------	------	-------	--------	-------

La fréquence des mutations des gènes impliqués dans la régulation des voies de signalisation (*JAK2*, *CBL*, *RAS*, *RUNX1*), de l'expression génique (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH*) et de l'épissage des messagers (gènes du spliceosome) est indiquée. Les mutations récurrentes des gènes *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* dans les AML ne sont pas indiquées. (*1) Parmi les gènes du spliceosome mutés dans les hémopathies (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35/U2AF1* et *ZRSR2*) {Damm *et al.*, 2012a}, seul *SF3B1* est muté dans les MPN et les LAM (3 à 5% des cas). (*2) *SF3B1* est muté dans 20 à 70% des cas de MDS, *SRSF2* dans 15%, ainsi que *U2AF35* et *ZRSR2* dans 10% des cas. (*3) *SRSF2* est muté dans 40% des CMML ; *SF3B1*, *U2AF35* et *ZRSR2* dans 5 à 8% des cas. (*4) Les gènes *ASXL1*, *EZH2* et *DNMT3A* sont mutés dans 3 à 5% des cas de PV et de 7 à 15% des PMF (rarement dans les ET).

1- Syndromes myéloprolifératifs

Les MPN sont des maladies acquises et clonales de la HSC caractérisées par une production excessive de cellules myéloïdes capables de se différencier normalement. Cette hyperplasie est liée à la prolifération anormale et la survie d'une ou plusieurs lignées myéloïdes dans la moelle du fait d'une hypersensibilité et/ou d'une indépendance aux cytokines des progéniteurs hématopoïétiques {Campbell and Green, 2006}. La classification des MPN distingue quatre formes « classiques », la leucémie myéloïde chronique (CML) et les trois MPN « BCR-ABL négatifs », *i.e.* la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (ET) et la myélofibrose primitive (MF) ainsi que d'autres sous-type plus rares {Vardiman *et al.*, 2009}.

Ces pathologies sont en grande partie associées à la dérégulation des voies de signalisation et résultent d'évènements moléculaires bien caractérisés {Baxter *et al.*, 2002 ; Cools *et al.*, 2003 ; Zhao *et al.*, 2005}. La mise en évidence de mutations activatrices du gène *JAK2* est un critère diagnostique important des MPN classiques. La mutation somatique G1849T dans l'exon 14 responsable de la substitution d'une valine par une phénylalanine au codon 617 (*JAK2*^{V617F}) est détectée dans 90 à 95% des cas de PV, 50% des ET et 50 à 60% des MF {Baxter *et al.*, 2005 ; James *et al.*, 2005 ; Kralovics *et al.*, 2005 ; Levine *et al.*, 2005a}. Le *knock-in* de la mutation *JAK2*^{V617F} chez la souris reproduit une maladie de type PV {Lacout *et al.*, 2006}.

Plusieurs mutations gain-de-fonction dans l'exon 10 du gène *MPL* codant pour le récepteur à la thrombopoïétine ont été rapportées. La mutation activatrice la plus fréquente est une transition G/T au nucléotide 1544, conduisant à la substitution du résidu tryptophane en leucine au codon 515 (*MPL*^{W515L}). Ces mutations somatiques sont rares et exclusives des cas de MF/ET négatifs pour la mutation *JAK2*^{V617F} {Pardanani *et al.*, 2006}. Chez la souris, la mutation *MPL*^{W515L} induit une maladie de type MF entraînant une mort rapide des animaux {Pikman *et al.*, 2006}. La découverte des mutations gain-de-fonction *JAK2*^{V617F} et *MPL*^{W515L} a permis de mieux comprendre la physiopathologie des MPN, liée à l'activation de la voie JAK/STAT {Pardanani *et al.*, 2010}. L'inactivation de régulateurs négatifs de cette voie coopèrent avec ces anomalies, comme les mutations des gènes *LNK* {Oh *et al.*, 2010} et *CBL* {Grand *et al.*, 2009}. D'autres évènements génétiques sont principalement associés à la transformation leucémique des MPN, comme la délétion du gène *IKZF1* {Jäger *et al.*, 2010} ou les mutations « gain-de-fonction » des gènes *IDH* {Green and Beer, 2010 ; Tefferi *et al.*, 2010}.

Les mutations activatrices *JAK2*^{V617F} et *MPL*^{W515L} sont présentes dans le compartiment des cellules souches et progénitrices {Delhommeau *et al.*, 2007 ; Chaligné *et al.*, 2007} et sont suffisantes pour reproduire la maladie humaine dans différents modèles *in vivo* {Marty *et al.*, 2010}. De nombreuses observations suggèrent la survenue d'évènement(s) initiateur(s) « pré-JAK2 » {Kralovics *et al.*, 2006 ; Theocharides *et al.*, 2007 ; Beer *et al.*, 2009}. Par exemple, la présence de cellules blastiques non mutées chez un patient MPN portant la mutation *JAK2*^{V617F} souligne la présence de deux évènements génétiques distincts, à l'origine de ces deux maladies {Beer *et al.*, 2010}. Les mutations de nombreux gènes identifiées récemment dans les hémopathies malignes pourraient constituer de tels évènements pré-JAK2. Ces gènes sont impliqués dans la régulation épigénétique de l'expression génique : *TET2* {Delhommeau *et al.*, 2009} et *ASXL1* {Carbuccia *et al.*, 2009} ainsi que *DNMT3A* {Stegelmann *et al.*, 2011} et *EZH2* {Abdel-Wahab *et al.*, 2011b}, mais aucune de ces anomalies n'est spécifique des MPN ni d'un autre groupe d'hémopathies malignes.

2- Syndromes myélodysplasiques

Les MDS sont un groupe hétérogène de maladies acquises de la cellule souche hématopoïétique, survenant le plus souvent chez les personnes âgées. Ils se caractérisent par une hématopoïèse clonale inefficace liée à la dysplasie d'une ou plusieurs lignées myéloïdes, responsable de cytopénies périphériques {Tefferi and Vardiman, 2009}. Les MDS constituent l'état pré-leucémique le plus fréquent chez l'adulte du fait d'un risque important de transformation vers la leucémie aigüe myéloïde {Scott and Deeg, 2010}. Il existe une hétérogénéité clinique concernant la gravité des cytopénies, le nombre de cellules blastiques dans la moelle osseuse et la réponse aux traitements proposés, qui reflète la variété des mécanismes moléculaires responsables de ces hémopathies {Greenberg *et al.*, 1997}.

Le diagnostic et le risque pronostic sont principalement définis par l'analyse du caryotype des cellules médullaires {Tiu *et al.*, 2011}. Des anomalies cytogénétiques récurrentes sont observées dans 40 à 60% des cas de MDS *de novo* : les pertes de tout ou partie des chromosomes 5, 7 et 20 ou des gains de matériel (trisomie 8) sont fréquemment décrites {Haase *et al.*, 2007}. Le syndrome 5q- est associé à une meilleure survie des patients {Graubert *et al.*, 2009}. D'autres remaniements comme des pertes du chromosome Y, des translocations équilibrées (comme celles impliquant le gène *Evi1*) ou des réarrangements complexes sont plus rares et de mauvais pronostic.

Des études génomiques globales d'échantillons de patients ont récemment permis d'identifier des microdélétions invisibles en cytogénétique classique ou des régions de perte d'hétérozygotie {Langemeijer *et al.*, 2009}. Certains des gènes situés dans les régions concernées sont aussi la cible de mutations acquises. Il existe dans l'ensemble plusieurs anomalies génétiques récurrentes impliquant des gènes de régulation de voies de signalisation (*N-RAS*, *CBL*), de la transcription (*RUNX1/AML-1*, *TEL/ETV6*, *TP53*) et du cycle cellulaire (*CDKN2A*, *PTEN*) {Bejar *et al.*, 2011}.

Des mutations affectant des gènes du spliceosome (en particulier les gènes *SF3B1*, *SRSF2* et *U2AF35*) sont parmi les plus fréquentes dans les myélodysplasies {Yoshida *et al.*, 2011 ; Papaemmanuil *et al.*, 2011} et sont observées en particulier dans les formes de MDS associées aux sidéroblastes en couronne {Visconte *et al.*, 2012}. Ces mutations faux-sens hétérozygotes sont décrites dans l'ensemble des hémopathies malignes et de nombreuses tumeurs « solides » {Wood *et al.*, 2007}. Les mutations de *SF3B1* sont aussi récurrentes dans les leucémies lymphoïdes chroniques {Wang *et al.*, 2011 ; Quesada *et al.*, 2012} et sont présentes dans le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques immatures {Graubert *et al.*, 2011}.

Les mutations d'un certain nombre de gènes codant pour des modificateurs épigénétiques ont également été récemment identifiés dans les MDS : *TET2* {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009}, *ASXL1* {Gelsi-Boyer *et al.*, 2009}, *IDH1* {Thol *et al.*, 2010}, *DNMT3A* {Walter *et al.*, 2011} et *EZH2* {Ernst *et al.*, 2010 ; Nikoloski *et al.*, 2010}. Les mutations des gènes *EZH2* et *ASXL1* sont de mauvais pronostic, indépendamment de la catégorie de risque définies dans la classification de l'IPSS (*International Prognostic Scoring System*) {Bejar *et al.*, 2011}. La régulation de la méthylation de l'ADN joue un rôle déterminant dans la physiopathologies des MDS {Figuerola *et al.*, 2009} et l'altération de cette marque épigénétique constitue un facteur prédictif de transformation, de survie et de réponse au traitement {Jiang *et al.*, 2009 ; Fenaux *et al.*, 2010 ; Shen *et al.*, 2010}.

✕ *Formes frontières syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs*

Certaines hémopathies malignes partagent des caractéristiques communes aux MDS et aux MPN et sont classées comme formes frontières MDS/MPN {Vardiman *et al.*, 2009}. Ce sont les leucémies myélo-monocytaires chroniques (CMML) et juvéniles (JMML), les CML atypiques *BCR-ABL* négatives, les RARS-T (thrombocytose majeure et anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne) et les MDS/MPN inclassifiables. Les CMML sont des maladies hématopoïétiques clonales rares, associée à une transformation maligne de la HSC et un risque important de progression vers la leucémie aiguë myéloïde {Orazi and Germing, 2008}. Elles sont caractérisées par une hématopoïèse inefficace (dysplasie d'une ou plusieurs lignées myéloïdes) et une prolifération myéloïde affectant généralement la lignée monocyttaire. Elles sont définies sur la base de critères morpho-cytologiques (monocytose périphérique persistante, taux de blastes inférieur à 20% dans le sang ou la moelle osseuse). Deux sous-types existent selon le compte de leucocyte (seuil fixé à $13.10^9/L$ chez l'Homme) : les CMML de type myéloprolifératives ou de type myélodysplasiques {Bennet *et al.*, 1994}.

Les CMML sont associées à un caryotype normal : des anomalies cytogénétiques récurrentes sont décrites dans 20 à 40% des cas {Gondek *et al.*, 2007}. Les aberrations chromosomiques les plus fréquentes ne sont pas spécifiques des CMML et sont généralement également décrites dans les échantillons de MDS (trisomie 8, monosomie ou perte du bras long du chromosome 7) {Gondek *et al.*, 2008}. Des pertes d'hétérozygotie sont récurrentes et affectent en particulier les régions chromosomiques 1p, 4q, 7q et 11q {Jankowska *et al.*, 2011}.

Ces pathologies sont associées à une grande hétérogénéité, soulignée par la diversité des anomalies génétiques décrites récemment {Jankowska *et al.*, 2011}. Les mutations somatiques observées dans les CMML ne sont pas spécifiques de cette pathologie. Elles affectent divers gènes codant pour des facteurs de transcription (*RUNX1* {Kuo *et al.*, 2009}, des régulateurs de la signalisation intracellulaire (*JAK2*^{V617F}, *CBL*, *K/N-RAS* {Gelsi-Boyer *et al.*, 2008 ; Makishima *et al.*, 2009}, des régulateurs épigénétiques (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2* et *UTX*) ainsi que certains gènes du spliceosome (*SRSF2* et *U2AF35*) {Gelsi-Boyer *et al.*, 2009 ; Kosmider *et al.*, 2009a ; Yoshida *et al.*, 2011}. Les mutations du gène *CBL* conduisant à la dérégulation des voies de signalisation sont associées aux CMML myéloprolifératives et sont exclusives des mutations des gènes *RAS*, *JAK2*^{V617F} et *RUNX1* {Dunbar *et al.*, 2008 ; Grand *et al.*, 2009 ; Sanada *et al.*, 2009}. Le gène *CBL* code pour une protéine cytosolique à activité E3 ubiquitine ligase, nécessaire pour l'adressage au protéasome et la régulation négative de la signalisation de récepteurs à activité tyrosine kinase (Flt-3, MPL) {Sargin *et al.*, 2007 ; Saur *et al.*, 2010}. Les mutations les plus fréquentes des gènes du spliceosome sont celles du gène *SRSF2* et sont associées aux CMML de type myéloprolifératives ; celles des gènes *U2AF35* et *ZRSR2* sont associées aux CMML de type myélodysplasiques {Yoshida *et al.*, 2011}. Les anomalies des gènes *TET2* et *ASXL1* sont les plus fréquentes dans ces hémopathies (45 à 50%) et sont de mauvais pronostic (du fait d'un risque important de transformation blastique) {Kosmider *et al.*, 2009a ; Gelsi-Boyer *et al.*, 2010}.

3- Leucémies aiguës myéloïdes

Les AML regroupent des maladies clonales et acquises des HSPC. Ce sont des proliférations malignes de cellules souches ou progénitrices, associées à un blocage de la maturation à un stade variable de la différenciation myéloïde. Leur classification repose sur des critères morphologiques et immunophénotypiques définissant le statut de différenciation des cellules leucémiques. L'accumulation de blastes dans le sang et la moelle est associée à une insuffisance médullaire se traduisant par des cytopénies diverses (leucopénie, thrombocytopénie et anémie). Les AML sont le plus souvent sporadiques (âge médian autour de 60 ans au diagnostic) mais certaines pathologies acquises ou congénitales prédisposent au développement de cette pathologie. Des anomalies chromosomiques structurelles récurrentes sont retrouvées dans 50 à 60% des cas chez l'adulte et sont associées à un impact pronostic spécifique. Les réarrangements des gènes *CBFA* et *CBFB* (translocations t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13.1;q22) et inversion inv(16), associées aux mutations *KIT*) et la translocation t(15;17)(q24;q12) sont de risque favorable. En revanche, les patients avec un réarrangement du gène *MLL* situé en 11q23 ou du gène *EVII* en 3q26.2 sont classés dans le groupe de risque défavorable.

Il existe diverses mutations récurrentes dans les échantillons leucémiques « à caryotype normal » {Döhner *et al.*, 2010}. Les mutations des gènes *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* et *N-RAS* sont détectées dans 80% des AML à caryotype normal {Schlenk *et al.*, 2008} et sont associées à une prise en charge thérapeutique particulière et à un risque spécifique (groupe intermédiaire). La présence des mutations du gène *NPM1* ou du gène *CEBPA* est associée à une meilleure survie en l'absence de la mutation *FLT3*-ITD {Patel *et al.*, 2012}. Les mutations des gènes *NF1* {Parkin *et al.*, 2010}, *N-RAS* {Bacher *et al.*, 2006}, *KIT* {Paschka *et al.*, 2006} et *FLT3* {Gilliland and Griffin, 2002} conduisent à l'activation de voie de signalisation et confèrent un avantage prolifératif aux cellules. Les mutations/remaniements de régulateurs (*RUNX1*, *CEBPA*) ou de co-activateurs transcriptionnels (*MLL*, *CBP/p300*, *MOZ*, *TIF2*) conduisent à un blocage de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques.

La caractérisation des translocations du gène *MLL* a permis d'établir le rôle des modificateurs épigénétiques dans la physiopathologie des leucémies aiguës. La duplication partielle en tandem du gène *MLL* (*MLL*-PTD) a été le premier facteur de mauvais pronostic identifié dans les AML à caryotype normal {Caligiuri *et al.*, 1998}. L'altération de la fonction d'autres gènes impliqués dans la régulation épigénétique de la transcription a récemment été décrite. La mise en évidence des mutations des gènes *DNMT3A* {Ley *et al.*, 2010 ; Yan *et al.*, 2011}, *IDH* {Marcucci *et al.*, 2010}, *TET2* {Delhommeau *et al.*, 2009}, *ASXL1* {Abdel-Wahab *et al.*, 2010} et *PHF6* {Van Vlierberghe *et al.*, 2011} permettent par ailleurs une meilleure classification du risque pronostic {Patel *et al.*, 2012}. La présence des mutations de *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* est associée à un mauvais pronostic indépendamment de la présence des anomalies *FLT3*-ITD {Patel *et al.*, 2012}. Contrairement aux mutations *IDH1*^{R132} et *IDH2*^{R172} (rarement associée à d'autres anomalies), la mutation ciblant le résidu R140 du gène *IDH2* est de bon pronostic dans les AML {Green *et al.*, 2011 ; Patel *et al.*, 2012}. Les mutations des gènes *TET2* et *IDH* sont mutuellement exclusives dans les AML chez l'adulte {Figuerola *et al.*, 2010a} et sont rares dans les AML pédiatriques {Andersson *et al.*, 2011 ; Ho *et al.*, 2011 ; Langemeijer *et al.*, 2011}.

Certains profils de méthylation du génome de cellules blastiques sont spécifiques de sous-groupes d'AML particuliers et corrént avec l'impact pronostic {Figuerola *et al.*, 2010b ; Deneberg *et al.*, 2011}. Les patients présentant une hyperméthylation répondent bien aux thérapies hypométhylantes (utilisation de 5-azacytidine, un inhibiteur des DNMT). En particulier, les patients atteints de MDS ou AML mutés pour *TET2* présentent une meilleure réponse au traitement en comparaison avec les patients sauvages (mais sans amélioration de la survie globale) {Itzykson *et al.*, 2011 ; Voso *et al.*, 2011}.

C) Mutations de gènes associés à la régulation épigénétique de la transcription

La caractérisation des anomalies génétiques acquises dans les hémopathies malignes permet *in fine* une meilleure compréhension des mécanismes de leucémogénèse chez l'Homme. Le développement d'analyse génomique globale à haut débit d'échantillons de patients a récemment permis l'identification de nombreuses anomalies moléculaires. Des mutations de gènes impliqués dans la régulation épigénétique de la transcription ont récemment été mises en évidence dans l'ensemble des hémopathies malignes (Tableau II).

Tableau II Signification des mutations des gènes ASXL1, EZH2 et DNMT3A.

	PV	ET	MF	MPN	MDS	CMML	AML
ASXL1 (20q21)	4%	1%	15%	10%	20%	45%	5%
EZH2 (7q36)	3%	-	7%	5%	5%	10%	-
DNMT3A (2p23)	4%	2%	7%	5%	10%	2%	20%

Fréquence des mutations	0-2%	2-5%	5-10%	10-30%	> 30%
-------------------------	------	------	-------	--------	-------

1- Modification des histones

a. ASXL1 (*Additional Sex Combs-like 1*)

Les gènes de la famille *ASXL* (*ASXL1*, *ASXL2* et *ASXL3*) sont apparentés aux gènes *Asx* appartenant au groupe ETP identifiés chez la drosophile. Ils sont nécessaires pour l'extinction à long terme des gènes du développement {Bracken *et al.*, 2006}. Le produit du gène *Asx* a été identifié chez la drosophile dans un nouveau complexe Polycomb comme partenaire de l'ubiquitine hydrolase Calypso {Scheuermann *et al.*, 2010}. L'activité de déubiquitylation de l'histone H2AK119ub de ce complexe PR-DUB (*Polycomb Repressive Deubiquitinase*) entre en compétition avec l'activité de PRC1 dans la régulation des gènes *HOX*. Une fonction équivalente n'a pas été démontrée chez les mammifères, mais il existe chez l'Homme une association physique entre ASXL1 et l'orthologue BAP1 de la protéine Calypso {Aravind and Iyer, 2012}. Le rôle du produit du gène *ASXL1* dans la régulation épigénétique de la transcription dépend du contexte cellulaire et de son interaction avec les récepteurs nucléaires RAR α et PPAR γ {Cho *et al.*, 2006 ; Fisher *et al.*, 2010a}. L'interaction de la protéine ASXL1 avec l'histone H3K4 déméthylase LSD1 et la protéine HP1 est associée à la répression de la transcription de ses gènes cibles {Lee *et al.*, 2010 ; Park *et al.*, 2011}.

Des mutations hétérozygotes du gène *ASXL1* sont fréquemment décrites dans l'ensemble des hémopathies malignes myéloïdes, en particulier dans les formes les plus avancées {Grossmann *et al.*, 2011}. Elles sont rarement observées dans les cas de PV/ET mais fréquentes dans les myélofibroses primitives {Carbuccia *et al.*, 2009}, ainsi que dans les formes de MDS avec excès de blastes (RAEB) {Boulwood *et al.*, 2010 ; Bejar *et al.*, 2011} et dans les CMML {Gelsi-Boyer *et al.*, 2009}. Les mutations de ce gène sont de mauvais pronostic dans ces dernières pathologies, en particulier celles de type myéloprolifératives {Gelsi-Boyer *et al.*, 2010 ; Grossmann *et al.*, 2011}. La présence de cette anomalie est également associée à un mauvais pronostic dans les MDS et les AML {Bejar *et al.*, 2011 ; Patel *et al.*, 2012}.

Les mutations du gène *ASXL1* sont pour la majorité situées au niveau des derniers exons du gène (exons 11 et 12). Ce sont des mutations de troncation (petites insertions/délétions et duplications décalant le cadre de lecture, mutations de type non-sens) qui conduisent à la perte du domaine PHD carboxy-terminal de la protéine. L'hétérozygotie des mutations suggère une haplo-insuffisance de ce gène dans les hémopathies malignes. Ces mutations sont exclusives d'autres anomalies génétiques récurrentes dans les hémopathies myéloïdes, comme la mutation activatrice *JAK2*^{V617F} dans les MF {Carbuccia *et al.*, 2009} ou les mutations des gènes *NPM1* et *FLT3* dans les AML à caryotype normal {Carbuccia *et al.*, 2010}. Les mutations du gène *ASXL1* peuvent survenir précocement dans l'évolution de la maladie et précéder les mutations de *JAK2* et *TET2* {Carbuccia *et al.*, 2009 ; Abdel-Wahab *et al.*, 2010}. Elles sont également décrites comme secondaires aux autres anomalies {Stein *et al.*, 2011 ; Ricci *et al.*, 2012} et peuvent être associées aux mutations germinales de *GATA-2* chez certaines familles présentant une prédisposition au développement d'hémopathies malignes (MDS/AML) {Bödör *et al.*, 2012}.

Le gène *ASXL1* est exprimé dans l'ensemble des cellules du système hématopoïétique, mais sa fonction au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique est encore incomprise chez la souris. Le KO du gène *Asxl1* conduit à une léthalité embryonnaire ou péri-natale d'une fraction des animaux {Fisher *et al.*, 2010b}. Les animaux survivants présentent des défauts moyens de la myélopoïèse, une légère diminution des progéniteurs myéloïdes immatures et une splénomégalie modérée (mais aucune dysplasie myéloïde). L'invalidation de ce gène dans ce modèle ne semble pas suffisante pour conduire au développement d'hémopathies malignes {Fisher *et al.*, 2010b}. Un récent modèle d'inactivation du gène *Asxl1* présente une augmentation des cellules souches et progénitrices (liée à la dérégulation de l'expression du gène *Hoxa*) ainsi qu'une myéloprolifération (associée à une monocytose) et des anomalies de la différenciation myéloïde après l'âge de six mois ; la perte du gène *Asxl1* ne confère pas d'avantage compétitif aux HSC mais conduit à un phénotype de type CMML {Abdel-Wahab *et al.*, 2012}.

b. EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*)

Le gène *EZH2* code pour la sous-unité catalytique du complexe Polycomb PRC2 impliqué dans la régulation de la structure chromatinienne. Cette histone méthyltransférase permet la triméthylation H3K27me₃, une marque associée à la répression transcriptionnelle. Des mutations homozygotes du gène *EZH2* sont observées dans les myélofibroses et les formes frontières MDS/MPN de type CMML {Abdel-Wahab *et al.*, 2011a, 2011b ; Bejar *et al.*, 2011}. Ces mutations acquises constituent un événement précoce dans l'évolution de la maladie et sont de mauvais pronostic {Grossmann *et al.*, 2011 ; Guglielmelli *et al.*, 2011}. Elles conduisent à la production d'une protéine tronquée ou à l'inhibition de l'activité méthyltransférase, ce qui suggère un rôle suppresseur de tumeur dans les hémopathies malignes. Le niveau de triméthylation des H3K27 est réduit chez les patients mutés pour *EZH2* {Makishima *et al.*, 2010 ; Ntziachristos *et al.*, 2011} et la perte de la fonctionnalité du complexe PRC2 conduit à une expansion des cellules souches et progénitrices {Majewski *et al.*, 2010}.

Des mutations perte-de-fonction et des délétions du gène *EZH2* sont également observées et coopèrent avec les mutations activatrices du gène *NOTCH1* dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type T {Ntziachristos *et al.*, 2011 ; Simon *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012}. Une mutation acquise ciblant le résidu tyrosine Y461 est également observée à l'état hétérozygote dans les lymphomes B dérivant du centre germinatif {Morin *et al.*, 2010}. Cette mutation faux-sens conduit à une augmentation de la triméthylation des H3K27 {Sneeringer *et al.*, 2010 ; Yap *et al.*, 2011}. La surexpression du gène *EZH2* observée dans de nombreux types de tumeurs épithéliales (de mauvais pronostic) est également associée à l'augmentation du niveau de la marque H3K27me₃ et conduit à un blocage de la différenciation des cellules tumorales {Varambally *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2011}.

La fonction de la protéine Ezh2 est essentielle pour l'auto-renouvellement des HSC foetales prolifératives mais elle ne semble pas requise chez l'adulte, probablement compensée en partie par Ezh1 dans les HSC adultes quiescentes {Mochizuki-Kashio *et al.*, 2011}. En revanche, l'inactivation conditionnelle de ce gène chez la souris bloque le développement des cellules lymphoïdes B et T {Su *et al.*, 2003, 2005}. La délétion bi-allélique du gène *Ezh2* conduit au développement de leucémies aiguës lymphoblastiques de type T dans un modèle murin décrit récemment {Simon *et al.*, 2012}. La surexpression du gène *Ezh2* dans le système hématopoïétique (*knock-in* conditionnel) conduit à l'expansion des HSC et une splénomégalie associée à une myéloprolifération modérée à partir de l'âge de douze mois {Herrera-Merchan *et al.*, 2012}.

2- Méthylation de l'ADN

⌘ DNMT3A (*DNA Methyltransferase 3A*)

Le gène *DNMT3A* code pour une méthylase importante pour l'établissement des profils de méthylation de l'ADN (méthylation *de novo*). Des mutations hétérozygotes de ce gène sont décrites dans les myélofibroses {Abdel-Wahab *et al.*, 2011a}, les MDS {Walter *et al.*, 2011} et les AML {Ley *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2010}. Ces mutations acquises sont associées à un mauvais pronostic, en particulier dans les AML de risque intermédiaire {Thol *et al.*, 2011b}. La présence de ces mutations permet toutefois de prédire une meilleure réponse aux traitements d'induction par chimiothérapie à haute-dose {Patel *et al.*, 2012}. Elles sont associées aux AML de caryotype normal et sont exclusives des translocations du gène *MLL* et des réarrangements des gènes *CBF* {Thol *et al.*, 2011b; Ribeiro *et al.*, 2012}. Des mutations du gène *DNMT3A* sont également décrites dans 11% des lymphomes T et sont significativement associées à celles de *TET2*, en particulier dans les lymphomes immuno-angioblastiques de type T (AITL) {Couronné *et al.*, 2012}. Les mutations décrites dans toute la région codante du gène sont de type faux-sens dans la majorité des cas et ciblent préférentiellement le domaine catalytique méthyltransférase de la protéine, en particulier le résidu arginine R882. D'autres mutations de troncation de type perte-de-fonction sont également observées (mutations non-sens ou insertion/délétion décalant le cadre de lecture) et conduisent à la perte de tout ou partie des domaines fonctionnels de la protéine (domaine catalytique méthyltransférase et domaine PHD).

Les conséquences fonctionnelles de ces mutations ne sont pas clairement définies. Elles ne semblent pas avoir d'effet sur le niveau global de la méthylation dans les MDS {Thol *et al.*, 2010} ni dans les AML {Ley *et al.*, 2010}. Il n'existe pas de profil de méthylation ni de profil d'expression spécifique des échantillons d'AML mutés pour *DNMT3A* {Shen *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2012}. Des données *in vitro* montrent que la mutation R882 conduit à une diminution de l'activité méthyltransférase de DNMT3A et serait à l'origine d'une dérégulation de l'expression des gènes *HOX* dans les échantillons humains (hypométhylation des régions régulatrices) {Yamashita *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2011}. L'expression à un même niveau des transcrits sauvages et mutés de *DNMT3A* chez certains patients atteints de MDS pourrait suggérer un effet dominant négatif des mutations de ce gène {Walter *et al.*, 2011}. L'inactivation de *Dnmt3a* chez la souris conduit à une expansion du compartiment des HSC chez les animaux receveurs mais ne semble pas suffire pour conduire à un processus de leucémogénèse {Challen *et al.*, 2011}.

III. LE GENE *TET2* ET SON IMPORTANCE AU COURS DE L'HEMATOPOÏÈSE

Le gène *Ten-Eleven-Translocation* (TET)-2 appartient à une famille de trois gènes conservés au cours de l'évolution (*TET1*, *TET2* et *TET3*) {Lorsbach *et al.*, 2003}. Les mutations acquises de ce gène ont dans un premier temps été mises en évidence dans les hémopathies malignes de type myéloïde, peu de temps avant la découverte du rôle des protéines TET {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009}. Ces enzymes sont des hydroxylases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate capables d'oxyder les cytosines méthylées de l'ADN et de générer les hydroxyméthyl-cytosines {Tahiliani *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2010 ; Figueroa *et al.*, 2010a}. Cette nouvelle modification épigénétique est présente dans tous les types cellulaires mais sa fonction est encore mal définie. Elle constitue une étape intermédiaire dans la déméthylation active de l'ADN {Guo *et al.*, 2011 ; He *et al.*, 2011}. Les protéines TET jouent ainsi un rôle dans la régulation épigénétique de la transcription, mais il paraît évident que les hydroxyméthyl-cytosines puissent aussi avoir une fonction épigénétique propre {Valinluck and Sowers, 2007}. Ces marques sont notamment importantes pour le recrutement de Mbd3 (sous-unité du complexe co-répresseur NurD) et la régulation des gènes de pluripotence des cellules ES {Yildirim *et al.*, 2011}. Le rôle des gènes *TET* est essentiel dans diverses fonctions biologiques telles que la reprogrammation épigénétique du zygote (*TET3*), la pluripotence des cellules souches embryonnaires (*TET1*), le contrôle de l'homéostasie du système hématopoïétique (*TET2*) et la leucémogénèse (*TET1* et *TET2*). L'activité de *TET1* est également importante pour l'activité des cellules neuronales {Guo *et al.*, 2011}.

A) Gènes de la famille TET

Le gène *TET1/LCX* situé sur le bras long du chromosome 10 (en 10q22) est le membre fondateur de la famille TET. Il a été identifié comme partenaire de fusion du gène *MLL* dans la translocation t(10;11)(q22;q23) caractérisée dans de rares cas de leucémies aiguës {Ono *et al.*, 2002 ; Lorsbach *et al.*, 2003}. Les gènes de cette famille sont exprimés de façon ubiquitaire. *TET1* est particulièrement exprimé dans les cellules souches embryonnaires {Ito *et al.*, 2010 ; Koh *et al.*, 2011} et *TET3* est le seul transcrit de la famille détecté dans les oocytes et le zygote au stade unicellulaire {Wossidlo *et al.*, 2011 ; Iqbal *et al.*, 2011}. Dans le système hématopoïétique, les gènes *TET* sont exprimés dans les HSPC et leur expression diminue à mesure de l'engagement dans la différenciation {Lorsbach *et al.*, 2003}. L'expression de *TET2* est augmentée au cours de la granulopoïèse (de façon similaire à *TET3*) et de la lymphopoïèse B {Langemeijer *et al.*, 2009}.

Plusieurs isoformes du gène *TET2* sont exprimés à des niveaux variables dans les cellules du système hématopoïétique {Langemeijer *et al.*, 2009}. L'isoforme principale (2002 aa) est exprimé dans les cellules myélo-monocytaires et lymphoïdes B au même niveau qu'un isoforme plus court, traduit à partir d'un ARNm non épissé en 3' de l'exon 3 et continuant sur un site de poly-adénylation situé avant l'exon 4 (Figure 7). Cet isoforme de 1165 aa est dépourvu des derniers exons codant pour domaine catalytique de la protéine {Langemeijer *et al.*, 2009}.

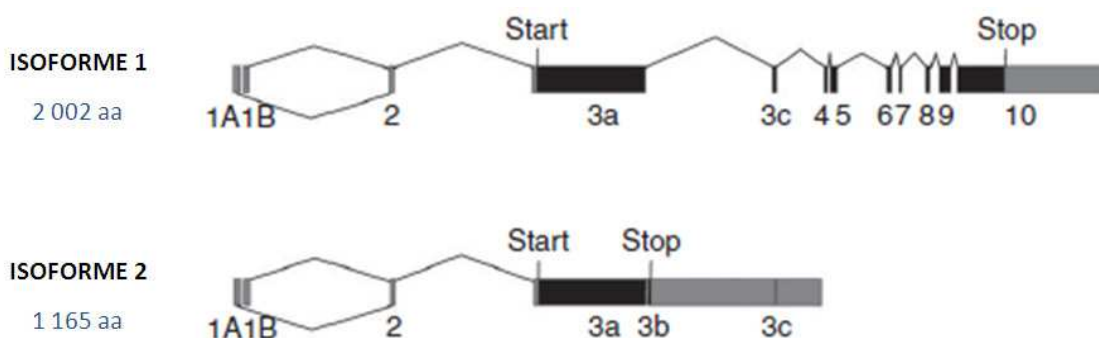


Figure 7 Structure et isoformes du gène *TET2*. Adapté de {Langemeijer *et al.*, 2009}

Le gène *TET2* comporte 11 exons (l'exon noté « 3c » correspond à l'exon 4, celui noté « 10 » à l'exon 11 ; de même, les exons notés « 1A » et « 1B » correspondent à un exon unique). Il existe deux isoformes, le plus long est transcrit à partir des 9 derniers exons codants de ce gène (exons 3a à 10, représentés en noirs). Un troisième isoforme codant pour une protéine de 1194 acides aminés est très faiblement exprimé dans les cellules du système hématopoïétique des cellules de mammifères (structure exon/intron et épissage non représentés).

Les protéines de la famille TET partagent deux régions conservées centrale et carboxy-terminale (Figure 8), également présentes chez leurs orthologues dans d'autres espèces comme *Drosophila melanogaster* {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Tahiliani *et al.*, 2009}. Parmi les protéines TET, seule TET1 possède dans sa région amino-terminale un domaine hautement conservé de liaison à l'ADN en doigts de zinc de type CXXC (Figure 8). Ce domaine confère aux protéines une forte affinité pour les CpG non méthylés {Lee *et al.*, 2001}. Les protéines à domaine CXXC sont impliquées dans la répression transcriptionnelle (comme CXXC1/Cfp1 et CXXC3/Mbd1) {Jørgensen *et al.*, 2004} ou la régulation de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (CXXC4/IDAX et CXXC5/RINF) {Andersson *et al.*, 2009}. Elles sont également impliquées dans le contrôle de la méthylation de l'ADN (CXXC9/DNMT1 et CXXC6/TET1) et des histones (CXXC7/MLL1, CXXC8/KDM2a/FBXL11, CXXC2/KDM2b/FBXL10 et CXXC11/FBXL19) {Ayton *et al.*, 2004}. L'absence de ce domaine de liaison à l'ADN au sein des protéines TET2 et TET3 implique la nécessité d'une interaction avec un partenaire capable de se fixer à l'ADN (non identifiés à ce jour).

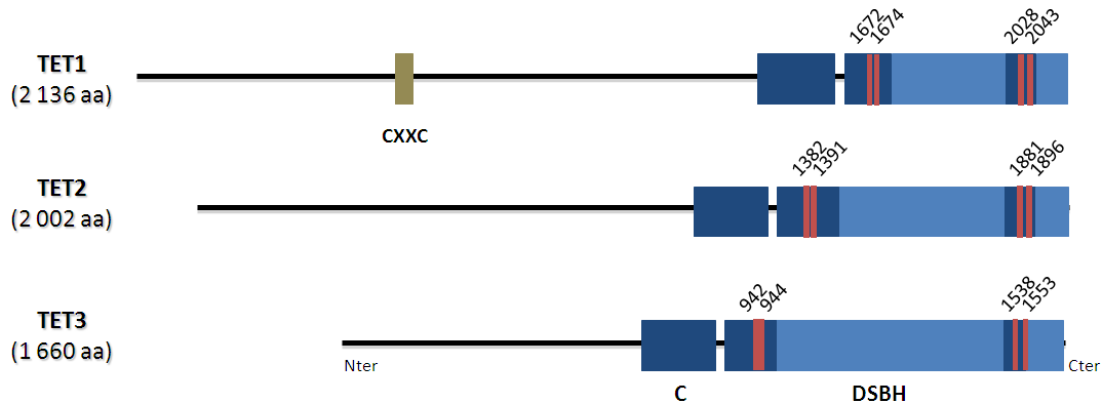


Figure 8 Dioxygénases de la famille TET chez l'Homme.

Les protéines TET1, TET2 et TET3 partagent deux régions hautement conservées centrale et carboxy-terminale (bleu foncé – TET2 : 1131-1444 et 1842-1941). Ces régions correspondent aux deux domaines fonctionnels des dioxygénases dépendantes du fer et du 2-oxoglutarate : une région riche en cystéine (C) et un domaine catalytique DSBH (*Double-Stranded β -Helix*). Les résidus importants pour la liaison aux co-facteurs sont indiqués (marron) : fixation du fer (TET2 : résidus **HxD** 1382/1384, **G** 1391 et **Hxs** 1881) et du 2-oxoglutarate (TET2 : résidu **Rx_{5a}** 1896 – x : tout résidu, s : petit aa, a : aa aliphatique). La protéine TET1 présente également un domaine CXXC de liaison à l'ADN (vert – 584-625) et trois séquences de localisation nucléaire (NLS, non représentées). La protéine TET3 possède dans sa région C une séquence proche de celle du domaine CXXC.

La mise en évidence de similarité de séquences entre les régions conservées des protéines TET et le domaine catalytique des thymines hydroxylases JBP1 et JBP2 ont permis au groupe d'Anjana Rao de déterminer la fonction des gènes *TET* (Figure 9) {Tahiliani *et al.*, 2009}. Les enzymes JBP sont des dioxygénases capables d'oxyder les groupements méthyl des thymines et nécessaires pour la biosynthèse des bases J (β -D-glucosyl-hydroxyméthyl-uracyl) du génome du parasite *Trypanosoma brucei* {Yu *et al.*, 2007 ; Cliffe *et al.*, 2009}. Chez l'Homme, la superfamille des dioxygénases regroupe plus de soixante enzymes impliquées dans une variété de processus biologiques : le métabolisme des acides gras et du collagène, la signalisation à l'hypoxie (HIF1 α prolyl hydroxylases), la déméthylation des histones (LSD1, UTX...), ainsi que la réparation des acides nucléiques (FTO) {Loenarz and Schofield, 2008}.

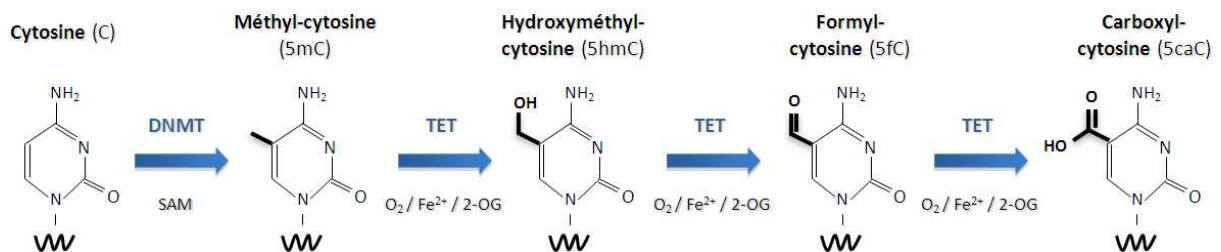


Figure 9 Oxydation des cytosines modifiées par les dioxygénases TET.

Les cytosines méthylées (5mC) par les ADN méthyltransférases DNMT (en présence du co-facteur S-Adenosyl Methionine – SAM) sont oxydées en hydroxyméthyl-, formyl- et carboxyl-cytosines par les dioxygénases dépendantes du Fe²⁺ et du 2-oxoglutarate (2-OG) de la famille TET.

B) Rôle biologique de l'hydroxyméthylation

L'oxydation des cytosines méthylées par les protéines TET permet la formation des hydroxyméthyl-cytosines (5hmC). Cette nouvelle marque est fortement représentée dans certains types cellulaires, ce qui peut suggérer un faible renouvellement et un rôle propre, probablement tissu-spécifique. Les protéines à domaines MBD (*Methyl-CpG-binding protein*) se liant aux 5mC, comme MeCP2, Mbd1, Mbd2 ou Mbd4, présentent une affinité réduite pour les 5hmC {Valinluck *et al.*, 2004 ; Jin *et al.*, 2010}. Ces marques bloquent ainsi le recrutement des effecteurs de la méthylation de l'ADN et conduisent à une levée de la répression transcriptionnelle médiée par la méthylation des cytosines {Bird, 2002}. Cette modification peut aussi constituer un site d'ancrage pour le recrutement de complexes protéiques, comme Mbd3/NurD {Yildirim *et al.*, 2011} et est également impliquée dans la déméthylation de l'ADN {He *et al.*, 2011 ; Guo *et al.*, 2011}.

1- Abondance relative et distribution génomique des hydroxyméthyl-cytosines

Cette forme oxydée a été mise en évidence pour la première fois au sein de l'ADN du bactériophage T (elle lui permet d'échapper aux enzymes de restriction de l'hôte) {Wyatt and Cohen, 1952}. Chez les mammifères, la formation de cette base a été décrite comme résultant d'un stress oxydatif {Penn *et al.*, 1972 ; Cannon *et al.*, 1988}. Récemment, l'analyse de l'ADN génomique de différents sous-types cellulaires de cervelet de souris par chromatographie en couche mince a permis de caractériser un nucléotide inconnu au sein du génome de cellules neuronales, correspondant aux 5hmC {Kriaucionis and Heintz, 2009}.

Les techniques usuelles pour étudier la méthylation de l'ADN ne permettent pas de distinguer les 5mC des 5hmC {Huang *et al.*, 2010 ; Jin *et al.*, 2010 ; Nestor *et al.*, 2010}. De nouvelles techniques ont été mises au point afin de quantifier le niveau des 5hmC dans l'ADN génomique provenant de divers types cellulaires. Elles reposent sur la distinction des nucléotides de l'ADN par chromatographie en couche mince {Tahiliani *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2010} ou par spectrométrie de masse {Münzel *et al.*, 2010 ; Globisch *et al.*, 2011 ; Ito *et al.*, 2011}. Le développement de stratégies innovantes a également permis d'étudier la distribution génomique des 5hmC, par immunoprécipitation {Ficz *et al.*, 2011 ; Williams *et al.*, 2011a ; Wu *et al.*, 2011a ; Xu *et al.*, 2011b}, modification chimique ou enzymatique des 5hmC et immunoprécipitation {Pastor *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2011a ; Szwagierczak *et al.*, 2011}, et séquençage en temps réel {Flusberg *et al.*, 2010 ; Song *et al.*, 2011b ; Yu *et al.*, 2012}.

Les 5hmC sont présentes dans tous les tissus de mammifères analysés, en particulier murins et humains {Wossidlo *et al.*, 2011}. Elles représentent globalement ~0,1 à 0,7% des cytosines (soit ~10% des CpG méthylées) {Globisch *et al.*, 2010 ; Song *et al.*, 2011a ; Li and Liu, 2011}. Ces marques sont enrichies dans certains types cellulaires hautement différenciés du système nerveux central, où elles représentent ~0,6% des cytosines de l'ADN des cellules de Purkinje (soit ~40% des 5mC) contre ~0,2% dans les cellules granulaires {Kriaucionis and Heintz, 2009}. Elles s'accumulent dans le génome des cellules neuronales au cours du développement du cervelet, représentant ~0,1% des cytosines à 7 jours contre ~0,4% chez la souris adulte {Song *et al.*, 2011a}. Les 5hmC sont fortement représentées dans l'ADN génomique des cellules souches embryonnaires murines et humaines (~0,03% des nucléotides) {Tahiliani *et al.*, 2009}.

La distribution de cette marque a été étudiée dans le génome des cellules ES {Stroud *et al.*, 2011 ; Véron and Peters, 2011 ; Booth *et al.*, 2012 ; Yu *et al.*, 2012}, ainsi que des cellules neuronales chez l'Homme et la souris {Jin *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2011a}. Contrairement aux 5mC présentes principalement au sein de l'hétérochromatine péri-centromérique, les 5hmC sont absentes des séquences répétées et enrichies dans les régions euchromatiques sur l'ensemble des bras chromosomiques dans les cellules ES. Elles se situent dans des régions riches en gènes, au niveau des CpG de diverses régions régulatrices, comme les sites de liaison des insulateurs, le site d'initiation de la transcription et le promoteur des gènes, ainsi que les régions intragéniques {Ficz *et al.*, 2011 ; Stroud *et al.*, 2011}. Les séquences immédiatement proches des sites de liaison de facteurs de transcription sont également enrichies en 5hmC dans les cellules ES {Yu *et al.*, 2012}.

La présence des hydroxyméthyl-cytosines dans ces cellules dépend du niveau d'expression des gènes marqués. Elles sont majoritairement localisées au site d'initiation de la transcription des gènes réprimés (gènes bivalents, associés aux marques H3K4me3 et H3K27me3 de la chromatine) et sont enrichies dans les régions intragéniques des gènes exprimés (associés uniquement aux marques activatrices H3K4me3 et H3K36me3) {Pastor *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a}. Dans les cellules ES humaines, les 5hmC sont également localisées dans les régions régulatrices « *enhancer* » de certains facteurs de pluripotence {Szulwach *et al.*, 2011}. Elles jouent un double rôle dans la régulation de la transcription dans les cellules souches pluripotentes {Williams *et al.*, 2011a ; Wu *et al.*, 2011a ; Xu *et al.*, 2011b}. Cette distribution génomique diffère de celle observée dans les cellules neuronales, pour lesquelles les 5hmC sont enrichies dans les régions intragéniques par rapport aux sites d'initiation de la transcription des gènes transcriptionnellement actifs {Song *et al.*, 2011a ; Guo *et al.*, 2011}.

2- Déméthylation de l'ADN et régulation de la transcription

a. Voies de déméthylation passive et active

Les 5hmC sont impliquées dans la déméthylation passive car l'ADN méthyltransférase DNMT1 n'est pas capable de reconnaître cette modification au moment de la réplication de l'ADN {Valinluck and Sowers, 2007}. L'absence de méthylation sur le brin néo-synthétisé conduit à la perte progressive des 5mC du génome des cellules filles (Figure 10). Les 5hmC peuvent elles-mêmes être diluées au cours de la réplication de l'ADN lors des premières divisions cellulaires après la fécondation {Inoue and Zhang, 2011 ; Inoue *et al.*, 2011}.

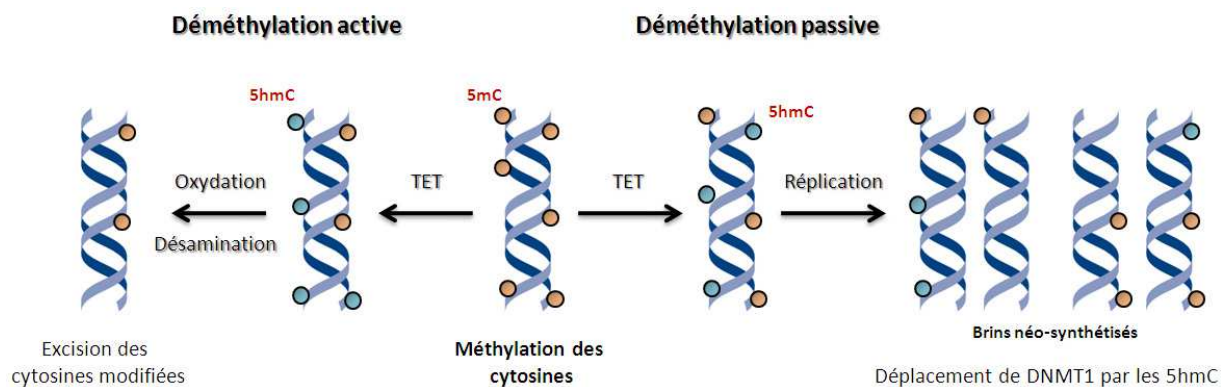


Figure 10 Rôle des hydroxyméthyl-cytosines dans la déméthylation de l'ADN.

Les hydroxyméthyl-cytosines (5hmC) provenant de l'oxydation des cytosines méthylées par les protéines TET ne sont pas reconnues par l'ADN méthyltransférase DNMT1 lors de la réplication (voie de déméthylation passive). L'oxydation (production de 5fC puis de 5caC) ou la désamination (génération de 5hmU) des 5hmC permet l'excision de ces cytosines modifiées et le remplacement par une cytosine par le mécanisme de réparation, indépendamment de la réplication (voies actives).

Le processus de déméthylation active est essentiel au cours du développement de l'embryon {Mayer *et al.*, 2000 ; Oswald *et al.*, 2000} et de l'établissement de l'empreinte dans les cellules germinales primordiales chez les mammifères {Hajkova *et al.*, 2002}. Chez les plantes, la déméthylation de l'ADN est possible grâce au mécanisme de réparation BER initié par les 5mC glycosylases de la famille DME/ROS1 (DEMETER/REPRESSOR OF SILENCING 1) (pour revue {Zhu, 2009}. Chez les vertébrés, le rôle des protéines AID, Mbd2b et Gadd45 dans la déméthylation active a été proposé au cours du développement mais n'a pas été confirmé {Rai *et al.*, 2008}. Il existe d'autres mécanismes enzymatiques importants dans la modification des profils de méthylation, indépendamment de la réplication de l'ADN, initiés entre autres par l'oxydation des cytosines méthylées par les protéines de la famille TET.

* *Oxydations des cytosines méthylées, excision et réparation de l'ADN*

Les dioxygénases TET sont capables d'oxyder successivement les 5hmC en formyl-cytosine (5fC) puis en carboxyl-cytosine (5caC) {He *et al.*, 2011 ; Ito *et al.*, 2011} (Figure 11). Ces cytosines modifiées ont été mises en évidence dans l'ADN génomique de cellules ES et de certains tissus chez la souris {Pfaffeneder *et al.*, 2011}. Elles sont relativement rares et constituent probablement des étapes intermédiaires dans la déméthylation active des cytosines. Les 5fC et les 5caC sont reconnues et excisées par l'ADN glycosylase TDG (*Thymine DNA glycosylase*) {Ito *et al.*, 2011}. Cette excision conduit à la génération d'un site abasique pris en charge par le mécanisme de réparation BER et permet finalement le remplacement des 5mC modifiées par une cytosine non méthylée. L'inactivation du gène *Tdg* chez la souris conduit à une léthalité embryonnaire et à un niveau anormalement élevé de méthylation de l'ADN {Cortázar *et al.*, 2011 ; Cortellino *et al.*, 2011}. D'autres glycosylases comme SMUG1 (*Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase I*) ou Mbd4 ne sont pas capables de reconnaître et d'exciser ces marques {He *et al.*, 2011}, ce qui souligne le rôle essentiel de TDG dans l'élimination des 5fC et des 5caC. L'accumulation modérée de 5caC dans les cellules ES murines dépourvues d'activité TDG suggère toutefois l'existence d'autres voies enzymatiques indépendantes de celles de la réparation de l'ADN, permettant la décarboxylation finale des 5caC en cytosines (voies non caractérisées) {He *et al.*, 2011}.

* *Désamination des 5hmC, excision par la glycosylase TDG et réparation*

Les 5hmC générées par les dioxygénases TET peuvent être modifiées par une désaminase de la famille AID/APOBEC en hydroxyméthyl-uracil (5hmU), à leur tour reconnues et prises en charge par la glycosylase TDG et les enzymes de réparation de l'ADN {Guo *et al.*, 2011 ; Cortázar *et al.*, 2011}. Ces étapes de désamination et d'excision semblent être couplées compte-tenu de l'interaction physique existante entre les enzymes AID et TDG {Cortellino *et al.*, 2011}. L'étude de modèle murin invalidé pour le gène *Aid* a permis de montrer que sa fonction n'est pas restreinte aux tissus lymphoïdes (importante au cours de l'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines) car ces animaux présentent une hyperméthylation modeste de l'ADN dans les cellules germinales primordiales {Popp *et al.*, 2010}. Cette voie de déméthylation active n'est pas bloquée par la perte de fonction de la glycosylase TDG et semble être, compte-tenu de la rareté des 5hmU dans les tissus, spécifique de loci particuliers ou de certains types cellulaires (comme les cellules neuronales) {Globisch *et al.*, 2011 ; Pfaffeneder *et al.*, 2011}.

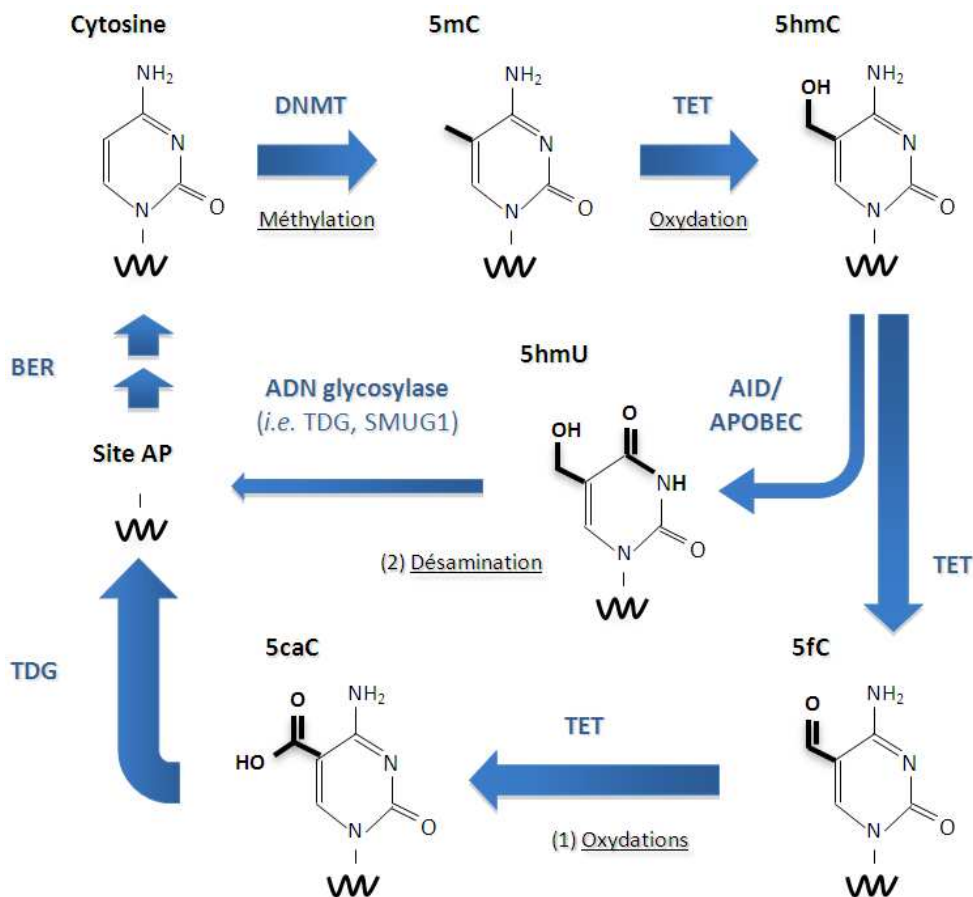


Figure 11 Voies de déméthylation initiées par l'oxydation des cytosines méthylées.

Les hydroxyméthyl-cytosines (5hmC) générées à partir des cytosines méthylées (5mC) par les dioxygénases de la famille TET initient deux voies possibles de déméthylation active de l'ADN :

(1) La réaction d'oxydation par les enzymes TET peut se poursuivre, générant les formyl-cytosines (5fC) puis les carboxyl-cytosines (5caC) directement reconnues par l'ADN glycosylase TDG. Le système de réparation de l'ADN BER (*Base Excision Repair*) réintroduit enfin une cytosine non méthylée qui pourra à son tour être méthylée par les ADN méthyltransférases de la famille DNMT. Les 5caC pourraient également être converties en cytosines par une décarboxylase non identifiée à ce jour (non représentée).

(2) Les 5hmC peuvent être désaminées par les enzymes de la famille AID/APOBEC générant les hydroxyméthyl-uracil (5hmU) qui sont ensuite excisées par différentes ADN glycosylases telles que TDG ou SMUG1 et prises en charge par le système de réparation BER.

Les protéines de la famille TET sont exprimées à des stades de développement précis au cours de l'embryogénèse. Seul le transcrit *TET3* est détecté dans le cytoplasme du zygote {Wossidlo *et al.*, 2011 ; Gu *et al.*, 2011}. *TET1* est une cible transcriptionnelle de nombreux facteurs de pluripotence des cellules souches de l'embryon. Son expression augmente dans les cellules de la région ICM (*Inner cell mass*) du blastocyste (d'où proviennent les cellules ES) {Tahiliani *et al.*, 2009}. La réduction du niveau de 5hmC dans l'ADN génomique des cellules ES est liée à la diminution de l'expression de *TET1* au cours de la différenciation de ces cellules *in vitro* {Koh *et al.*, 2011}.

b. Rôle de TET3 dans la déméthylation de l'ADN chez le zygote

Au cours des premières divisions cellulaires survenant après la fécondation, les cytosines méthylées disparaissent rapidement du pronucléus paternel au stade unicellulaire {Mayer *et al.*, 2000 ; Oswald *et al.*, 2000} (Figure 12). Cette élimination coïncide avec l'apparition des 5hmC, liée à l'activité de la dioxygénase TET3, fortement exprimée dans les oocytes et le zygote {Iqbal *et al.*, 2011 ; Wossidlo *et al.*, 2011}. Les hydroxyméthyl-cytosines sont ensuite progressivement diluées lors de la réplication de l'ADN au cours des trois divisions cellulaires suivantes, ce qui permet finalement une déméthylation globale du génome paternel {Inoue and Zhang, 2011}.

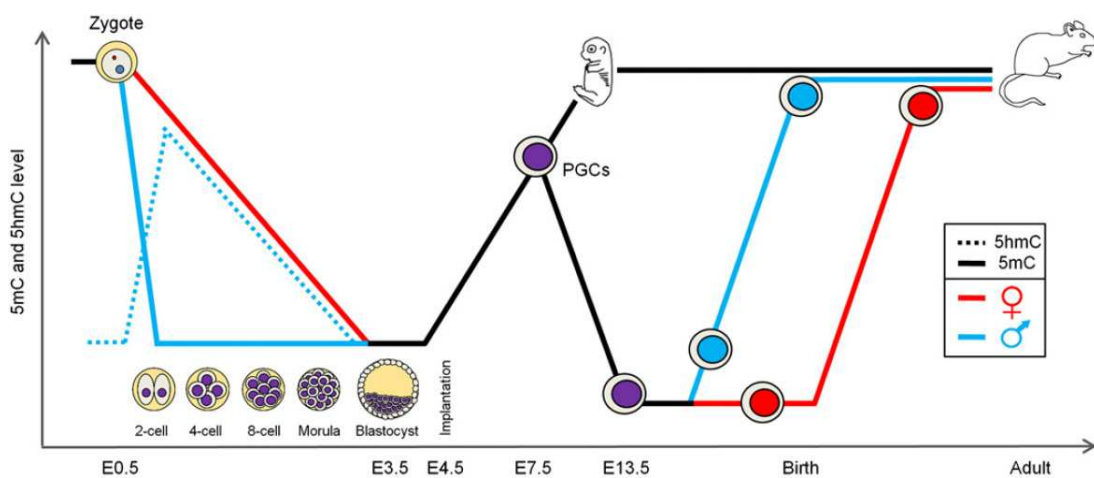


Figure 12 Déméthylation et reprogrammation au cours du développement. {Auclair and Weber, 2012}

L'élimination des cytosines méthylées des chromosomes paternels immédiatement après la fécondation est liée à l'apparition des hydroxyméthyl-cytosines (du fait de l'activité de la dioxygénase TET3), progressivement diluées lors de la réplication de l'ADN jusqu'au stade blastocyste (cette dilution des 5hmC est comparable à celle des cytosines méthylées du génome maternel {Rougier *et al.*, 1998}). Les profils de méthylation sont ensuite établis au cours de la différenciation et maintenus chez la souris adulte, à l'exception des cellules germinales primordiales (PGC), reprogrammées à E11.5 (déméthylation globale de l'ADN associée au remodelage de la chromatine).

La réduction de l'expression du gène *Tet3* par ARN interférence {Wossidlo *et al.*, 2011} et la délétion du gène dans les cellules germinales femelles {Gu *et al.*, 2011} ont permis de confirmer son rôle dans l'oxydation des 5mC du génome paternel. L'altération de la fonction de *Tet3* chez la souris conduit à une augmentation de la fréquence des anomalies de développement embryonnaire {Gu *et al.*, 2011}.

c. Rôle de TET1 dans la biologie des cellules souches embryonnaires

* Distribution génomique de TET1 dans les cellules ES

De manière générale, la protéine TET1 se situe au niveau des régions promotrices et intragéniques d'environ deux tiers des gènes dans les cellules ES {Wu and Zhang, 2011}. Sa liaison à l'ADN génomique corrèle avec la densité en CpG : elle est majoritairement présente aux sites d'initiation de la transcription, des séquences globalement enrichies en CpG {Williams *et al.*, 2011a ; Xu *et al.*, 2011b}. La fixation de TET1 à ces régions permettrait de prévenir l'accumulation stochastique de cytosines méthylées et de maintenir un état hypométhylé, permissif pour la transcription {Deaton and Bird, 2011}. Ce rôle d'intermédiaire dans la déméthylation de l'ADN explique la sous-représentation des 5hmC au site d'initiation des gènes fortement exprimés {Pastor *et al.*, 2011}. La réduction de TET1 conduit à une hyperméthylation des CpG situés dans ces régions, ce qui conforte cette hypothèse {Wu *et al.*, 2011a} (Figure 13).

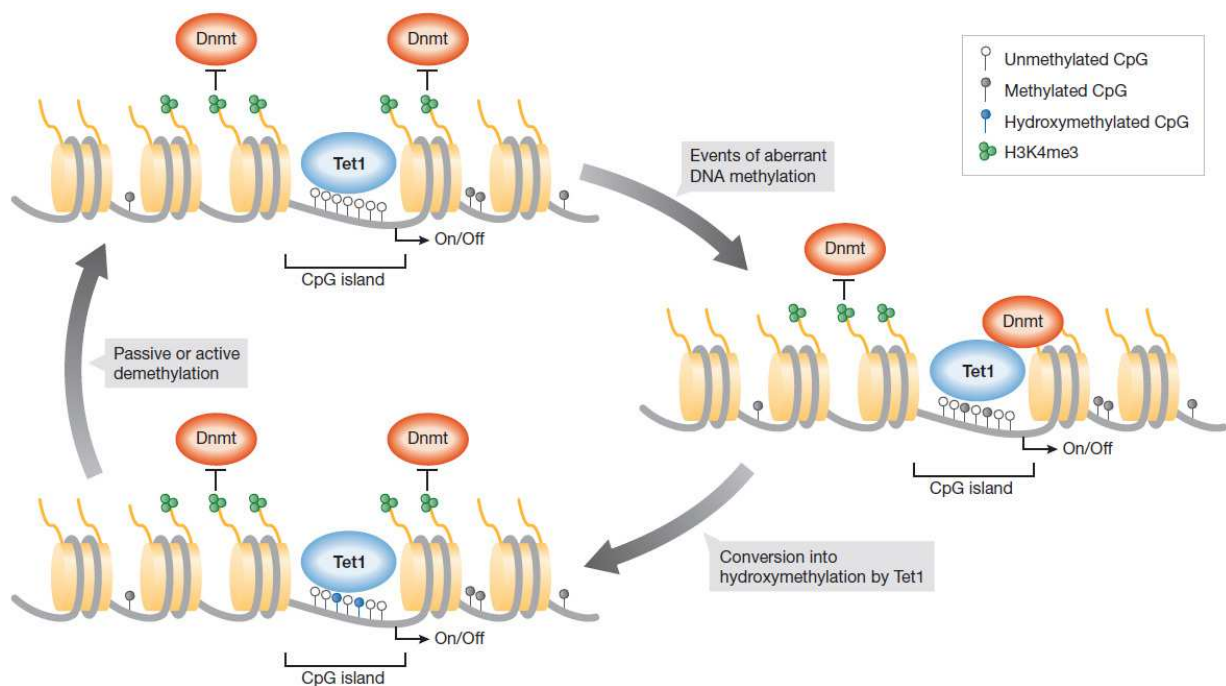


Figure 13 Fonction de TET1 dans la déméthylation de l'ADN. {Williams *et al.*, 2011b}

La fixation de TET1 aux promoteurs de gènes associés aux marques activatrices H3K4me3 permettrait l'élimination d'évènement stochastique de méthylation de l'ADN par un mécanisme de déméthylation actif ou passif initié par l'oxydation des cytosines méthylées en hydroxyméthylcytosines. Dnmt: DNA methyltransferase, Tet1: Ten-Eleven Translocation-1.

TET1 joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle dépendant de ses gènes cibles et de l'état de la chromatine associée {Wu *et al.*, 2011b} (Figure 14).

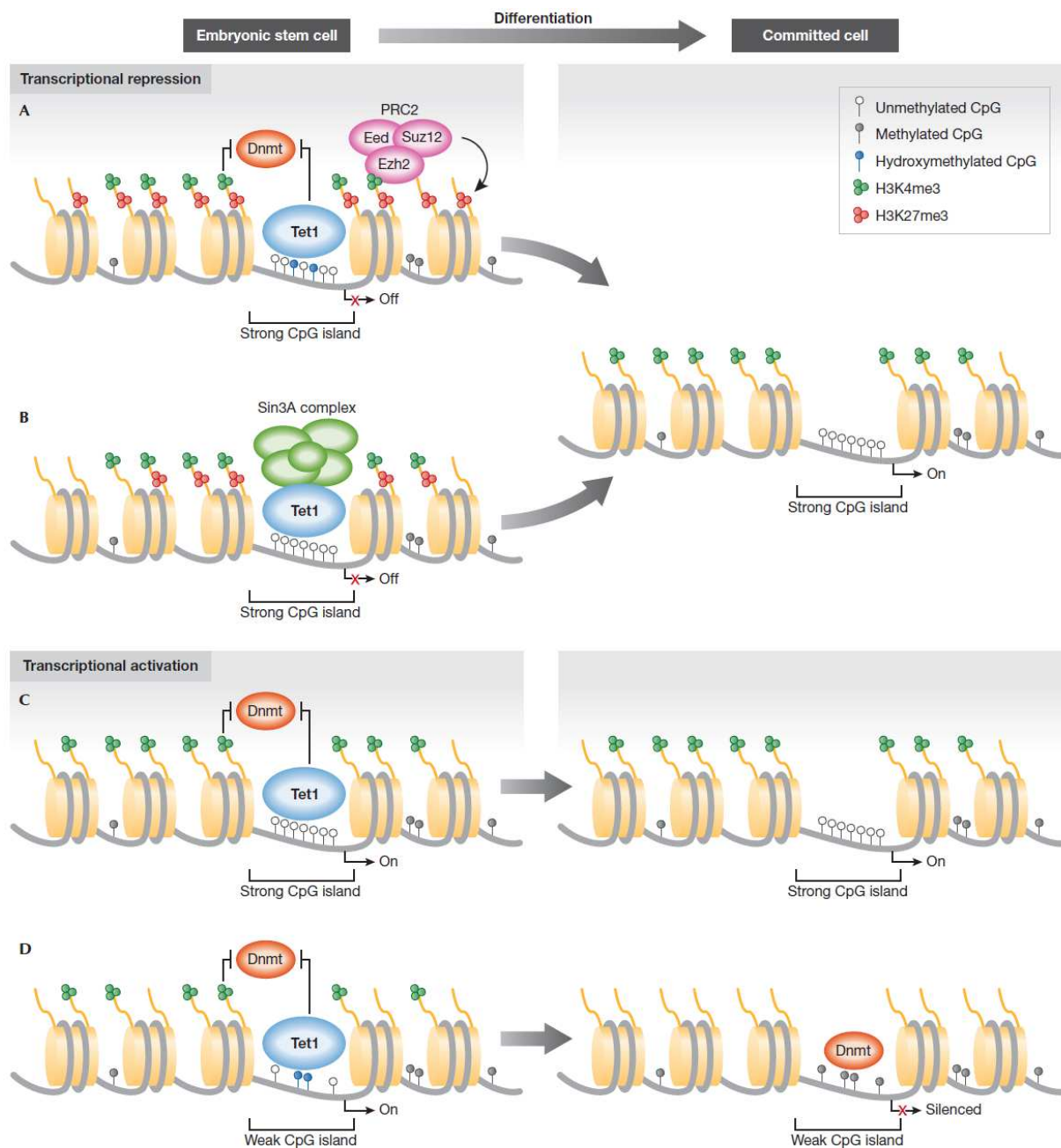


Figure 14 Rôle de TET1 dans la régulation de l'expression. {Williams *et al.*, 2011b}

La régulation de la transcription des cibles de TET1 dépend des gènes et du contexte épigénétique associé. Dans les cellules ES, la répression de l'expression de gènes, tels que des facteurs de transcription lignage-spécifiques, dépend du recrutement de complexes co-répresseurs comme Sin3A (B) ou PRC2, facilité par la réduction de la méthylation des CpG (A). Ces gènes sont déréprimés au cours de la différenciation (liée au moins en partie à la répression de l'expression de TET1). D'autres gènes, comme des facteurs essentiels pour la pluripotence des cellules ES sont maintenus dans un état permissif pour la transcription (C). La fonction de TET1 permet l'extinction programmée de l'expression de certains gènes (D). PRC: Polycomb Repressive Complex.

Des expériences de ChiP-seq avec ou sans réduction de l'expression de *TET1* par *knock-down* (ARN interférence) dans des cellules ES montrent que TET1 se lie aux promoteurs de gènes exprimés comme de gènes réprimés {Wu and Zhang, 2011}. La majorité des gènes cibles de TET1 sont des gènes bivalents, dé-réprimés en son absence {Williams *et al.*, 2011a}. L'expression de ces gènes est également contrôlée par le complexe Polycomb PRC2, dont le recrutement est favorisé par TET1 dans les cellules ES {Wu *et al.*, 2011a}. Les autres gènes cibles de TET1 sont des facteurs de pluripotence des cellules souches embryonnaires (comme *Nanog* ou *Tcl1*), fortement exprimés et associés aux marques activatrices H3K4me3 et H3K36me3 {Ficz *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a}. Ce contrôle de l'activité transcriptionnelle des gènes ne dépend pas strictement de l'activité enzymatique de TET1. Cette fonction s'observe également dans les cellules ES triple KO pour les gènes *Dnmt*, dépourvues de 5mC, le substrat des 5hmC {Williams *et al.*, 2011a}. Cette fonction repose notamment sur son interaction avec le complexe co-répresseur de classe I Sin3a (impliqué dans la déacétylation des histones) {Williams *et al.*, 2011a} (Figure 13). Globalement, TET1 se lie à moins de 50% des gènes associés aux marques 5hmC {Ficz *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a}.

* *Rôle de TET1 dans le maintien du potentiel de pluripotence*

L'activité des protéines de la famille TET serait essentielle pour le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaire et leur spécification de lignage lors de différenciation {Tahiliani *et al.*, 2009 ; Ito *et al.*, 2010}. Le niveau d'expression de TET1 (et de TET2, l'une de ses cibles transcriptionnelles) et le niveau global de 5hmC diminuent à mesure de l'engagement des cellules souches embryonnaires dans la différenciation {Koh *et al.*, 2011}. La réduction de l'expression de TET1 dans les cellules ES par *knock-down* conduit à une diminution du niveau global des 5hmC de 30 à 50% {Tahiliani *et al.*, 2009 ; Koh *et al.*, 2011} et une augmentation de la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices de certains facteurs de pluripotence, en particulier du gène *Nanog* (et dans une moindre mesure *Oct4* et *Sox2*) {Ito *et al.*, 2010}. Elle s'accompagne d'une différenciation des cellules souches biaisée aux dépens du lignage de l'ICM, liée à la surexpression de certains gènes importants pour la spécification du feuillet extra-embryonnaire trophoctoderme (*Cdx2*, *Eomes* et *Gata4*) {Ito *et al.*, 2010 ; Ficz *et al.*, 2011}. Le rôle de TET1 dans le maintien de l'identité souche des cellules embryonnaires est dépendant de la voie de signalisation LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*)/STAT3 : TET1 faciliterait le recrutement et la fixation de STAT3 à ses gènes cibles {Freudenberg *et al.*, 2011}.

Ce rôle clé de TET1 dans le maintien de l'identité souche des cellules ES est contesté par certaines études *in vitro* {Ficz *et al.*, 2011 ; Koh *et al.*, 2011 ; Williams *et al.*, 2011a} et *in vivo* {Dawlaty *et al.*, 2011}. Comme dans les expériences *in vitro*, les cellules ES murines dérivées de souris *Tet1*^{-/-} (viabiles et fertiles) conservent une morphologie type et expriment à un niveau normal les facteurs clés de la pluripotence {Dawlaty *et al.*, 2011}. Ces cellules sont capables d'assurer correctement le développement embryonnaire, malgré un léger biais de différenciation vers le trophoctoderme lié à la dérégulation de l'expression de gènes lignage-spécifiques (*Cdx2*, *Elf2*, *Lefty1*) {Dawlaty *et al.*, 2011}. Le niveau global des 5hmC dans ces cellules diminue de 35%, ce qui est également observé dans une moindre mesure *in vitro* {Koh *et al.*, 2011 ; Williams *et al.*, 2011a}. Ces conséquences modérées de la perte de *TET1* chez la souris seraient liées à une compensation fonctionnelle par TET2 *in vivo*.

C) Inactivation du gène *TET2* dans les hémopathies malignes

Le gène *TET1* est le premier gène de la famille à avoir été impliqué dans les hémopathies malignes. La protéine de fusion MLL/TET1 est la conséquence moléculaire de la translocation t(10;11)(q22;q23) {Ono *et al.*, 2002}. Ce remaniement chromosomique a été caractérisé dans de rares cas de leucémies aiguës adultes et rapporté dans certains cas de leucémies aiguës pédiatriques {Thirman *et al.*, 1993 ; Harrison *et al.*, 1999 ; Lorsbach *et al.*, 2003 ; Shih *et al.*, 2006 ; Burmeister *et al.*, 2009 ; Meyer *et al.*, 2009}. Aucune mutation de *TET1* n'a été décrite à ce jour dans les hémopathies malignes myéloïdes {Abdel-Wahab *et al.*, 2009}, mais des mutations de ce gène sont observées dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de type T {Kalender Atak *et al.*, 2012}. Le gène *TET3* situé sur le bras court du chromosome 2 (2p13.1), n'est impliqué dans aucun processus tumoral à ce jour {Abdel-Wahab *et al.*, 2009}.

1- Importance des mutations dans les hémopathies

Chez certains patients atteints de MDS ou d'AML, la région chromosomique 4q24 est impliquée dans les translocations t(3;4)(q26;q24), t(4;5)(q24;p16), t(4;7)(q24;q21) ou perdue dans la délétion del(4)(q23q24) {Viguié *et al.*, 2005}. Des analyses génétiques menées en 2009 par deux groupes indépendants ont conduit à l'identification d'altérations du gène *TET2* chez des patients atteints de MPN et de MDS {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009}. Des analyses d'échantillons de patients MPN présentant une expansion du compartiment de progéniteurs hématopoïétiques immatures CD34⁺ par CGH (*Comparative Genomic Hybridization*)-array et SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)-array ont permis d'identifier des délétions et des pertes d'hétérozygotie récurrentes de la région 4q24 {Delhommeau *et al.*, 2009}. La délétion d'un unique gène chez l'un des patients a conduit les auteurs à analyser la séquence codante du gène *TET2*, permettant l'identification de mutations acquises dans 10 à 20% des cas de MPN et MDS {Delhommeau *et al.*, 2009}. Des analyses similaires d'échantillons de MDS par SNP-array ont permis au groupe de Joop Jansen d'identifier des délétions et des pertes d'hétérozygotie impliquant la région chromosomique 4q {Langemeijer *et al.*, 2009}. Le séquençage de la région codante du gène *TET2* a conduit à l'identification de mutations dans 26% des cas de myélodysplasies {Langemeijer *et al.*, 2009}.

De nombreuses études ont ensuite été réalisées dans le but de déterminer la fréquence et la valeur pronostic des mutations de *TET2* dans les hémopathies malignes. L'analyse du locus 4q24 et de la séquence codante de ce gène ont permis de montrer que les délétions, les pertes d'hétérozygotie et les mutations de *TET2* sont des altérations acquises fréquentes dans l'ensemble des hémopathies malignes myéloïdes, ainsi que dans les proliférations lymphoïdes matures B et T {Abdel-Wahab *et al.*, 2009 ; Delhommeau *et al.*, 2009 ; Jankowska *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009 ; Tefferi *et al.*, 2009a ; Quivoron *et al.*, 2011}. Globalement, ~18% des patients présentent une mutation inactivatrice du gène *TET2* (Tableau III). Cet évènement génétique n'est pas associé à une forme particulière d'hémopathies malignes. L'incidence de ces mutations est la plus importante dans les lymphomes immuno-angioblastiques de type T (30%) {Couronné *et al.*, 2012}, les mastocytoses systémiques (30%) {Tefferi *et al.*, 2009c} et les CMML (45%) {Kosmider *et al.*, 2009b}. Elles sont absentes au cours de la phase chronique des CML mais peuvent survenir lors de la transformation blastique, dans 13% des cas {Makishima *et al.*, 2011 ; Roche-Lestienne *et al.*, 2011}. Elles sont observées dans ~10% des cas de MPN (~20% des myélofibroses) et ~20% des MDS et des AML *de novo* et secondaires (post-MPN ou -MDS) {Couronné *et al.*, 2010}. La présence de ces mutations n'a pas d'impact sur la réponse aux traitements dans les mastocytoses systémiques {Lim *et al.*, 2009}. Leur rôle pronostic n'est pas clairement établi à ce jour dans les MPN. Elles seraient associées à la transformation leucémique {Abdel-Wahab *et al.*, 2010}, mais ces résultats n'ont pas été confirmés {Couronné *et al.*, 2010}. Dans le cas des MDS, il n'existe pas de corrélation claire entre ces mutations et un effet sur la survie {Bejar *et al.*, 2011}. En revanche, les mutations de *TET2* seraient associées à un mauvais pronostic dans les AML *de novo* {Abdel-Wahab *et al.*, 2009}, en particulier celles de risque cytogénétique favorable (de caryotype normal, sans mutation *FLT3*-ITD associée) {Chou *et al.*, 2011 ; Metzeler *et al.*, 2011}.

Ces analyses ont également permis de définir l'association des mutations de *TET2* à d'autres évènements oncogéniques importants dans la pathogénèse des hémopathies malignes. Les mutations de *TET2* coexistent avec diverses anomalies génétiques : les mutations des gènes *EZH2*, *ASXL1* et *DNMT3A*, *JAK2*^{V617F} et *MPL*^{W515L} dans les MPN, *KIT*^{D816V} dans les mastocytoses systémiques, *NPM1*, *FLT3*-ITD, *N-RAS* et *PML/RARA* dans les AML {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009 ; Tefferi *et al.*, 2009c}. En revanche, les mutations de *TET2* sont mutuellement exclusives des mutations des gènes *IDH* {Figuerola *et al.*, 2010a}. Elles peuvent survenir avant ou après celles des gènes *JAK2* et *MPL* dans les MPN {Abdel-Wahab *et al.*, 2010 ; Beer *et al.*, 2010}. Environ 20 à 30% des patients présentent une inactivation bi-allélique de *TET2*, ce qui suggère un effet d'une inactivation hétérozygote chez ces patients (haplo-insuffisance) {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Moran-Crusio *et al.*, 2011}.

Tableau III Fréquence des mutations du gène TET2 dans les hémopathies myéloïdes.

Pathologie	Fréquence	Ratio	Réf	Pathologie	Fréquence	Ratio	Réf	
MPN (11,3%)	8%	27/354	(1)	MDS (19,6%)	21%	90/439	(8)	
	13%	30/227	(2)		12%	33/320	(9)	
	13%	27/203	(3)		24%	54/221	(10)	
	13%	25/199	(4)		26%	27/102	(11)	
	7%	4/55	(5)		23%	22/96	(12)	
	21%	9/43	(6)		15%	13/86	(13)	
PV (13,5%)	13%	13/100	(3)		19%	15/81	(3)	
	16%	14/89	(2)		19%	12/65	(14)	
	13%	9/71	(4)		32%	12/38	(15)	
	7%	1/14	(6)		43%	15/35	(16)	
ET (6,8%)	10%	8/80	(3)		6%	1/16	(17)	
	5%	3/57	(2)		14%	2/14	(18)	
	2%	1/43	(4)		AML post-MDS (19,6%)	20%	40/201	(19)
	8%	1/12	(6)			12%	4/35	(9)
MF (16,8%)	16%	13/81	(2)			15%	4/27	(20)
	17%	13/75	(4)			17%	2/14	(13)
	15%	10/68	(7)			43%	6/14	(21)
	29%	4/14	(3)			33%	3/10	(16)
AML post-MPN (21,9%)	25%	16/63	(1)	CMML (44,2%)	50%	44/88	(19)	
	17%	3/18	(6)		51%	41/81	(26)	
	17%	2/12	(2)		44%	36/81	(27)	
	18%	2/11	(7)		42%	29/69	(1)	
20%	2/10	(4)	36%		19/53	(28)		
AML de novo (14,3%)	8%	40/502	(22)		44%	23/52	(21)	
	13%	64/486	(23)		54%	23/43	(16)	
	23%	95/418	(24)		33%	13/39	(7)	
	17%	19/111	(25)		11%	4/35	(9)	
	12%	11/91	(1)		53%	16/30	(29)	
	19%	6/32	(11)	63%	15/24	(30)		
	17%	2/12	(16)					

MPN (1): {Abdel-Wahab *et al.*, 2009}, (2): {Tefferi *et al.*, 2009a}, (3): {Delhommeau *et al.*, 2009}, (4): {Hussein *et al.*, 2010}, (5): {Carbuccia *et al.*, 2009}, (6): {Saint-Martin *et al.*, 2009}, (7): {Abdel-Wahab *et al.*, 2011b}, MDS (8): {Bejar *et al.*, 2011}, (9): {Smith *et al.*, 2010}, (10): {Damm *et al.*, 2012b}, (11): {Langemeijer *et al.*, 2009}, (12): {Kosmider *et al.*, 2009a}, (13): {Ytzykson *et al.*, 2011}, (14): {Rocquain *et al.*, 2010}, (15): {Voso *et al.*, 2011}, (16): {Ko *et al.*, 2010}, (17): {Tefferi *et al.*, 2009b}, (18): {Jankowska *et al.*, 2009}, (19): {Kosmider *et al.*, 2009b}, (20): {Konstandin *et al.*, 2011}, (21): {Jankowska *et al.*, 2011}, AML (22): {Patel *et al.*, 2012}, (23): {Chou *et al.*, 2011}, (24): {Metzeler *et al.*, 2011}, (25): {Nibourel *et al.*, 2010}, CMML (26): {Kohlmann *et al.*, 2010}, (27): {Grossmann *et al.*, 2011}, (28): {Gelsi-Boyer *et al.*, 2010}, (29): {Yamazaki *et al.*, 2012}, (30): {Pérez *et al.*, 2011}.

2- Conséquences fonctionnelles des mutations de *TET2*

Les mutations décrites se situent sur l'ensemble de la séquence codante du gène et sont inactivatrices. Ce sont des mutations tronquantes (insertions et délétions de petite taille entraînant un décalage du cadre de lecture et mutations ponctuelles non-sens à l'origine d'un codon stop prématuré) et des mutations faux-sens affectant certains résidus conservés essentiels pour l'activité enzymatique de la protéine. Des mutations au niveau de sites d'épissage sont moins fréquemment décrites {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009}.

Ces mutations acquises peuvent être associée à la délétion de l'autre allèle dans le cas d'une inactivation hémizygotique chez certains patients {Delhommeau *et al.*, 2009}. Elles conduisent à la perte de la fonction de la protéine TET2 ou à une réduction importante de son activité, ce qui suggère un rôle suppresseur de tumeur dans les hémopathies malignes {Ko *et al.*, 2010}. La fréquence des mutations de *TET2* augmente avec l'âge des patients. Elles sont associées à une augmentation du compte de globules blancs (leucocytose) et en particulier à une monocytose {Delhommeau *et al.*, 2009}.

a. Méthylation et hydroxyméthylation de l'ADN

Les mutations perte-de-fonction observées dans les hémopathies malignes altèrent l'activité catalytique de la protéine TET2 *in vitro* (réduction de la production de 5hmC) et *in vivo* (diminution du niveau de 5hmC dans l'ADN) {Ko *et al.*, 2010}. Le niveau des 5hmC dans l'ADN génomique de cellules de patients mutés pour *TET2* est diminué en conséquence dans les AML {Konstandin *et al.*, 2011}, les CMML {Ko *et al.*, 2010} et les MPN {Pronier *et al.*, 2011a}, en comparaison avec l'ADN contrôlé de cellules d'individus sains ou de patients non mutés pour *TET2*.

Les 5hmC étant une étape intermédiaire dans la déméthylation de l'ADN, l'altération de la fonction de TET2 devrait conduire à une augmentation de la méthylation de l'ADN. Des cellules blastiques de patients AML mutés pour *TET2* présentent effectivement une hyperméthylation des régions différenciellement méthylées du génome, en comparaison avec l'ADN d'individus sains {Figuerola *et al.*, 2010a}. Ce phénotype, également observé chez des patients CMML mutés pour *TET2* (en comparaison avec les patients non mutés), serait lié à l'augmentation de la méthylation dans certaines régions génomiques, en dehors des régions promotrices {Yamazaki *et al.*, 2012}. Les mutations des gènes *IDH* conduisent également à une hyperméthylation de l'ADN dans les échantillons blastiques {Figuerola *et al.*, 2010a}.

b. Rôle des mutations des gènes *IDH1* et *IDH2*

Les gènes *IDH* (*Isocitrate Dehydrogenase*)-1 et *IDH2* codent pour des enzymes homodimériques ubiquitaires NADP⁺-dépendantes permettant la conversion de l'isocitrate en 2-oxoglutarate dans le cycle de Krebs {Reitman and Yan, 2010}. *IDH1* est localisée dans le cytoplasme (et les péroxysomes) et *IDH2* est située à la mitochondrie des cellules eucaryotes. Ces enzymes jouent un rôle majeur dans la régulation du cycle de Krebs et dans la protection contre le stress oxydatif. Des mutations faux-sens sont décrites dans plus de 70% des cas de glioblastomes secondaires {Parsons *et al.*, 2008 ; Yan *et al.*, 2009} et moins fréquemment dans d'autres tumeurs « solides » {Shibata *et al.*, 2011}. Ces mutations hétérozygotes sont mutuellement exclusives et ciblent des résidus arginine importants pour l'activité catalytique : *IDH1R132* (un résidu important pour la liaison de l'enzyme au substrat, fonctionnellement équivalent au codon *IDH2R172*), *IDH2R140* et *IDH2R172*.

Dans les hémopathies malignes, les mêmes mutations récurrentes *IDH1*^{R132}, *IDH2*^{R140} et *IDH2*^{R172} ont été identifiées dans les AML *de novo* et secondaires {Mardis *et al.*, 2009 ; Ward *et al.*, 2010} et dans de rares cas de MDS {Kosmider *et al.*, 2010 ; Thol *et al.*, 2010}. La mutation *IDH1*^{R132} est associée aux AML à caryotype normal et aux trisomie 8 et 10 {Mardis *et al.*, 2009} ainsi qu'aux mutations des gènes *FLT3-ITD*, *NPM1c* et *RUNX1* {Chou *et al.*, 2010}. Les mutations du gène *IDH2* sont plus les fréquentes dans les hémopathies malignes. Elles sont associées à la transformation blastique des MPN {Green and Beer, 2010 ; Tefferi *et al.*, 2012} : ce gène est rarement muté au cours de la phase chronique, contrairement à la phase blastique {Abdel-Wahab *et al.*, 2010 ; Tefferi *et al.*, 2010}. Des mutations du gène *IDH2* sont également décrites dans 20% des lymphomes immuno-angioblastiques de type T (AITL) {Cairns *et al.*, 2012}.

Les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* sont toujours observées à l'état hétérozygote et confèrent aux enzymes mutantes une activité néomorphique. Cette nouvelle fonction catalytique consiste en une réduction NADPH-dépendante du 2-oxoglutarate en *D*-2-hydroxyglutarate (2-HG) {Dang *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2009}. La quantité de cet oncométabolite présent à l'état de trace dans les cellules est augmentée significativement dans des cellules blastiques primaires mutées pour *IDH1* ou *IDH2* ou dans des lignées cellulaires exprimant le mutant *IDH1R132* {Gross *et al.*, 2010 ; Ward *et al.*, 2010}. L'accumulation de 2-HG inhibe la fonction des enzymes dépendantes du 2-oxoglutarate, comme les histone déméthylases de la famille Jumonji (LSD1 et UTX, par exemple) et les dioxygénases de la famille TET {Figuroa *et al.*, 2010a ; Xu *et al.*, 2011a}.

c. Auto-renouvellement des HSC et myélopoïèse

La fréquence élevée des mutations de *TET2* dans diverses hémopathies malignes suggère que l'altération de sa fonction est importante pour la mise en place ou le maintien d'une hématopoïèse clonale dans l'ensemble des pathologies myéloïdes et lymphoïdes {Levine and Carroll, 2009 ; Mullighan, 2009}. Des expériences de xélogreffes de cellules de patients MPN menées par le groupe de William Vainchenker ont permis de montrer que les cellules progénitrices $CD34^+ JAK2^{V617F}$ mutées pour *TET2* sont capables de reconstituer l'hématopoïèse plus efficacement que des cellules $JAK2^{V617F}$ sauvages pour *TET2* dans des souris immunodéficientes NOD-SCID {Delhommeau *et al.*, 2009}. Ces résultats montrent que les mutations de *TET2* sont présentes dans le compartiment des cellules souches et progénitrices et qu'elles leur confèrent un avantage de croissance {Delhommeau *et al.*, 2009 ; Langemeijer *et al.*, 2009}.

Ce modèle montre par ailleurs que l'inactivation de *TET2* conduit à un avantage de différenciation des cellules progénitrices immatures vers les lignées myéloïdes aux dépens des lignées lymphoïdes {Delhommeau *et al.*, 2009}. Des résultats obtenus *in vitro* ont permis de confirmer ce phénotype au cours de la myélopoïèse. La réduction de l'expression de *TET2* par ARN interférence montre que la perte de fonction de ce gène dans les HSPC est à l'origine d'un excès de cellules immatures et qu'elle favoriserait l'expansion et la différenciation des cellules monocytaires en présence de G-CSF (facteur de croissance stimulant la différenciation granulocytaire) et de GM-CSF (facteur de différenciation granulo-monocytaire) {Ko *et al.*, 2010}. Chez l'Homme, l'infection de cellules hématopoïétiques immatures $CD34^+$ par un lentivirus exprimant un shRNA dirigé contre *TET2* conduit à une altération de la différenciation de ces cellules, biaisée de façon transitoire vers la lignée myélo-monocytaire, aux dépens de la lignée érythrocytaire et des lignées lymphoïdes {Pronier *et al.*, 2011a}.

D'autres résultats obtenus *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle du contrôle de la méthylation dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules et de leur engagement dans la différenciation hématopoïétique. L'infection de cellules progénitrices par un lentivirus exprimant le mutant $IDH2^{R140}$ ou un shRNA dirigé contre le transcrite *TET2* conduisent à l'expansion de cellules immatures $c\text{-Kit}^+$, capables de se maintenir en culture *in vitro* pendant plusieurs mois {Figuerola *et al.*, 2010a}. Ces résultats montrent que la perte de fonction de *TET2* dans les cellules progénitrices augmente leur auto-renouvellement et favorise leur engagement dans la différenciation myéloïde, en particulier vers la lignée monocyttaire {Moran-Crusio *et al.*, 2011}.

BUT DU TRAVAIL

La fréquence importante des mutations de *TET2* dans les hémopathies malignes suggère que ce gène joue un rôle déterminant dans l'homéostasie du système hématopoïétique. Les mutations décrites conduisent à une perte de la fonction ou à une réduction de l'activité enzymatique de la dioxygénase, ce qui suggère un rôle suppresseur de tumeur. Afin de comprendre son rôle au cours de l'hématopoïèse normale et pathologique, j'ai analysé les conséquences fonctionnelles de l'inactivation du gène *Tet2* dans le système hématopoïétique chez la souris. Pour ce faire, j'ai étudié deux modèles animaux déficients pour ce gène afin de déterminer (i) si ce gène est bien un gène suppresseur de tumeur dans les hémopathies malignes myéloïdes, et (ii) son rôle dans la biologie des cellules souches adultes et dans le contrôle de la différenciation hématopoïétique.

A cours de mon travail de thèse, j'ai utilisé une lignée murine permettant l'invalidation somatique conditionnelle de ce gène (grâce au système *Cre/LoxP*). Cette lignée a été établie au laboratoire en collaboration avec la Clinique de la Souris de Strasbourg (ICS) et la plateforme de Recombinaison Homologue de l'Institut Cochin. Nous avons choisi de croiser ces animaux avec la lignée transgénique *Mx1-Cre* dans laquelle l'expression de la recombinaise Cre dans les cellules hématopoïétiques est sous contrôle du promoteur murin *Mx1* inductible par les interférons {[Kühn et al., 1995](#)}. Le phénotype des animaux invalidés pour *Tet2* est similaire à celui obtenu dans la seconde lignée que j'ai analysée. Ces autres souris ont été générées à partir de cellules souches embryonnaire murines, invalidées pour le gène *Tet2* grâce à la technique de mutagenèse insertionnelle (ou « *gene-trap* ») (pour revue {[Stanford et al., 2001](#)}). (**Article 1**)

RESULTATS

Article 1

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

Afin de mieux comprendre le rôle de *TET2* dans l'hématopoïèse normale et pathologique, deux modèles murins d'inactivation de *Tet2* ont été analysés : un modèle conditionnel qui permet l'inactivation du gène chez l'adulte (système *Cre/LoxP*), et un modèle d'inactivation insertionnelle (« *gene-trap* »), entraînant une diminution de l'expression du gène dès les premiers stades du développement embryonnaire (allèle hypomorphe). Dans ces deux modèles, les souris sont viables et présentent un phénotype similaire.

L'inactivation de *Tet2* entraîne une baisse significative du niveau global des 5hmC dans les cellules hématopoïétiques immatures. La perte de *Tet2* n'est pas compensée par l'expression des autres dioxygénases de la famille *Tet* (Figure 1 – Article). L'analyse du système hématopoïétique des souris *Tet2*^{-/-} montre une amplification progressive des populations immatures (cellules souches et progéniteurs multipotents) (Figure 2 – Article). Des anomalies de différenciation des lignées myéloïdes myélo-monocytaire (*Mac1*⁺*Gr1*⁺), érythrocytaire (*CD71*⁺*Ter119*⁺) et mégacaryocytaire (*CD41*⁺*CD42*⁺) sont observées chez ces animaux. La lymphopoïèse est également altérée, avec une augmentation des précurseurs lymphoïdes T (population des précurseurs « DN1 », d'immunophénotype *CD4*⁺*CD8*⁺*CD44*⁺*CD25*⁻) et l'accumulation progressive d'une population B mature anormale, de phénotype *CD19*⁺*B220*^{int}*CD43*⁺*IL-7Rα*⁺ (Figure 3 – Article).

La reconstitution hématopoïétique d'animaux receveurs syngéniques irradiés et greffés avec de la moelle osseuse de souris invalidées pour *Tet2* montre que ces anomalies de différenciation sont intrinsèques (les cellules greffées reproduisent l'amplification du compartiment immature et les anomalies de différenciation observées). Cette propriété se vérifie également par des expériences de culture *in vitro* de cellules hématopoïétiques immatures (isolées sur le phénotype *Lin*⁻*Sca-1*⁺*c-Kit*⁺), capable de maintenir un niveau d'expression élevé des marqueurs immatures *c-Kit* et *Sca-1* au cours des premières semaines de culture (augmentation des capacités d'auto-renouvellement). Ces expériences de greffe de moelle dans des souris receveuses montrent que les cellules déficientes pour *Tet2* présentent un avantage compétitif par rapport aux cellules sauvages, aussi bien à partir de cellules médullaires totales que de cellules souches et progénitrices LSK (Figure 2 – Article).

Une fraction des animaux âgés invalidés pour *Tet2* développe à partir de l'âge de six mois des hémopathies malignes ressemblant à la leucémie myélo-monocytaire chronique humaine, caractérisée par une monocytose persistante dans le sang, une splénomégalie, une dysplasie de plusieurs lignées myéloïdes et moins de 20% de blastes dans la moelle osseuse ou le sang. Des anomalies équivalentes de l'hématopoïèse sont également observées dans les souris hétérozygotes (amplification des cellules immatures, dysplasie myéloïde et développement d'une maladie de type CMML au cours du temps), bien qu'elles soient modérées et qu'elles apparaissent avec une latence plus importante (Figure 4 – Article).

Ce travail a permis de montrer qu'une dérégulation de l'activité de TET2 entraîne des anomalies précoces de l'hématopoïèse chez la souris. Cependant, bien que la perte de *TET2* soit suffisante pour initier une transformation, la latence de la maladie suggère que cette anomalie coopère probablement avec d'autres événements génétiques dans le processus de tumorigénèse. *TET2* est un gène suppresseur de tumeur essentiel au contrôle de l'homéostasie du système hématopoïétique et l'haplo-insuffisance de ce gène participe également au processus de transformation des progéniteurs dans les hémopathies malignes.

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} Oriane 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,*}

¹INSERM, U985, Villejuif 94805, France

²Université Paris-Sud, Orsay 91400, France

³Institut Gustave Roussy, Villejuif 94805, France

⁴INSERM, U1009, Villejuif 94805, France

⁵Hôpital Henri Mondor, Créteil 94000, France

⁶Plateforme 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

⁷Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Saint Antoine, Paris 75005, France

⁸A 3963, Université Paris VII, Hôpital Saint-Louis, Paris 75010, France

⁹INSERM, U830, Institut Curie, Paris 75005, France

¹⁰Department of Medicine, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA

¹¹INSERM, U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen 76038, France

¹²Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, APHP; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6; INSERM U872, Paris 75005, France

¹³Assistance 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

¹⁴These authors contributed equally to this work

¹⁵These 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- β Gal 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-1⁺c-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

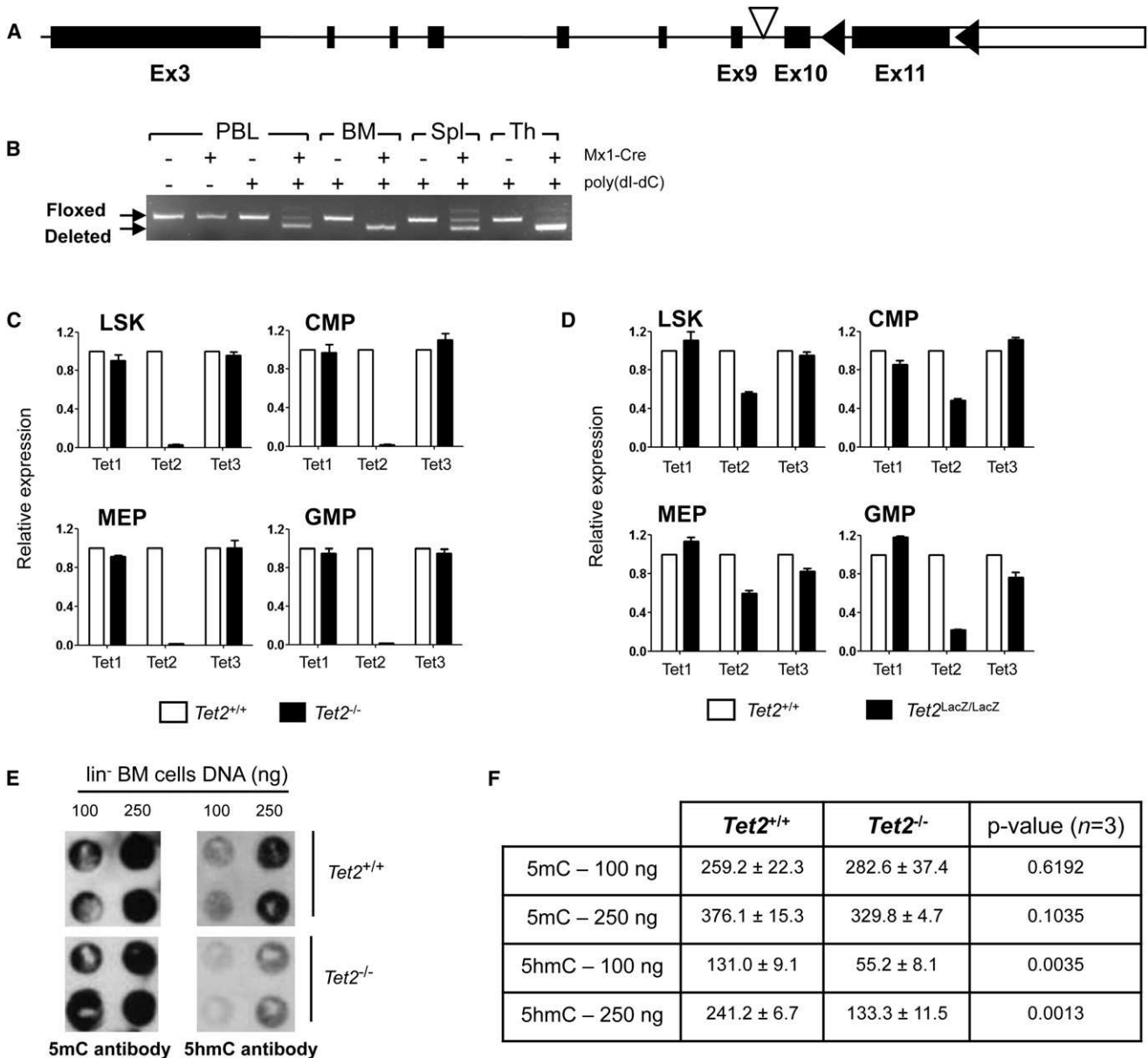


Figure 1. Description of the Two *Tet2* Inactivation Mouse Models

(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 *Abi1* 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.

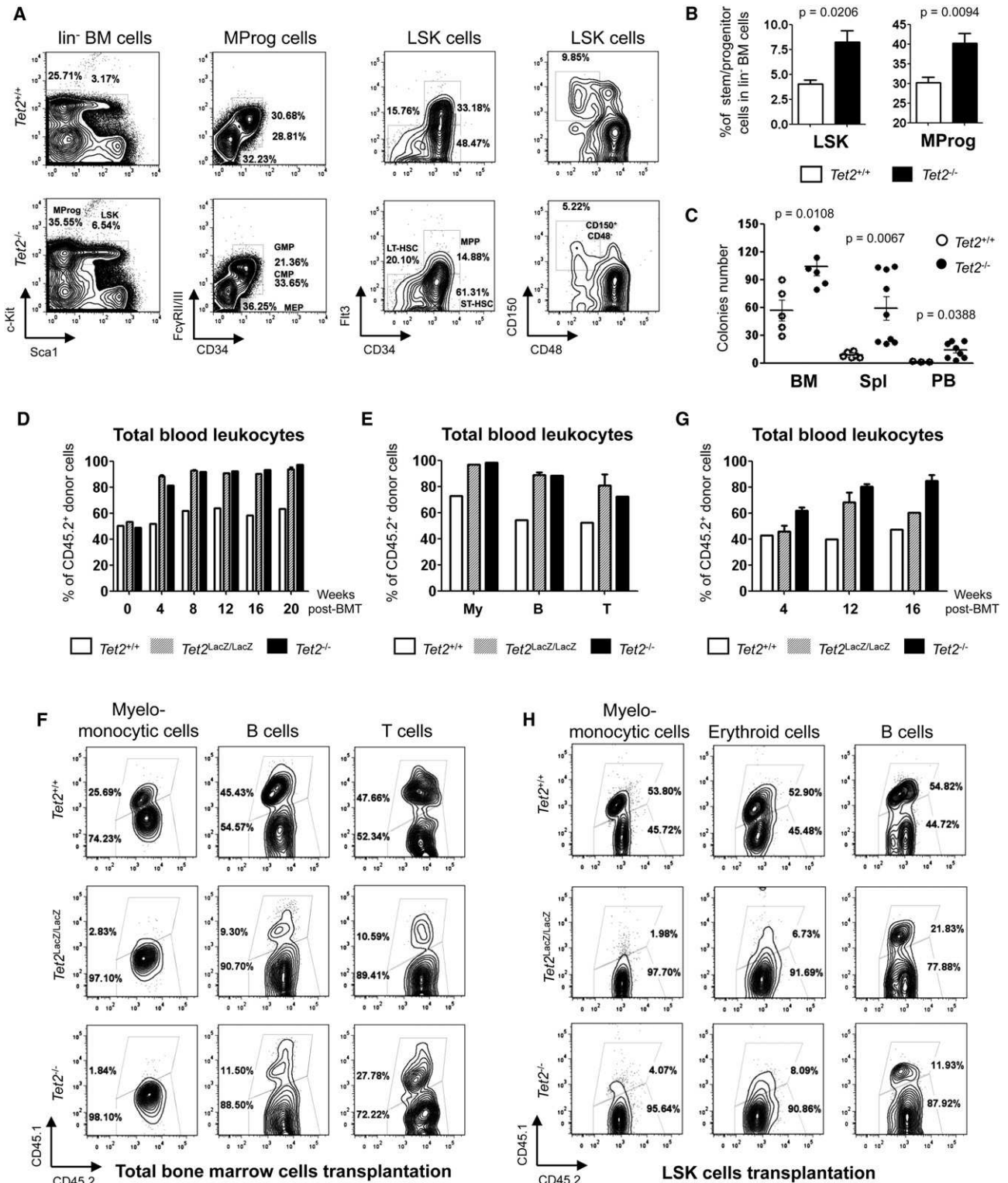


Figure 2. Tet2 Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Compartments Homeostasis

(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 \pm 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⁺Gr1⁻), 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⁺Gr1⁺ myelomonocytic cells; CD71⁺ erythroid cells; CD19⁺B220⁺ B cells).

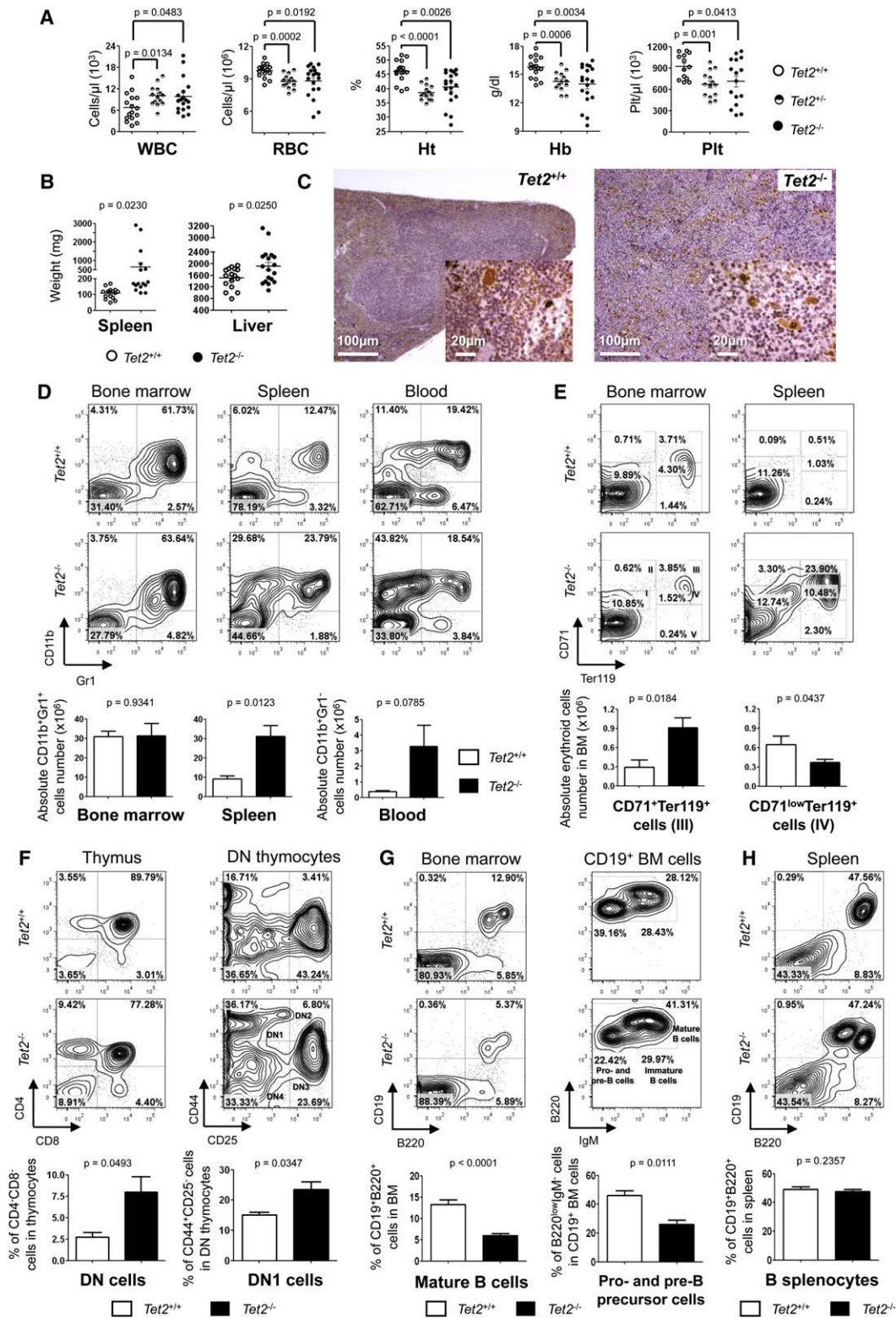


Figure 3. Tet2 Inactivation Results in Aberrant Myeloid and Lymphoid Maturation

(A) White blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hematocrit (Ht), hemoglobin (Hb), and platelet (Pit) 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; Vigué 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.

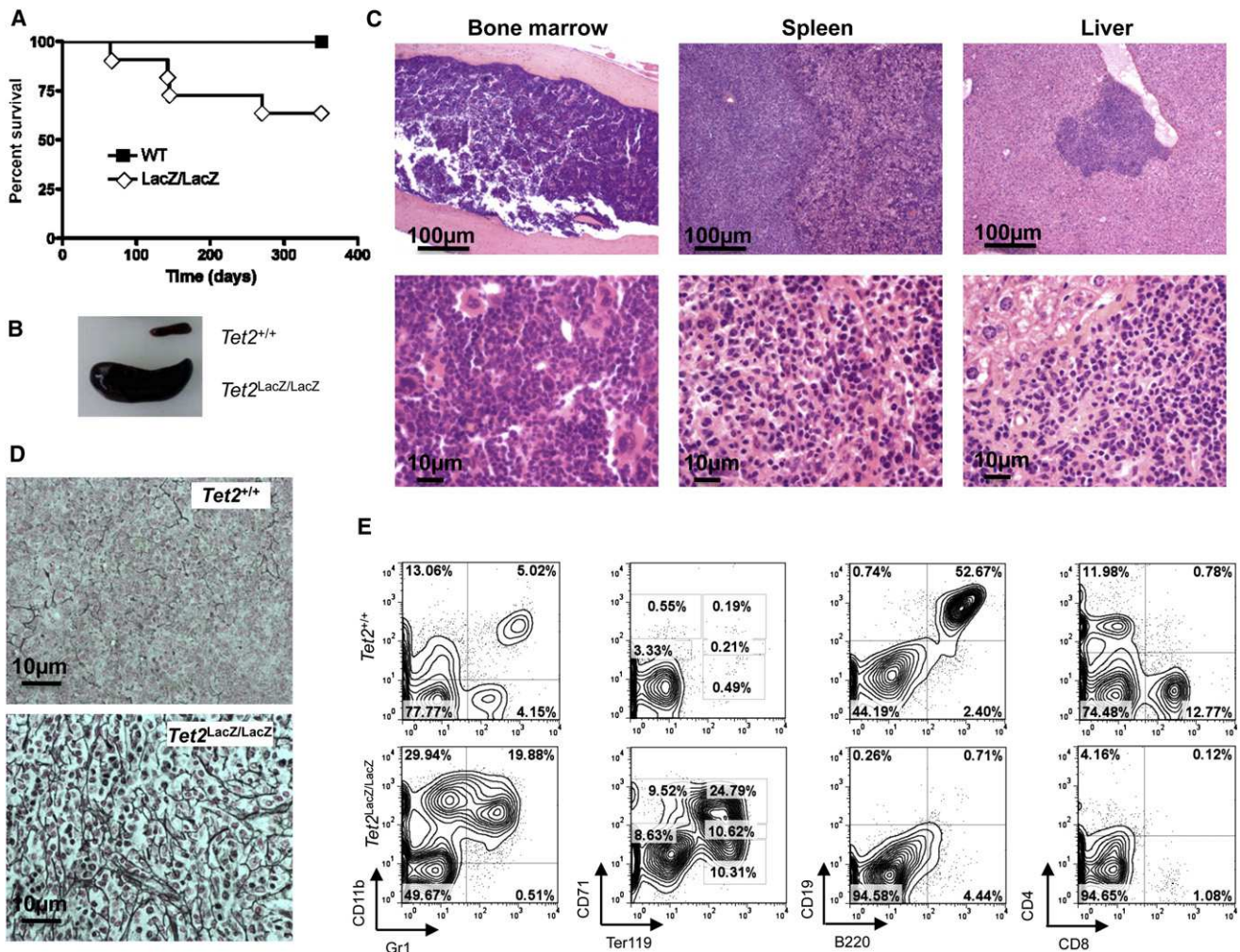


Figure 4. *Tet2* Inactivation Induces Fatal Hematopoietic Malignancies

(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/mm³), anemia (1.76×10^6 RBC/mm³, 12.6% hematocrit, and 4.7 g hemoglobin/dl), thrombocytopenia (189×10^3 platelets/mm³) 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 lymphoma; 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,

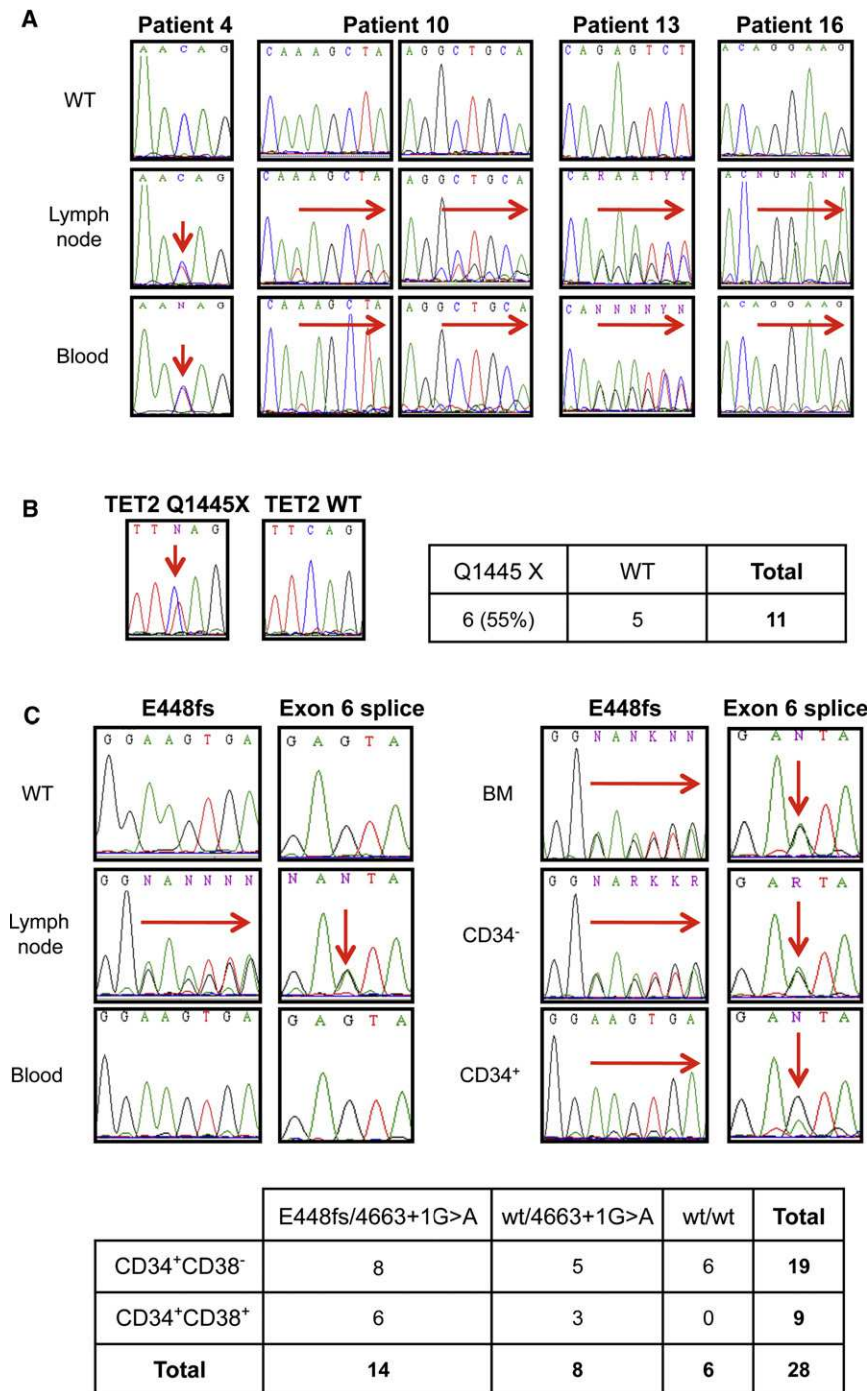


Figure 5. TET2 Mutation in Human T-Lymphoma Samples

(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.

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

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

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

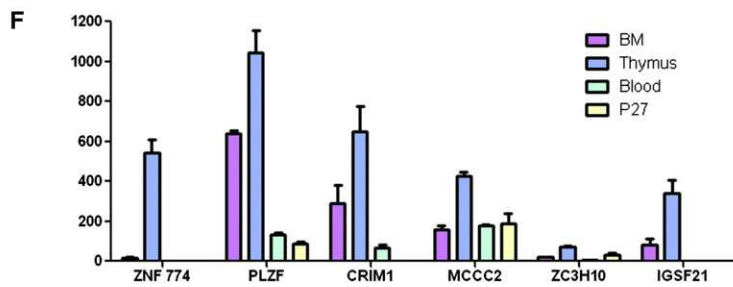
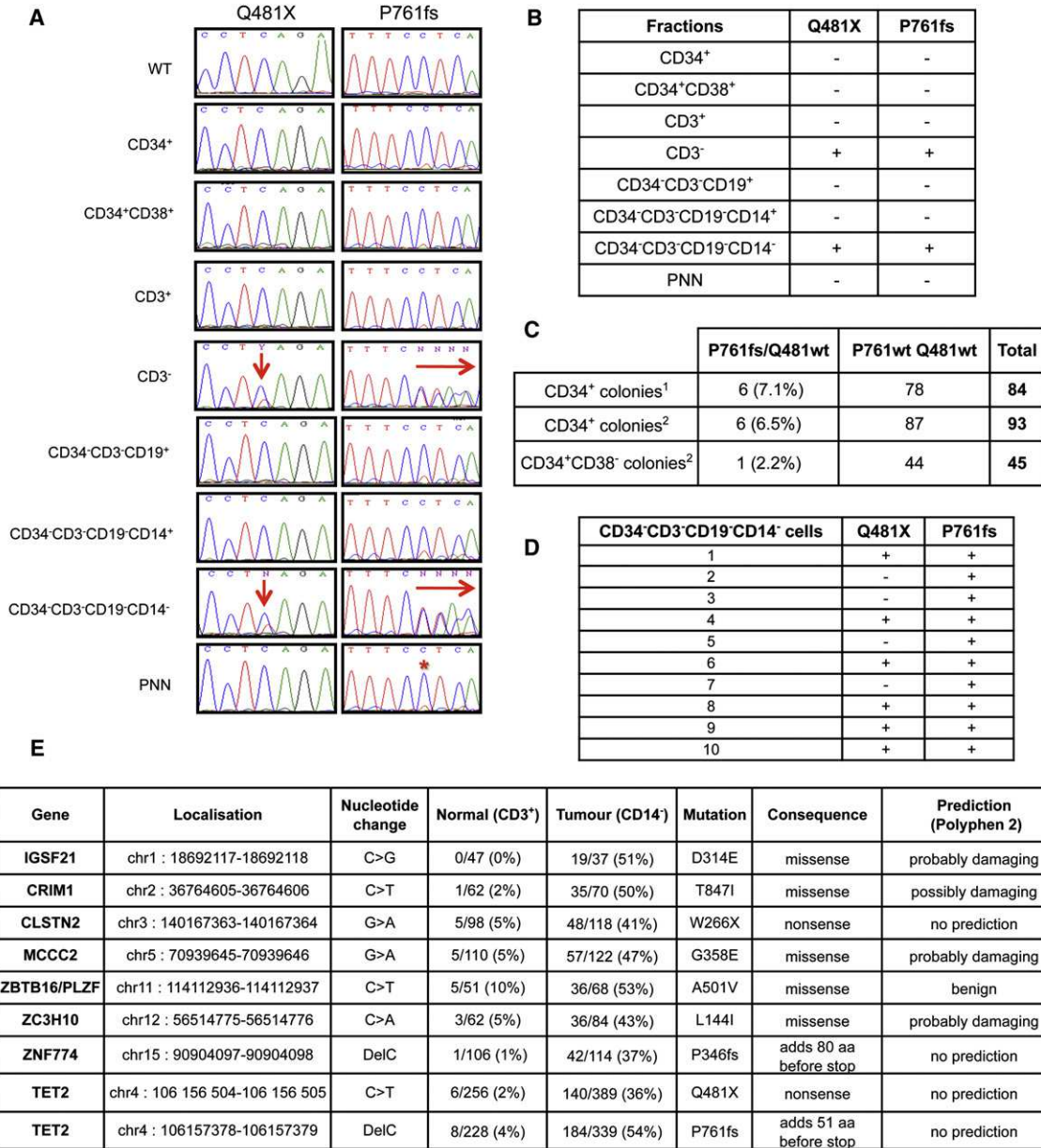


Figure 6. TET2 and Other Acquired Mutations Are Found in Hematopoietic Progenitors

(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*^{Lox/Lox} 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'-GGCCTTCTGTAGCCAGC-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'-TAGACAAGCCCTGCAAGCAA-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'-TAGACAAGCCCTGCAAGCAA-3' and 5'-GTGTCCACGGTTACACACG-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 × 10⁶ 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-Salpêtrière, 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 FACSCantoll 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 (5×10^3), 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; *Abi1*, Mm00802038). *Tet2* (exon 3–4) transcript were detected using the following primers; Primer1: 5'-agaatcagatctctggtgaaacaa-3', Primer2: 5'-cctagatgggtataataaggagctcat-3', Probe: 5' FAM-tctggattgcatctctcacattggccat-3'TAM. *Tet2-LacZ* fusion transcript was detected using the following primers and probe; Primer1 (*Tet2* exon 9): 5'-ccccagagaccagcagaaca-3', Primer2 (*LacZ*): 5'-tgcgttctctctgttttc-3', Probe: 5'FAM-cctgggaccactgtactgccattgg-3'TAM. The expression level of

each gene was assessed by qRT-PCR with an ABI PRISM 7500 and calculated following the $\Delta\Delta C_t$ method; each sample was analyzed in triplicate and normalized with *Abi1* and *GusB* expression (Applied Biosystems Mm00802038_g1 and Mm03003537_s1, respectively).

Statistical and Quantification Analyses

Results are expressed as mean values \pm 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., Manshour, 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., Penhler, 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., Afafe, 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., Racœur, 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-PDGFR α 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.

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, Orienne 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

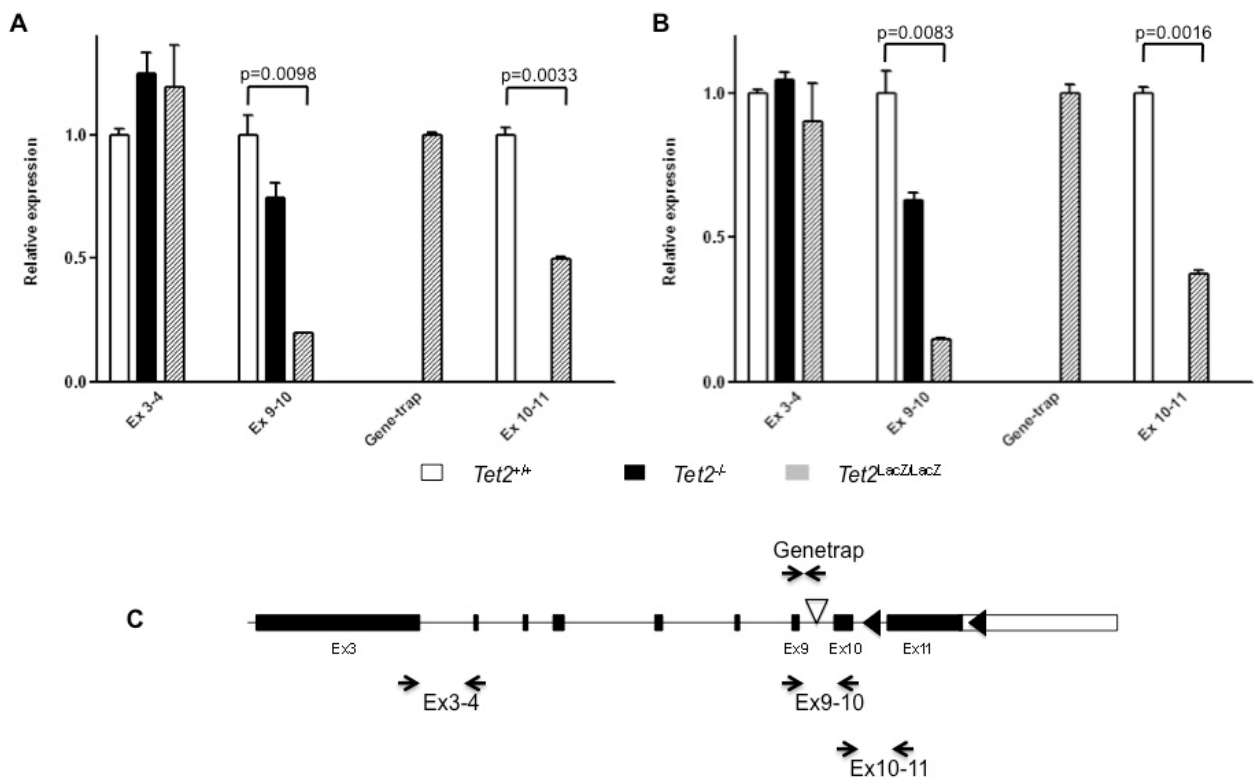
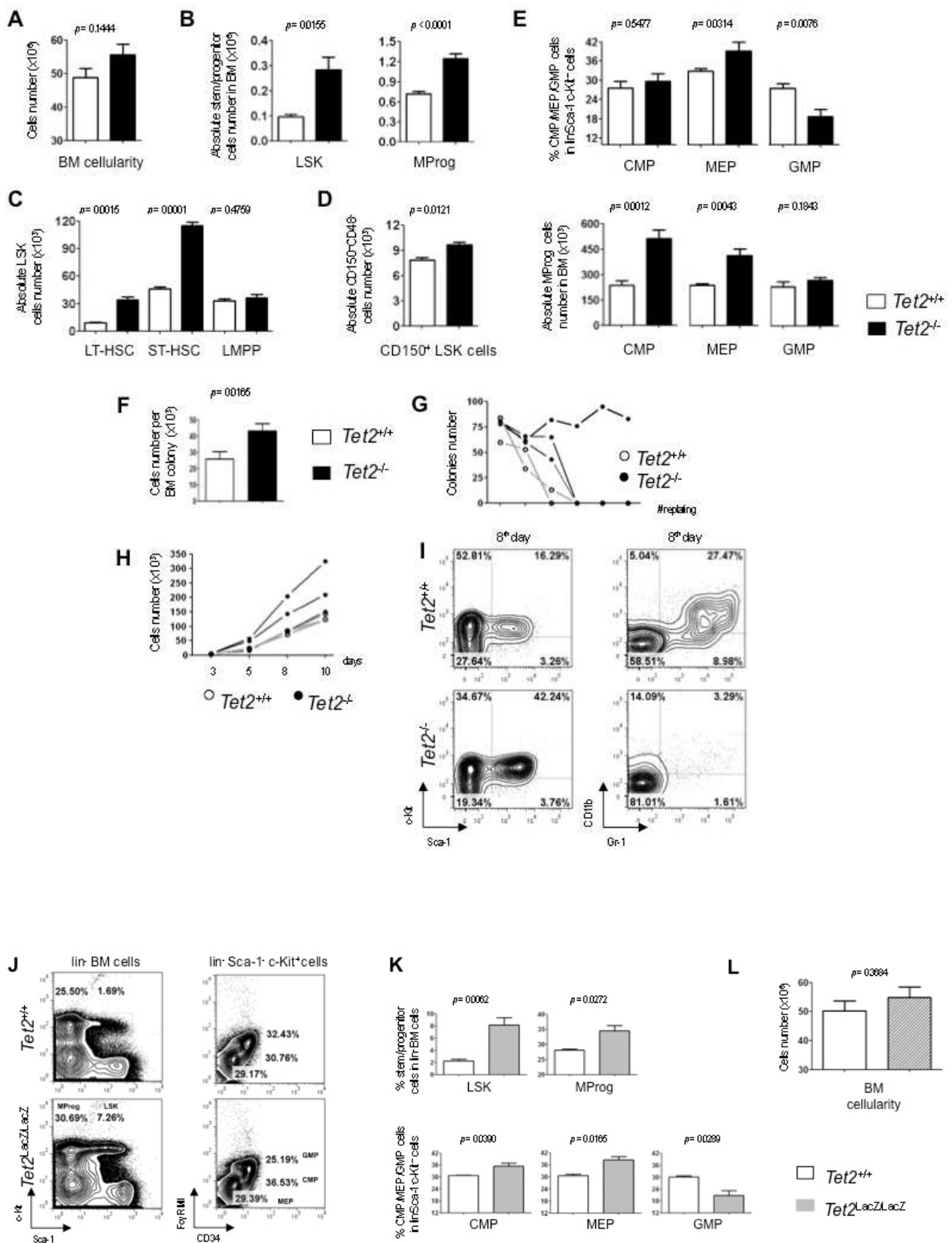


Figure S1: Quantitative RT-PCR analysis of *Tet2*^{LacZ} allele (related to Figure 1).

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*- β Gal fusion. Results are normalized with respect to *GUSB* (A: left panel) and *Ab11* 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.



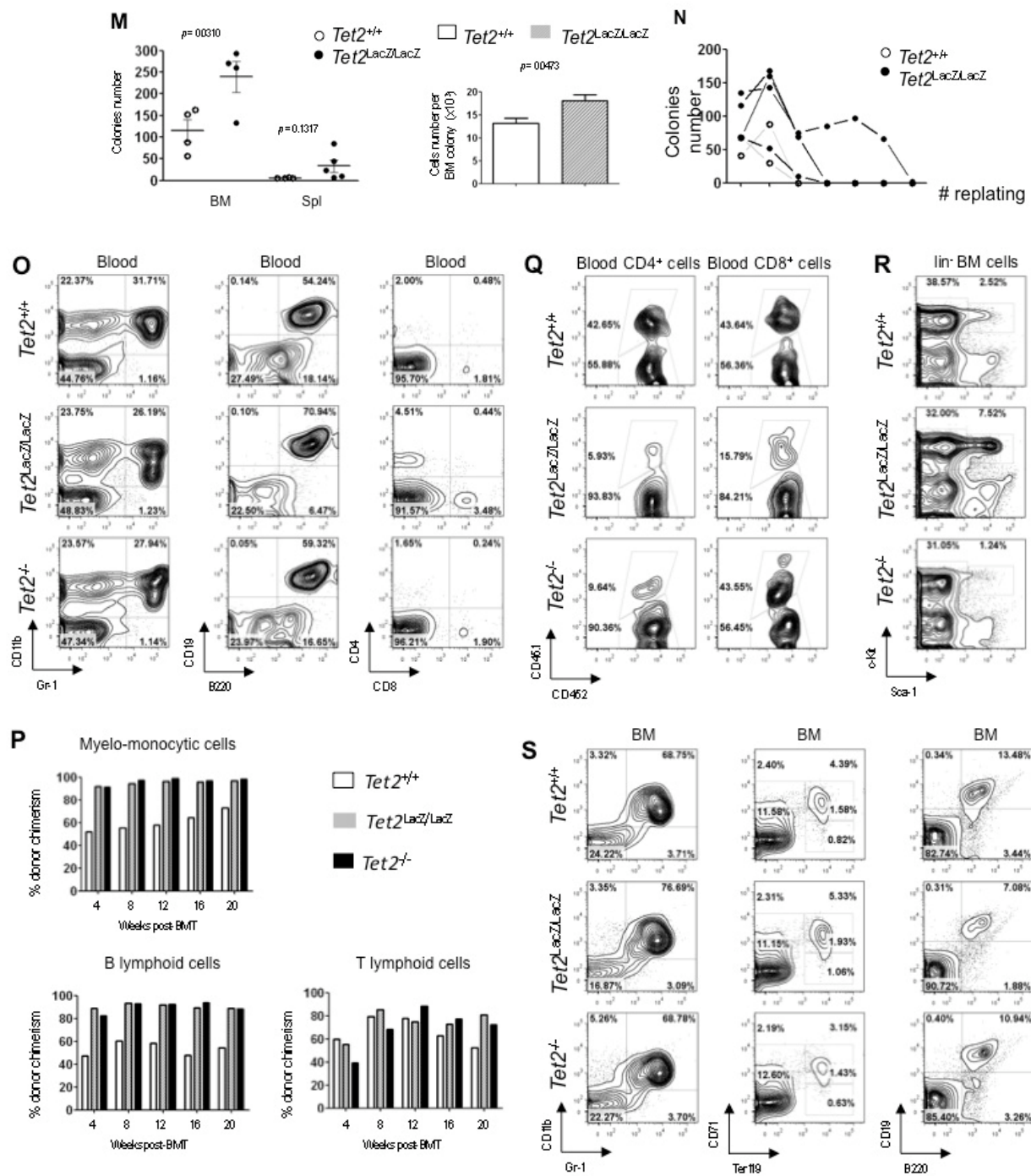


Figure S2: Stem and progenitor cells analyses (related to Figure 2).

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 \pm 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 \pm 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, $\text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^+ \text{Flt3}^+$). Data shown are mean cells number \pm SEM.

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

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

G: Clonogenic activity of bone marrow cells of $\text{Tet2}^{+/+}$ and $\text{Tet2}^{-/-}$ mice ($n=3$ per genotype) 4 months post-induction in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored and 5×10^4 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 $\text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^+$ cells are maintained more efficiently in $\text{Tet2}^{-/-}$ cell cultures while differentiation toward the myeloid $\text{CD11b}^+ \text{Gr1}^+$ lineage is inhibited compared to $\text{Tet2}^{+/+}$ cell cultures.

J: Representative flow cytometrical analysis of hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow of $\text{Tet2}^{\text{LacZ/LacZ}}$ 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 $\text{lin}^- \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+$ 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 $\text{Tet2}^{\text{LacZ/LacZ}}$ ($n=8$; striped bars) and wild-type control ($n=4$; white bars) 4-8 month-old mice. Data are presented as mean \pm 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 $\text{Tet2}^{\text{LacZ/LacZ}}$ ($n=8$) and control ($n=4$) 4-8 month-old animals presented as mean \pm SEM.

M: Clonogenic activity of bone marrow (BM; 5×10^4) and spleen (Spl; 5×10^4) cells of $\text{Tet2}^{\text{LacZ/LacZ}}$ ($n=4-5$; 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 \pm SEM (left panel) and average number of cells per colony (right panel).

N: Clonogenic activity of $\text{lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$ LSK flow-sorted cells of $\text{Tet2}^{\text{LacZ/LacZ}}$ ($n=4$) and wild-type ($n=2$) 4-month-old mice in methylcellulose M3434 medium. Colonies were scored and 5×10^4 cells were replated in new M3434 medium every 7 days.

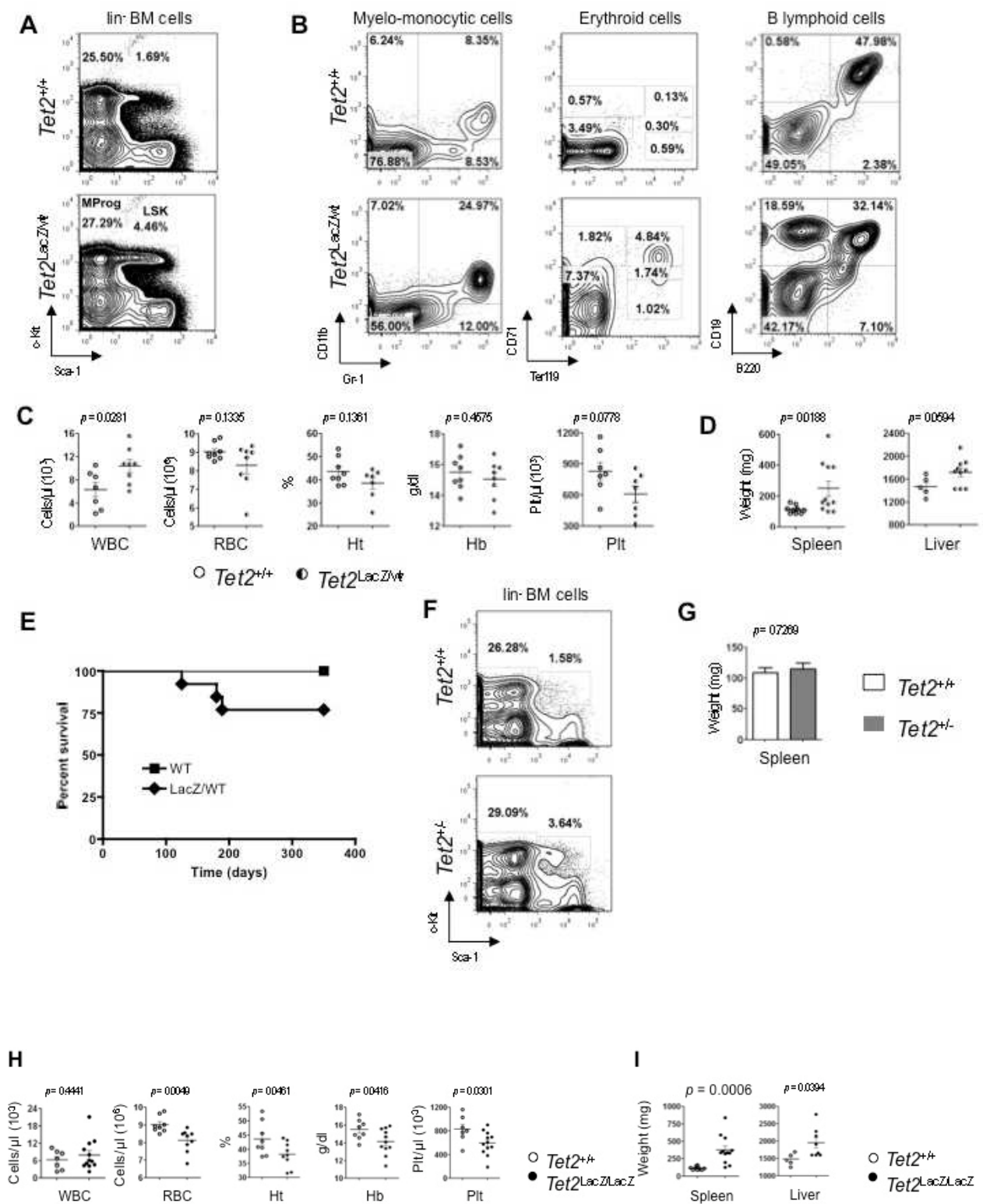
O: Representative flow cytometry profile of blood subpopulations shown in Figure 2F (analysis of CD45.2^+ donor chimerism in myelo-monocytic and lymphoid cells, 20 weeks post-BMT).

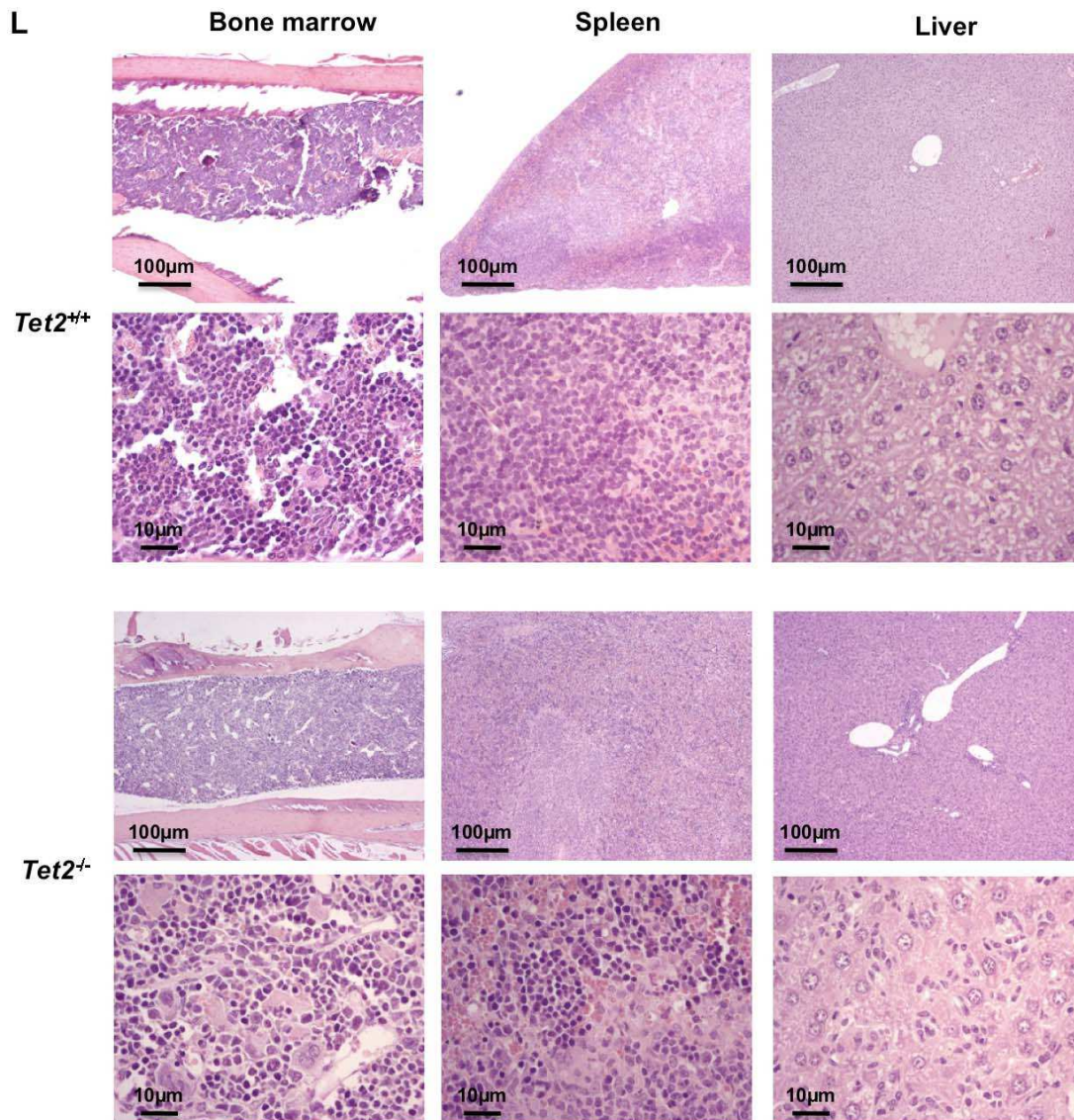
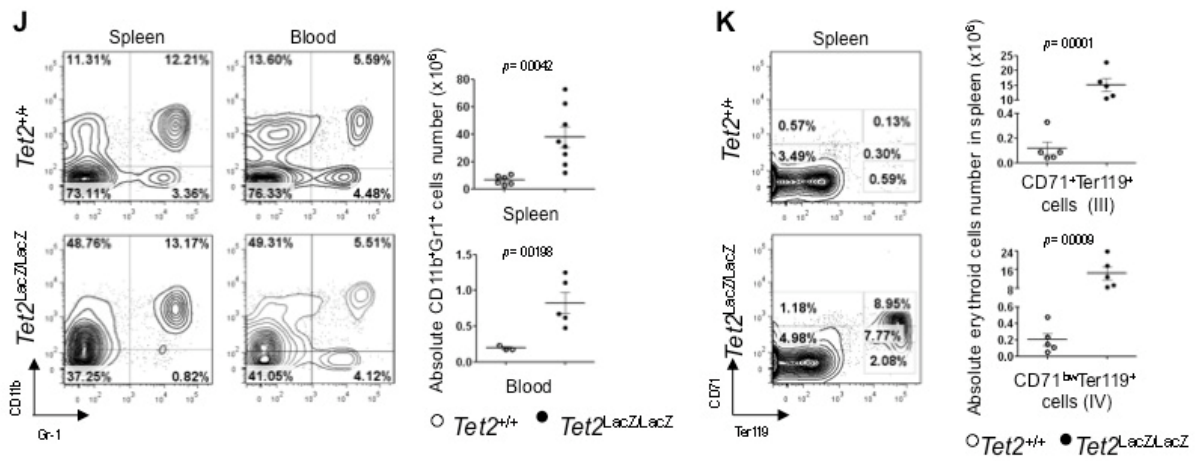
P: The percentages of donor chimerism in myelo-monocytic and lymphoid lineages in blood are given at the indicated time points post-BMT ($n=2$ mice per genotype).

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 $\text{CD45.1}^- \text{CD45.2}^+$.

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





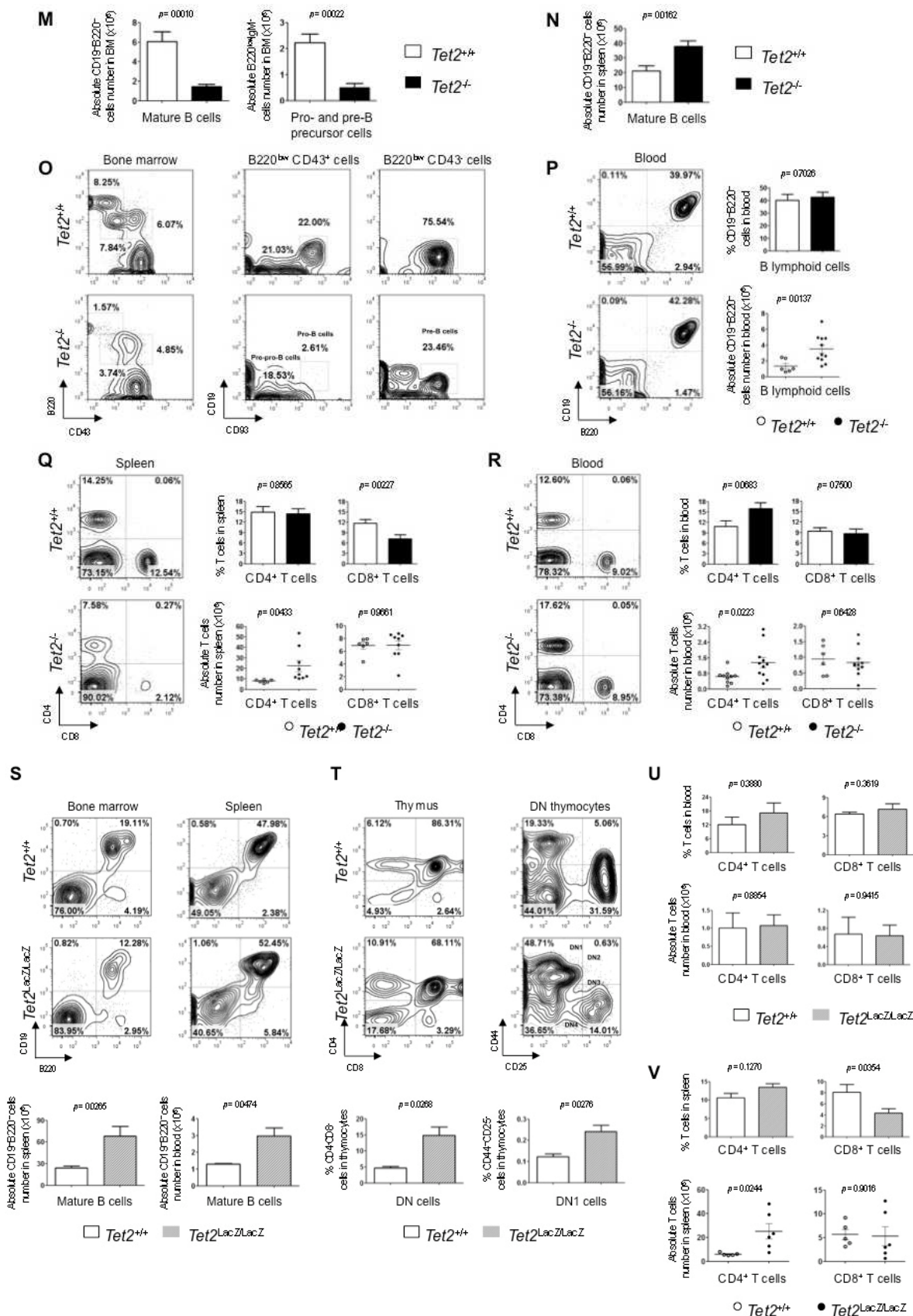


Figure S3: Phenotype of heterozygous *Tet2*^{+/-} and *Tet2*^{LacZ/wt} and additional phenotype of homozygous animals (related to Figure 3).

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 \pm 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 \pm 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 \pm 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 \pm 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 \pm 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 \pm 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 \pm 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 \pm 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.

	<i>Tet2</i> ^{-/-}	<i>Tet2</i> ^{LacZ/wt}	<i>Tet2</i> ^{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%)
Peripheral 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.

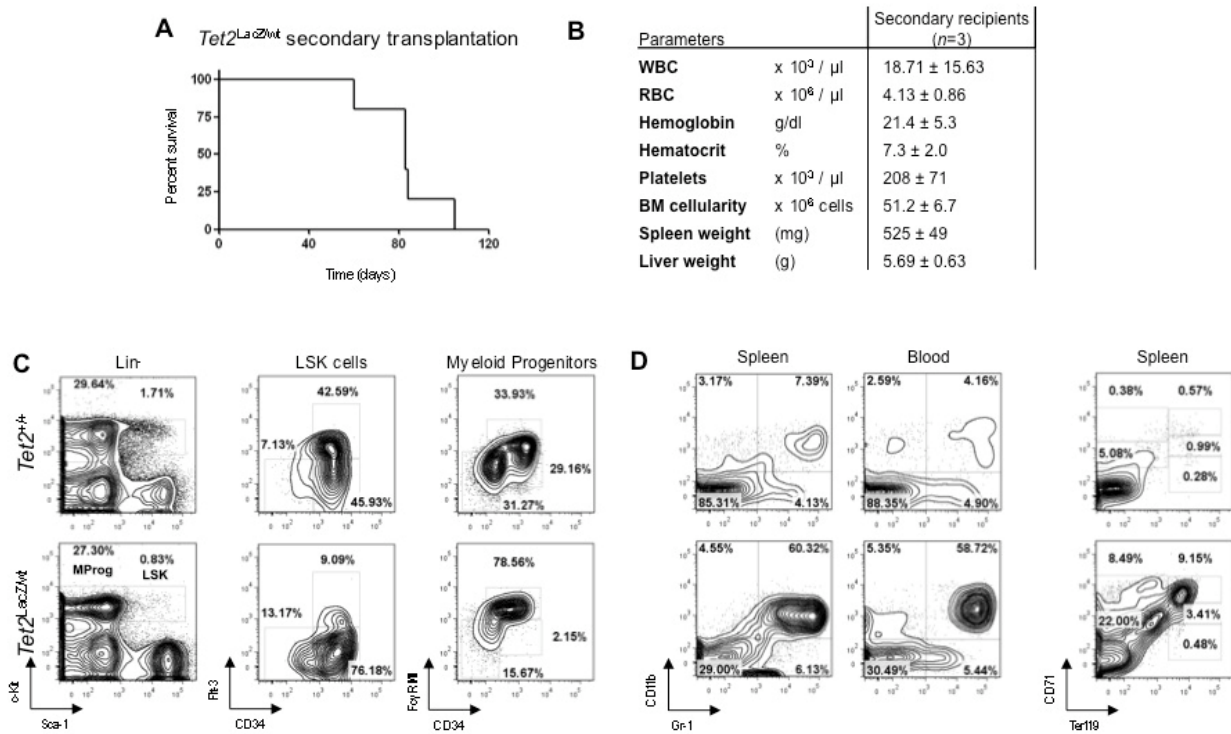


Figure S4: Gene-trap disease transplantation to secondary recipients (related to Figure 4).

A: Kaplan-Meier survival curve of secondary recipients transplanted with 1×10^6 *Tet2^{LacZ/wt}* hematopoietic splenocytes.

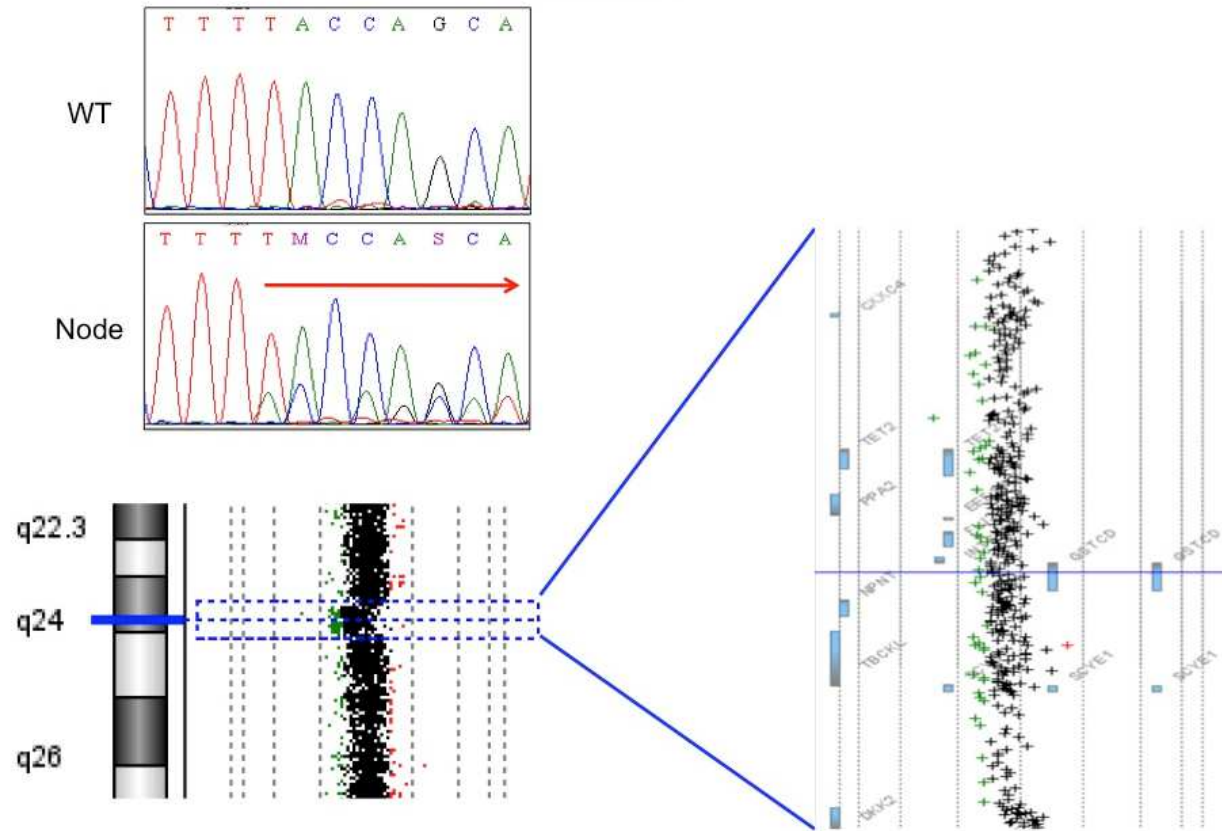
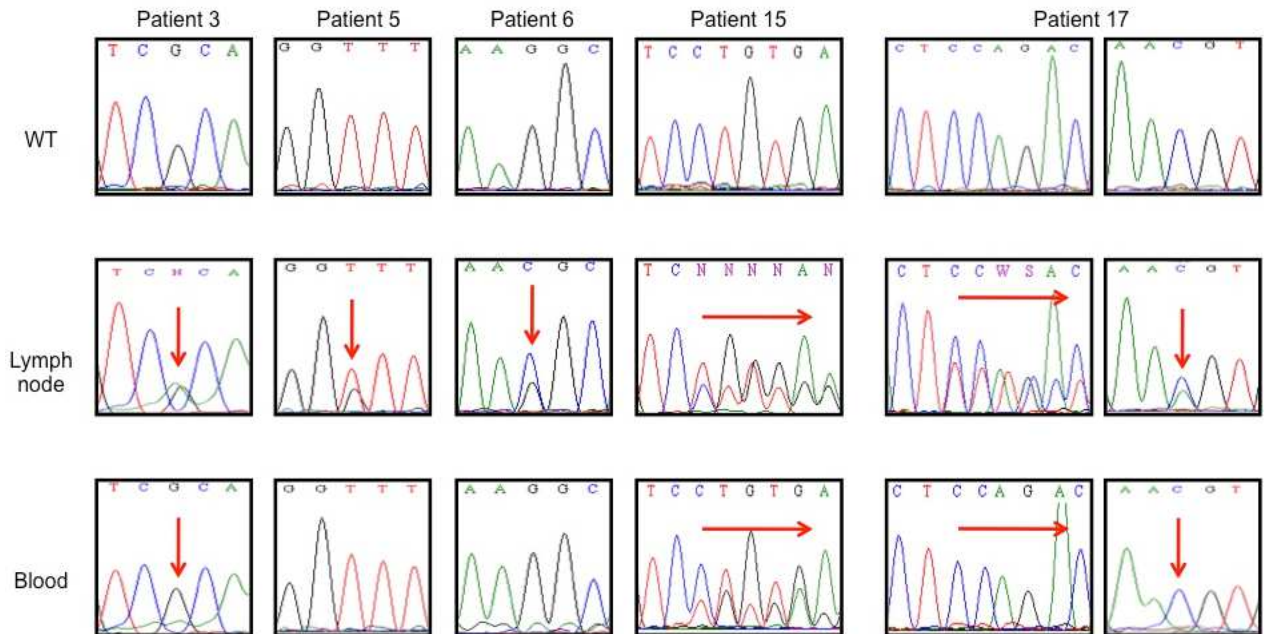
B: Hematologic parameters, BM cellularity, and spleen and liver weight of moribund secondary *Tet2^{LacZ/wt}* recipients, 12 to 15 weeks after transplantation ($n=3$).

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

**B**

C

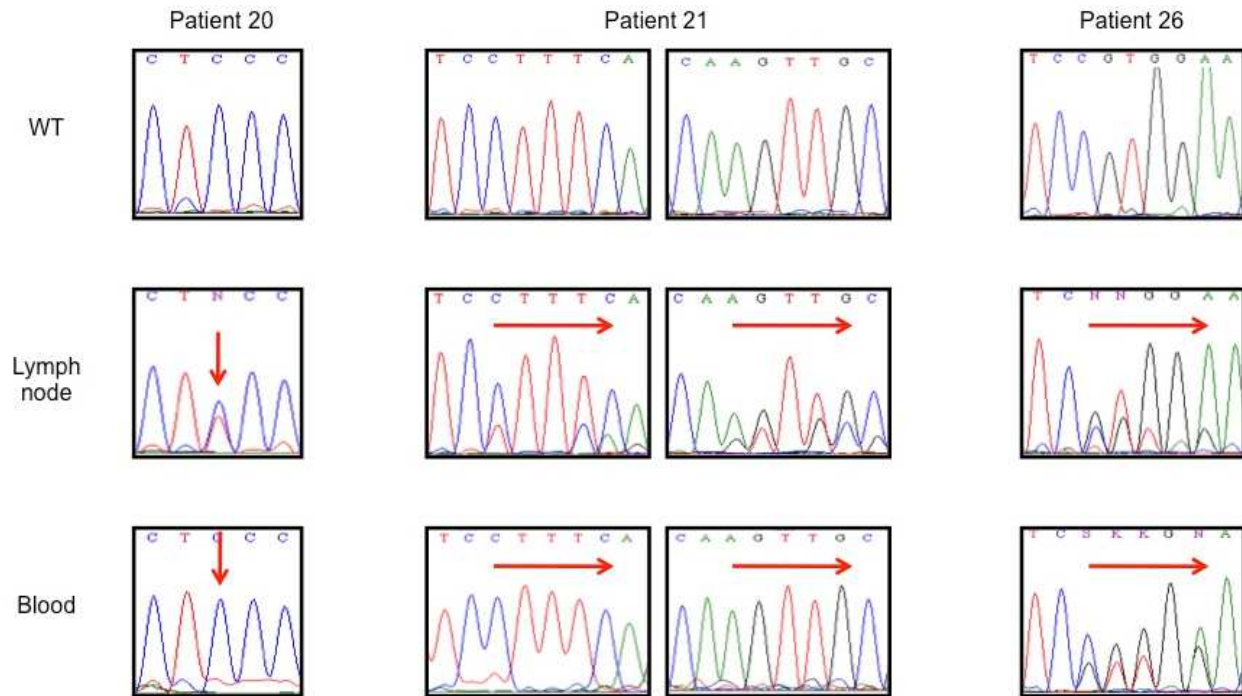


Figure S5: Sequencing of patient samples (related to Figure 5).

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.

Patient #	Tumor sample					Matched DNA ¹	
	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 cytopheresis samples. 2: Clonality analysis (TCR/IgH rearrangement or BCL2-IGH transcript). NA: Not Applicable.

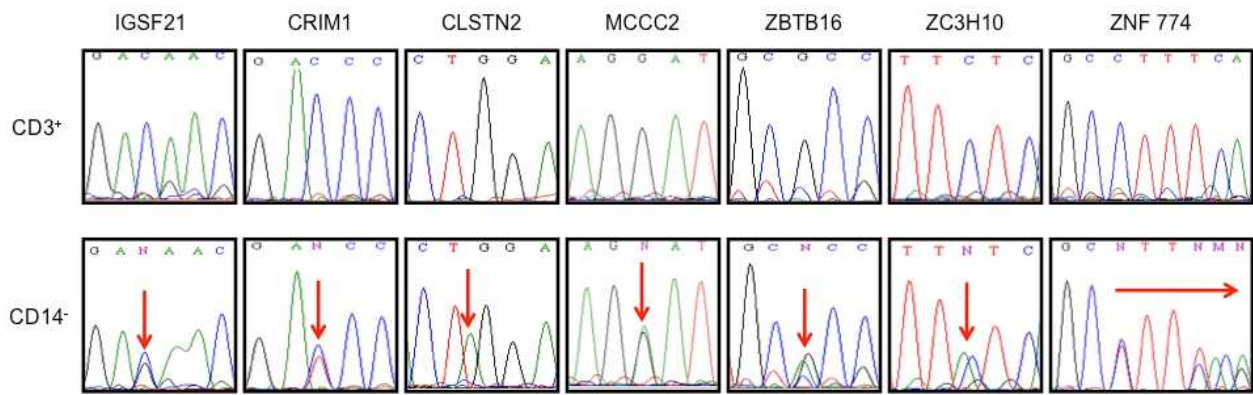


Figure S6: Sequence trace using Sanger sequencing confirming the mutations identified by exome sequencing (related to Figure 6).

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 (Milestone) 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)-CyTM 7–Sca-1 (Ly-6A/E, clone D7, from eBioscience), fluorescein isothiocyanate (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-CyTM 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-CyTM 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-CyTM 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.

DISCUSSION

Les mutations du gène *TET2* et la dérégulation de l'hydroxyméthylation sont impliquées dans la physiopathologie des hémopathies malignes {[Figueroa et al., 2010a](#)}. Les conséquences de l'inactivation de *TET2* dans les cellules hématopoïétiques humaines et murines ont été rapportées *in vitro* mais n'ont pas été étudiées *in vivo* {[Ko et al., 2010](#) ; [Pronier et al., 2011a](#)}. Au cours de mon travail de thèse, j'ai analysé les conséquences de l'invalidation de *Tet2* dans le système hématopoïétique à partir de deux modèles murins. Ces résultats ont permis de vérifier le rôle suppresseur de tumeur du gène *Tet2* dans les hémopathies malignes et de définir son rôle au cours de l'hématopoïèse. La perte de *Tet2* chez la souris conduit à une amplification progressive du compartiment des cellules souches et des progéniteurs multipotents dès l'âge de deux mois. Les HSC *Tet2*^{-/-} présentent un avantage compétitif par rapport aux cellules sauvages pour la reconstitution de l'ensemble des lignées hématopoïétiques. Au cours du temps, les animaux *Tet2*^{-/-} peuvent développer une pathologie maligne comparable à la leucémie myélo-monocytaire chronique humaine. L'augmentation de l'auto-renouvellement et l'amplification des cellules immatures favoriseraient l'acquisition d'évènements oncogéniques supplémentaires coopérant avec la perte de *Tet2* au cours de la transformation des progéniteurs hématopoïétiques, et conduisent ainsi au développement d'hémopathies malignes.

FONCTION DE TET2 DANS L'HEMATOPOÏÈSE NORMALE ET PATHOLOGIQUE

Le phénotype décrit est similaire à celui observé dans d'autres modèles générés par différentes équipes. Quatre autres stratégies ont été mises en œuvre pour invalider le gène *Tet2* chez la souris {[Tang et al., 2008](#) ; [Li et al., 2011](#) ; [Ko et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#)} (Figure 15). Deux constructions ciblent le premier exon codant : l'une est conditionnelle (*Vav-Cre Tet2*^{Lox/Lox}) {[Moran-Crusio et al., 2011](#)} et l'autre permet de substituer la séquence de la GFP à celle de *Tet2* (grâce à l'insertion d'une cassette LacZ/GFP au site d'initiation de la transcription du gène) {[Li et al., 2011](#)}. Deux autres constructions conditionnelles ciblent le domaine catalytique de la protéine, grâce à l'excision des exons 8 à 10, codant pour la première moitié du domaine DSBH (CMV *Tet2*^{Lox/Lox}) {[Ko et al., 2011](#)} ou de l'exon 11, codant la seconde moitié (*Mx1-Cre Tet2*^{Lox/Lox}) {[Quivoron et al., 2011](#)}. La cinquième construction, un allèle « *gene-trap* » (insertion d'une cassette β-galactosidase/néomycine « β-geo » dans l'intron 9) est considérée comme un allèle hypomorphe de *Tet2* {[Quivoron et al., 2011](#)}. Contrairement aux cinq autres constructions, la dernière stratégie « *gene-trap* » (insertion d'une cassette β-geo dans l'intron 2) conduit à une léthalité péri-natale, trois jours après la naissance des animaux {[Tang et al., 2008](#) ; [Shide et al., 2012](#)}.

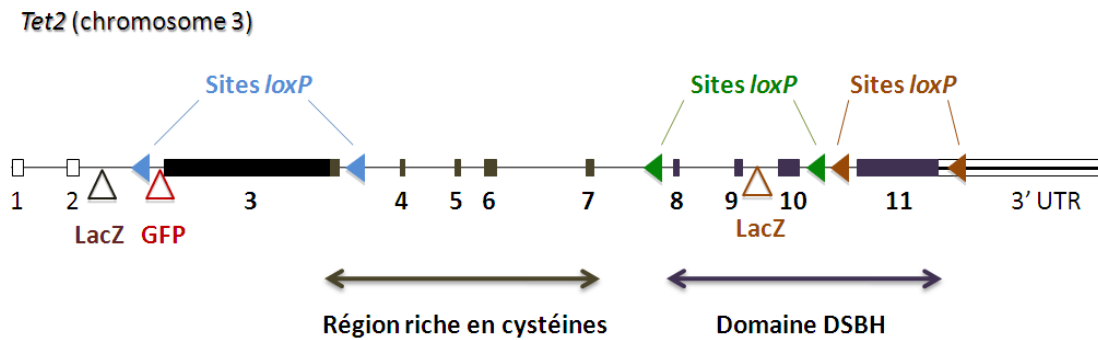


Figure 15 Stratégies d'inactivation du gène *Tet2* chez la souris.

Les exons de *Tet2* ciblés dans les différents modèles d'inactivation sont indiqués. Les triangles pleins correspondent aux sites de recombinaison *LoxP* (stratégie développée par {Moran-Crusio *et al.*, 2011} en bleu, par {Ko *et al.*, 2011} en vert et par {Quivoron *et al.*, 2011} en marron). Les triangles vides indiquent les sites d'insertion des cassettes LacZ/GFP et β -geo : {Tang *et al.*, 2008} en brun, {Li *et al.*, 2011} en rouge et {Quivoron *et al.*, 2011} en marron. Les deux régions conservées de la protéine Tet2 (de 1912 aa chez la souris) sont codées par les exons 3 à 7 (région riche en cystéines) et 8 à 11 (domaine catalytique DSBH).

Régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices

L'inactivation de *Tet2* conduit à une diminution du niveau des 5hmC dans l'ADN génomique des cellules immatures (Figure 1 – Article 1), ce qui confirme *in vivo* la fonction enzymatique de Tet2 dans les différents modèles de KO {Li *et al.*, 2011 ; Ko *et al.*, 2011 ; Moran-Crusio *et al.*, 2011}. Cette réduction de l'hydroxyméthylation devrait s'accompagner d'une augmentation du substrat des 5hmC (*i. e.* 5mC), effectivement observée dans les cellules *Tet2*^{-/-} dans certains modèles {Li *et al.*, 2011}. La saturation du signal liée à la technique d'immunodétection (dot-blot) ne nous a pas permis de vérifier ce point (Figure 1 – Article 1). L'analyse par spectrométrie de masse du contenu en 5mC et 5hmC de l'ADN de cellules hématopoïétiques immatures des souris « *gene-trap* » n'a pas non plus montré d'association entre la perte de *Tet2* et une hyperméthylation de l'ADN (données non présentées). Dans un autre contexte, l'augmentation de la méthylation dans le génome de cellules ES sous-exprimant le gène *Tet1* reste modeste, malgré une diminution importante des 5hmC {Dawlaty *et al.*, 2011 ; Ficiz *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011a}. Ces variations modérées de la méthylation de l'ADN peuvent s'expliquer par la représentation relativement faible des 5hmC par rapport aux 5mC (45 pour 1000 cytosines méthylées) {Globisch *et al.*, 2010}, ou par une augmentation de la méthylation de cytosines non pas globale mais restreinte à certaines régions génomiques {Yamazaki *et al.*, 2012}. L'analyse locus-spécifique de l'hydroxyméthylation et de la méthylation du génome des cellules hématopoïétiques *Tet2*^{-/-} permettrait de définir au mieux la dynamique de ces marques au cours de l'hématopoïèse et les conséquences de l'inactivation de *Tet2* sur les anomalies hématopoïétiques observées {Yu *et al.*, 2012}.

La dérégulation de l'hydroxyméthylation de l'ADN est associée à l'augmentation de l'auto-renouvellement des HSPC dans les modèles de KO au cours du développement {[Kunimoto et al., 2012](#)} et chez l'adulte {[Li et al., 2011](#) ; [Ko et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#). Des cellules immatures *Tet2*^{-/-} isolées sur le phénotype LSK de moelle de souris adultes ont pu être maintenues en culture liquide pendant plusieurs semaines (Figure Suppl 2 – Article 1). L'altération du potentiel de différenciation de ces cellules observée *in vitro* est également rapportée dans un contexte fœtal {[Kunimoto et al., 2012](#)}. Des analyses d'expression génique de HSC purifiées (cellules LSK CD150⁺) entretenues en culture et présentant des capacités de repiquage supérieures ont montré une surexpression de gènes clés de l'auto-renouvellement des HSC (*Meis1* et *Evi1*) et une sous-expression de gènes liés à l'engagement dans la différenciation myéloïde (facteur de transcription C/EBPα) {[Moran-Crusio et al., 2011](#)}. La signature transcriptionnelle mise en évidence dans cette expérience serait caractéristique de cellules promyéloblastiques de type CMP surexprimant le marqueur c-Kit {[Moran-Crusio et al., 2011](#)}.

La dérégulation de l'expression de gènes de l'auto-renouvellement de cellules *Tet2*^{-/-} maintenues en culture {[Moran-Crusio et al., 2011](#)} peut expliquer l'expansion des cellules souches et progénitrices rapportées *in vivo* dans chaque modèles {[Li et al., 2011](#) ; [Ko et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#)}. Un phénotype similaire a également été rapporté dans un modèle d'inactivation de *Dnmt3a* chez la souris {[Challen et al., 2011](#)}. L'expansion du compartiment des HSC après greffe en souris receveuses (associée à la perte de leur potentiel d'engagement dans la différenciation) serait liée à la déméthylation et la surexpression de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement des HSC (*Runx1* et *Gata-3*) {[Challen et al., 2011](#)}.

Anomalies de l'hématopoïèse et développement d'hémopathies malignes

Altération de la lymphopoïèse

Des anomalies de la différenciation des lignées lymphoïdes T (augmentation des précurseurs précoces DN1) et lymphoïdes B (accumulation de cellules matures anormales) ont été observées chez les animaux invalidés pour *Tet2* (Figure 3 – Article 1). Ces anomalies de la lymphopoïèse n'ont été rapportées dans aucun autre modèle d'inactivation de *Tet2* {[Li et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#)}. Ce gène semble donc être important au cours de la différenciation des lignées lymphoïdes chez la souris, à des stades plus ou moins avancés selon la lymphopoïèse B (prenant place dans la moelle) ou T (localisée dans le thymus).

Ce gène est également impliqué au cours de la lymphomagenèse chez l'Homme : des mutations de *TET2* sont décrites dans ~10 à 20% des lymphomes de type B et T, en particulier dans les lymphomes immuno-angioblastiques de type T CD4⁺ (30%), en association avec les mutations du gène *DNMT3A* {[Couronné et al., 2012](#)}. La perte de fonction de *Dnmt3a* chez la souris conduit à une expansion du compartiment des HSC mais aucune anomalie de la lymphopoïèse T n'a été rapportée {[Challen et al., 2011](#)}. Les gènes *DNMT3A* et *DNMT3B* sont fortement exprimés dans les cellules immatures et les cellules des lignées lymphoïdes {[Tadokoro et al., 2007](#)}. Des expériences d'expression conjointe des mutations des gènes *TET2* et *DNMT3A* permettront de vérifier la coopération oncogénique entre ces anomalies, dont l'association est observée chez l'Homme au cours de la lymphomagenèse T {[Couronné et al., 2012](#)}.

Altération de la myélopoïèse et développement d'hémopathies myéloïdes

La myélopoïèse des animaux invalidés pour *Tet2* est biaisée vers la différenciation des lignées myélo-monocytaires, ce qui est en accord avec la fréquence importante des mutations de *TET2* observées dans les échantillons de CMML (pathologie caractérisée par l'expansion du compartiment monocyttaire) {[Kosmider et al., 2009b](#)}. *Tet2* semble ainsi réguler négativement la myélopoïèse, et en particulier l'engagement dans la différenciation monocyttaire. Les anomalies de la différenciation myéloïde observées s'accompagnent d'une augmentation du nombre de cellules progénitrices myéloïdes (Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺), liée à l'augmentation des progéniteurs de type CMP et GMP dans la moelle osseuse (Figure Suppl 4 – Article 1) {[Ko et al., 2011](#)}, comme dans la rate de ces animaux (hématopoïèse extra-médullaire) {[Moran-Crusio et al., 2011](#)}.

Dans nos modèles, le développement de pathologie ressemblant à la CMML humaine s'observe à partir de l'âge de six mois chez une partie des animaux « *gene-trap* » seulement. Cette pénétrance variable est observée dans chacun des modèles développés {[Li et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#)}. La latence avant l'apparition d'hémopathies de type CMML varie également selon les stratégies {[Li et al., 2011](#) ; [Moran-Crusio et al., 2011](#)}. Elle semble plus courte dans les modèles reposant sur une stratégie ciblant le premier exon {[Li et al., 2011](#)}, en comparaison avec celles ciblant le domaine catalytique de la protéine {[Moran-Crusio et al., 2011](#) ; [Quivoron et al., 2011](#)}.

Dans d'autres modèles, la perte de *Tet2* conduit également au développement d'hémopathies malignes de type CMML, mais la majorité des souris meurt de pathologies ressemblant aux MDS (avec une prédominance érythroïde) ou aux MPN {Li *et al.*, 2011}. Contrairement aux hémopathies de type MPN, l'accumulation d'érythroblastes *Tet2*^{-/-} liée à l'altération de l'érythropoïèse chez certains animaux n'est pas transplantable dans des souris syngéniques receveuses {Li *et al.*, 2011}. Le développement d'hémopathies de type MDS et MPN rapporté dans aucun autre modèle peut être lié à la stratégie d'inactivation du gène. Le remplacement de la séquence de *Tet2* par celle de la GFP dans ce modèle ne permet l'expression d'aucun isoforme, contrairement aux autres stratégies pour lesquelles l'expression du second isoforme et une fonction non catalytique potentielle de *Tet2* sont conservées {Moran-Crusio *et al.*, 2011 ; Quivoron *et al.*, 2011}.

Initiation de la transformation des progéniteurs et coopération oncogénique

La survenue d'un événement génétique précoce responsable du développement de pathologies différentes (hémopathies malignes myéloïdes ou lymphoïdes) est une hypothèse formulée il y a plusieurs années par le groupe de Nicole Casadevall {Viguié *et al.*, 2005}. Ce travail suggérait la survenue d'une anomalie moléculaire aux stades les plus immatures de l'hématopoïèse, impliquant un potentiel gène suppresseur de tumeur situé en 4q24. Cette hypothèse a par la suite été démontrée par la mise en évidence de mutations inactivatrices de *TET2* dans les MPN {Delhommeau *et al.*, 2009} puis dans l'ensemble des hémopathies malignes myéloïdes {Langemeijer *et al.*, 2009 ; Tefferi *et al.*, 2009b} et lymphoïdes {Couronné *et al.*, 2012}. Ces mutations affectent dans tous les cas le compartiment des HSC (ou au moins un progéniteur immature) et peuvent entraîner le développement aussi bien d'hémopathies myéloïdes que lymphoïdes {Viguié *et al.*, 2005 ; Quivoron *et al.*, 2011 ; Couronné *et al.*, 2012}.

La modélisation de l'inactivation de *Tet2* chez la souris a permis de montrer que la perte de fonction de ce gène suppresseur de tumeur dans les cellules hématopoïétiques conduit à un état « pré-leucémique », lié à l'amplification du compartiment des cellules souches et progénitrices (phénotype similaire à l'avantage prolifératif des cellules de patients MPN mutées pour *TET2* observé en xéno greffe {Delhommeau *et al.*, 2009}. L'expansion des cellules immatures observée chez la souris favoriserait l'acquisition d'évènements oncogéniques secondaires. Les mutations de *TET2* permettent ainsi l'établissement ou l'augmentation de la dominance clonale d'une cellule à l'origine de la maladie et conduisent donc une étape commune dans la pathogénèse des hémopathies malignes, ce qui justifie la présence de ces mutations à des fréquences variables dans tous les types d'hémopathies malignes {Levine and Carroll, 2009 ; Mullighan, 2009}.

L'inactivation de *TET2* n'est pas associée à une instabilité chromosomique des cellules de patients atteints d'hémopathies malignes {Hussein *et al.*, 2010 ; Moran-Crusio *et al.*, 2011}. Les mutations de *TET2* peuvent survenir avec celles de gènes impliqués dans le contrôle de voies de signalisation (*JAK2*, *CBL*, *N-RAS*), la régulation épigénétique de la transcription (*EZH2*, *ASXL1*, *DNMT3A*) ou le spliceosome (*SRSF2*) dans les hémopathies myéloïdes comme lymphoïdes {Pronier *et al.*, 2011a ; Couronné *et al.*, 2012}. L'analyse clonale du statut mutationnel des gènes *TET2* et *JAK2* dans des échantillons de MPN indique une action synergique de ces mutations pour l'amplification des compartiments hématopoïétiques précoces et tardifs {Beer *et al.*, 2010}. L'ordre de survenue n'est pas déterminant pour conduire à un phénotype complètement transformé {Pronier *et al.*, 2011b}. Des expériences de coopération de la mutation activatrice *JAK2*^{V617F} dans un contexte KO pour *Tet2* permettraient d'éclaircir le rôle de chaque anomalie dans la transformation des progéniteurs myéloïdes et la survenue de MPN.

Dans les CMML, les mutations de *TET2* ne sont exclusives d'aucune autre mutation connue dans cette pathologie. Contrairement à celles de *TET2*, les mutations perte-de-fonction du gène *ASXL1* conduisent à une altération sévère de la différenciation myéloïde mais ne confèrent pas d'avantage compétitif aux cellules souches et progénitrices chez la souris {Abdel-Wahab *et al.*, 2012}. L'inactivation du corégulateur transcriptionnel *Tif1 γ* chez la souris conduit au développement de caractéristiques proches de la CMML humaine à partir de l'âge de six mois (hypercellularité médullaire due à une hyperplasie monocytaire et splénomégalie résultant d'une infiltration de cellules myéloïdes) {Aucagne *et al.*, 2011a}. Le gène *TIF1 γ* n'est pas la cible de mutation ponctuelle mais son expression est réduite dans les cellules de patients dans 35% des cas de CMML du fait d'une hyperméthylation de son promoteur {Aucagne *et al.*, 2011b}. La perte de *Tet2* dans nos modèles murins pourrait être associée à la méthylation du promoteur et la diminution de l'expression de *Tif1 γ* , un composant de la voie de signalisation du TGF (*Transforming Growth Factor*)- β régulant l'activité des facteurs de transcription SCL/TAL1 et PU.1 {Kusy *et al.*, 2011}.

Les anomalies de l'hématopoïèse et le développement d'hémopathies de type CMML observées chez les animaux homozygotes sont également présentes chez les souris hétérozygotes dans chacun des modèles analysés (Figure Suppl 3 – Article 1) {Li *et al.*, 2011 ; Moran-Crusio *et al.*, 2011}. Les souris portant un allèle hypomorphe de *Tet2* développent également des anomalies hématopoïétiques similaires. Il a été montré que l'expression de l'allèle non muté était maintenue dans les cellules de patients CMML mutés sur une copie unique de *TET2* {Moran-Crusio *et al.*, 2011}. Le dosage génique de ce gène suppresseur de tumeur semble donc être important dans la physiopathologie des hémopathies malignes.

ROLE EPIGENETIQUE ET AUTRE(S) FONCTION(S) DE TET2

Le rôle des protéines TET dans les cellules souches semble dépendre du contexte et de l'état épigénétique de la cellule. Contrairement à TET1, la protéine TET2 joue un rôle mineur dans le maintien de l'identité souche des cellules souches embryonnaires : la réduction de *Tet1* (mais pas celle de *Tet2*) conduirait à une différenciation spontanée des cellules ES, liée à l'accumulation de cytosines méthylées dans les régions promotrices de gènes de pluripotence comme *Nanog* {Ito *et al.*, 2010}, mais ces résultats n'ont pas été reproduits {Dawlaty *et al.*, 2011}. Dans le système hématopoïétique, les trois gènes de la famille Tet sont exprimés, mais l'inactivation de *Tet2* seul est suffisante pour entraîner une baisse significative du niveau global des 5hmC dans l'ADN génomique des progéniteurs immatures et conduire à des anomalies de la myélopoïèse ainsi qu'au développement d'hémopathie maligne. La distribution génomique des protéines TET et celle des modifications des cytosines qu'elles permettent (5hmC, 5fC et 5caC) n'est pas connue dans les cellules hématopoïétiques. Une telle étude permettrait de définir le rôle de chacune au cours de l'hématopoïèse et de distinguer leur rôle dans la déméthylation des cytosines oxydées d'un rôle épigénétique propre (ainsi que l'activité catalytique de leur fonction non enzymatique).

L'analyse globale du transcriptome de cellules blastiques humaines mutées pour *TET2* montre une dérégulation de l'expression de gènes principalement associés à l'auto-renouvellement des cellules souches {Metzeler *et al.*, 2011}. A l'exception de certaines voies de signalisation (PLC, JNK et ERK), il n'existe pas non plus de dérégulation drastique de l'expression des gènes différenciellement méthylés dans des échantillons de CMML mutés ou non pour *TET2* {Pérez *et al.*, 2012}. Comme chez l'Homme, les cellules murines *Tet2*^{-/-} ne présentent pas de changements importants de la transcription, comme pourrait le suggérer une fonction directe de TET2 dans la régulation épigénétique de l'expression {Moran-Crusio *et al.*, 2011}.

La dérégulation des gènes cibles de TET1 observée en l'absence de méthylation de l'ADN (rôle non enzymatique) s'explique par son interaction avec le complexe co-répresseur Sin3A {Williams *et al.*, 2011a}. Une fonction non-enzymatique de TET2 est également envisageable, compte-tenu de l'expression dans les cellules hématopoïétiques d'un isoforme de TET2 dépourvu de domaine catalytique {Langemeijer *et al.*, 2009 ; Moran-Crusio *et al.*, 2011}. Contrairement à TET1, le recrutement de TET2 à l'ADN n'est pas restreint aux régions enrichies en CpG et dépend de la fixation à l'ADN de protéines partenaires (facteur dépourvu de domaine CXXC). La caractérisation de ces interactions dans les cellules du système hématopoïétique permettrait de définir au mieux son rôle dans le noyau (complémentaire ou non de son activité dioxygénase).

Selon des résultats obtenus par la technique de double hybride, il existerait une interaction entre la région carboxy-terminale de TET2 et la protéine TBC1D4/AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*) {Nakayama *et al.*, 2002}. La famille de protéines à domaine TBC1 (Tre-2/USP6, BUB2, Cdc16) est essentielle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (de par leur activité RabGAP) {Richardson and Zon, 1995}. De nombreux gènes de cette famille sont impliqués dans un processus néoplasique chez l'Homme : *NB4S* est remanié dans la translocation t(1;10)(p22;q21) en cause dans certains cas de neuroblastome {Roberts *et al.*, 1998}, *TBC1D3/PRC17* est surexprimé dans le cancer de la prostate {Pei *et al.*, 2002 ; Wainszelbaum *et al.*, 2012}, *TBC1D4* dans le lymphome de Burkitt (surexpression liée au gain de la région 13q31) {Salaverria *et al.*, 2008} et *TBC1D7* dans le cancer du poumon {Sato *et al.*, 2010}. Chez certains patients atteints de CMML mutés ou non pour *TET2*, la diminution du niveau des 5hmC est associée à la dérégulation du gène *TBC1D4* {Konstandin *et al.*, 2011}.

Cette expérience de double hybride a également mis en évidence une interaction potentielle de TBC1D4/AS160 avec RBM12 (*RNA-binding protein 12*) et EP400 (*E1A-binding protein p400*) {Nakayama *et al.*, 2002}. La protéine EP400 est la sous-unité ATPase du complexe histone acétyltransférase Nu4A. L'activité de ce complexe co-activateur dépend de l'association entre cette sous-unité et les hélicases RuvBl-1 et RuvBl-2. Ces protéines de la famille AAA+ (*ATPase associated with diverse cellular activities*) jouent des rôles dans des processus aussi divers que la maturation des petits ARN nucléolaires {Matera *et al.*, 2007}, la régulation de la transcription {Gallant, 2007} et le remodelage de la chromatine (sous-unités du complexe de la famille INO80 {Clapier and Cairns, 2009}). Une interaction entre les protéines TBC1D4/AS160 et TIP49b/RuvBl-2 a été démontrée fonctionnellement et joue un rôle important dans la signalisation à l'insuline dans les adipocytes et les cellules musculaires {Xie *et al.*, 2009}. La résistance à l'insuline dans ces cellules est associée à l'augmentation de la β -*N*-acétylglucosamination d'effecteurs clés de la signalisation à l'insuline {Whelan *et al.*, 2010}. Cette modification post-traductionnelle correspond à une glycosylation des résidus sérine et thréonine par la seule enzyme OGT (*O-N*-acétylglucosaminyl transférase). La *O*-GlcNAcylation dépend de l'activité du complexe PRC2 dans les cellules souches embryonnaires, contexte dans lequel OGT est capable de modifier les protéines nucléaires Sin3A (sur le résidu S251) et TET1 (résidu amino-terminal T535) (aucune modification des deux autres membres de la famille, TET2 ou TET3, n'a été rapportée) {Myers *et al.*, 2011}.

Il a par ailleurs été montré que la protéine RuvBl-2 régule l'expression du gène et la fonction catalytique de SMG-1, une protéine de la famille PIKK impliquée dans le mécanisme de surveillance des ARN appelé NMD (« *Nonsense-Mediated mRNA Decay* ») {Izumi *et al.*, 2010}. SMG-1 joue un rôle essentiel dans ce mécanisme, par la phosphorylation de la protéine Upf1, un régulateur central de cette voie {Kashima *et al.*, 2006}. Ce processus est un « contrôle qualité » permettant de détecter et dégrader les ARN messagers présentant un codon de terminaison prématuré (PTC), afin d'éviter la production de protéines tronquées délétères pour la cellule. Cette voie de surveillance est essentielle au cours de la maturation des précurseurs et de la différenciation terminale des lymphocytes B, du fait de la génération à un niveau très élevé de transcrits avec PTC lors de la recombinaison (réarrangements V(D)J) et de l'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines {Li and Wilkinson, 1998}. L'expression des effecteurs de la voie NMD est augmentée dans les cellules de patients mutés pour certains gènes de l'épissage des pré-ARN messagers {Yoshida *et al.*, 2011}. Les mutations des gènes *TET2* sont associées à celles du gène *SRSF2* dans les MDS et les CMML {Yoshida *et al.*, 2011}. Le rôle de *TET2* dans la régulation épigénétique de la transcription pourrait être ainsi associé à celui du contrôle de la maturation des ARN messagers au cours de la lymphopoïèse B et de la leucémogénèse myéloïde {Luco *et al.*, 2011}.

CONCLUSIONS

Les mutations des acteurs impliqués dans le contrôle de la méthylation et de la déméthylation (*DNMT3A*, *TET2*), et plus globalement de régulateurs épigénétiques de l'expression génique (*ASXL1*, *EZH2*), jouent un rôle important au cours de la transformation des progéniteurs immatures dans les hémopathies malignes. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur *TET2* dans les cellules hématopoïétiques est suffisante pour conduire au développement d'hémopathies malignes myéloïdes et d'anomalies de la différenciation lymphoïde chez la souris. Bien que le rôle de *TET2* dans le contrôle de la méthylation au sein des cellules hématopoïétiques n'ait pas été formellement démontré, la perte de fonction des protéines TET pourrait conduire *in fine* à une hyperméthylation de l'ADN fréquemment observée au cours de la transformation tumorale. L'accumulation de cytosines méthylées dans certaines régions génomiques et la dérégulation de gènes spécifiques associée serait responsable de l'avantage de croissance conféré aux cellules hématopoïétiques immatures. Cet état pré-leucémique favorise l'acquisition d'évènements coopératifs responsables de la transformation complète des progéniteurs.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., Huberman, K., Thomas, S., Dolgalev, I., Heguy, A., Paietta, E., Le Beau, M.M., Beran, M., Tallman, M.S., Ebert, B.L., Kantarjian, H.M., Stone, R.M., Gilliland, D.G., Crispino, J.D., and Levine, R.L. (2009) **Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies.** *Blood*, **114** (1): 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** (2): 447–452.

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Rampal, R., Lasho, T.L., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011a) ***DNMT3A* mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **25** (7): 1219–1220.

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Patel, J., Wadleigh, M., Lasho, T., Heguy, A., Beran, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., and Tefferi, A. (2011b) **Concomitant analysis of *EZH2* and *ASXL1* mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **25** (7): 1200–1202.

Abdel-Wahab, O., Adli, M., Lafave, L.M., Gao, J., Hricik, T., Shih, A.H., Pandey, S., Patel, J.P., Chung, Y.R., Koche, R., Perna, F., Zhao, X., Taylor, J.E., Park, C.Y., Carroll, M., Melnick, A., Nimer, S.D., Jaffe, J.D., Aifantis, I., Bernstein, B.E., and Levine, R.L. (2012) ***ASXL1* Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression.** *Cancer Cell*, **22** (2): 180–193.

Adamo, L., Naveiras, O., Wenzel, P.L., McKinney-Freeman, S., Mack, P.J., Gracia-Sancho, J., Suchy-Dacey, A., Yoshimoto, M., Lensch, M.W., Yoder, M.C., García-Cardena, G., and Daley, G.Q. (2009) **Biomechanical forces promote embryonic haematopoiesis.** *Nature*, **459** (7250): 1131–1135.

Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A., Anderson, K., Sitnicka, E., Sasaki, Y., Sigvardsson, M., and Jacobsen, S.E. (2005) **Identification of *Flt3*⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment.** *Cell*, **121** (2): 295–306.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000) **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.** *Nature*, **404** (6774): 193–197.

Andersson, T., Södersten, E., Duckworth, J.K., Cascante, A., Fritz, N., Sacchetti, P., Cervenka, I., Bryja, V., and Hermanson, O. (2009) ***CXXC5* is a novel *BMP4*-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells.** *J Biol Chem*, **284** (6): 3672–3681.

Andersson, A.K., Miller, D.W., Lynch, J.A., Lemoff, A.S., Cai, Z., Pounds, S.B., Radtke, I., Yan, B., Schuetz, J.D., Rubnitz, J.E., Ribeiro, R.C., Raimondi, S.C., Zhang, J., Mullighan, C.G., Shurtleff, S.A., Schulman, B.A., and Downing, J.R. (2011) ***IDH1* and *IDH2* mutations in pediatric acute leukemia.** *Leukemia*, **25** (10): 1570–1577.

Antequera, F., Tamame, M., Villanueva, J.R., and Santos, T. (1984) **DNA methylation in the fungi.** *J Biol Chem*, **259** (13): 8033–8036.

Arai, F., and Suda, T. (2007) **Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche.** *Ann NY Acad Sci*, **1106** :41–53.

Aravind, L., and Iyer, L.M. (2012) **The HARE-HTH and associated domains: Novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modifications.** *Cell Cycle*, **11** (1): 119–131.

Aucagne, R., Droin, N., Paggetti, J., Lagrange, B., Largeot, A., Hammann, A., Bataille, A., Martin, L., Yan, K.P., Fenaux, P., Losson, R., Solary, E., Bastie, J.N., and Delva, L. (2011a) **Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia.** *J Clin Invest*, **121** (6): 2361-2370.

Aucagne, R., Droin, N., Paggetti, J., Lagrange, B., Largeot, A., Hammann, A., Bataille, A., Martin, L., Yan, K.P., Fenaux, P., Losson, R., Solary, E., Bastie, J.N., and Delva, L. (2011b) **Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia.** *J Clin Invest*, **121** (6): 2361-2370.

Auclair, G., and Weber, M. (2012) **Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals.** *Biochimie*.

Ayton, P.M., Chen, E.H., and Cleary, M.L. (2004) **Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein.** *Mol Cell Biol*, **24** (23): 10470-10478.

Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W., and Schnittger, S. (2006) **Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients.** *Blood*, **107** (10): 3847-3853.

Baxter, E.J., Hochhaus, A., Bolufer, P., Reiter, A., Fernandez, J.M., Senent, L., Cervera, J., Moscardo, F., Sanz, M.A., and Cross, N.C. (2002) **The t(4;22)(q12;q11) in atypical chronic myeloid leukaemia fuses BCR to PDGFRA.** *Hum Mol Genet*, **11** (12): 1391-1397.

Baxter, E.J., Scott, L.M., Campbell, P.J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G.S., Bench, A.J., Boyd, E.M., Curtin, N., Scott, M.A., Erber, W.N., and Green, A.R.; Cancer Genome Project (2005) **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** *Lancet*, **365** (9464): 1054-1061.

Beer, P.A., Jones, A.V., Bench, A.J., Goday-Fernandez, A., Boyd, E.M., Vaghela, K.J., Erber, W.N., Odeh, B., Wright, C., McMullin, M.F., Cullis, J., Huntly, B.J., Harrison, C.N., Cross, N.C., and Green, A.R. (2009) **Clonal diversity in the myeloproliferative neoplasms: independent origins of genetically distinct clones.** *Br J Haematol*, **144** (6): 904-908

Beer, P.A., Delhommeau, F., Le Couedic, J.P., Dawson, M.A., Chen, E., Bareford, D., Kusec, R., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., Vainchenker, W., and Green, A.R. (2010) **Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm.** *Blood*, **115** (14): 2891-2900.

Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D., and Ebert, B.L. (2011) **Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes.** *N Engl J Med*, **364** (26): 2496-2506.

Bennett, J.M., Catovsky D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H., Sultan, C., and Cox, C. (1994) **The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group.** *Br J Haematol*, **87** (4): 746-754.

Berger, A.H., and Pandolfi, P.P. (2011) **Haplo-insufficiency: a driving force in cancer.** *J Pathol*, **223** (2): 137-146.

Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. (2005) **Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse.** *Cell*, **120** (2): 169-181.

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

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001) **Oncogenic kinase signalling.** *Nature*, **411** (6835): 355-365.

Bödör, C., Renneville, A., Smith, M., Charazac, A., Iqbal, S., Etancelin, P., Cavenagh, J., Barnett, M.J., Kramarzova, K., Krishnan, B., Matolcsy, A., Preudhomme, C., Fitzgibbon, J., and Owen, C. (2012) **Germ-line GATA2 p.THR354MET mutation in familial myelodysplastic syndrome with acquired monosomy 7 and ASXL1 mutation demonstrating rapid onset and poor survival.** *Haematologica*, **97** (6): 890-894.

Booth, M.J., Branco, M.R., Ficiz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., and Balasubramanian, S. (2012) **Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution.** *Science*, **336** (6083): 934-937.

Boultonwood, J., Perry, J., Pellagatti, A., Fernandez-Mercado, M., Fernandez-Santamaria, C., Calasanz, M.J., Larrayoz, M.J., Garcia-Delgado, M., Giagounidis, A., Malcovati, L., Della Porta, M.G., Jädersten, M., Killick, S., Hellström-Lindberg, E., Cazzola, M., and Wainscoat, J.S. (2010) **Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, **24** (5): 1062-1065.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2006) **Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells.** *Nature*, **441** (7091): 349-353.

Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006) **Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions.** *Genes Dev*, **20** (9): 1123-1136.

Bröske, A.M., Vockentanz, L., Kharazi, S., Huska, M.R., Mancini, E., Scheller, M., Kuhl, C., Enns, A., Prinz, M., Jaenisch, R., Nerlov, C., Leutz, A., Andrade-Navarro, M.A., Jacobsen, S.E., and Rosenbauer, F. (2009) **DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction.** *Nat Genet*, **41** (11): 1207-1215.

Burmeister, T., Meyer, C., Schwartz, S., Hofmann, J., Molkenin, M., Kowarz, E., Schneider, B., Raff, T., Reinhardt, R., Gökbuget, N., Hoelzer, D., Thiel E., and Marschalek, R. (2009) **The MLL recombinome of adult CD10-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results from the GMALL study group.** *Blood*, **113** (17): 4011-4015.

Cairns, R.A., Iqbal, J., Lemonnier, F., Kucuk, C., de Leval, L., Jais, J.P., Parrens, M., Martin, A., Xerri, L., Brousset, P., Chan, L.C., Chan, W.C., Gaulard, P., and Mak, T.W. (2012) **IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.** *Blood*, **119** (8): 1901-1903.

Caligiuri, M.A., Strout, M.P., Lawrence, D., Arthur, D.C., Baer, M.R., Yu, F., Knuutila, S., Mrózek, K., Oberkircher, A.R., Marcucci, G., de la Chapelle, A., Elonen, E., Block, A.W., Rao, P.N., Herzig, G.P., Powell, B.L., Ruutu, T., Schiffer, C.A., and Bloomfield, C.D. (1998) **Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics.** *Cancer Res*, **58** (1): 55-59.

Campbell, P.J., and Green, A.R. (2006) **The myeloproliferative disorders.** *N Engl J Med*, **355** (23): 2452-2466.

Cannon, S.V., Cummings, A., and Teebor, G.W. (1988) **5-Hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue.** *Biochem Biophys Res Commun*, **151** (3): 1173-1179.

Carbuccia, N., Murati, A., Trouplin, V., Brecqueville, M., Adélaïde, J., Rey, J., Vainchenker, W., Bernard, O.A., Chaffanet, M., Vey, N., Birnbaum, D., and Mozziconacci, M.J. (2009) **Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **23** (11): 2183-2186.

Carbuccia, N., Trouplin, V., Gelsi-Boyer, V., Murati, A., Rocquain, J., Adélaïde, J., Olschwang, S., Xerri, L., Vey, N., Chaffanet, M., Birnbaum, D., and Mozziconacci, M.J. (2010) **Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias.** *Leukemia*, **24** (2): 469-473.

Castilla, L.H., Garrett, L., Adya, N., Orlic, D., Dutra, A., Anderson, S., Owens, J., Eckhaus, M., Bodine, D., and Liu, P.P. (1999) **The fusion gene Cbfb-MYH11 blocks myeloid differentiation and predisposes mice to acute myelomonocytic leukaemia.** *Nat Genet*, **23** (2): 144-146.

Chalandon, Y., and Schwaller, J. (2005) **Targeting mutated protein tyrosine kinases and their signaling pathways in hematologic malignancies.** *Haematologica*, **90** (7): 949-968.

Chaligné, R., James, C., Tonetti, C., Besancenot, R., Le Couédic, J.P., Fava, F., Mazurier, F., Godin, I., Maloum, K., Larbret, F., Lécluse, Y., Vainchenker, W., and Giraudier, S. (2007) **Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis.** *Blood*, **110** (10): 3735-3543.

Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., Liang, S., Lu, Y., Darlington, G.J., Meissner, A., Issa, J.P., Godley, L.A., Li, W., and Goodell, M.A. (2011) **Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation.** *Nat Genet*, **44** (1): 23-31.

Cho, Y.S., Kim, E.J., Park, U.H., Sin, H.S., and Um, S.J. (2006) **Additional sex comb-like 1 (ASXL1), in cooperation with SRC-1, acts as a ligand-dependent coactivator for retinoic acid receptor.** *J Biol Chem*, **281** (26): 17588-17598.

Chou, W.C., Hou, H.A., Chen, C.Y., Tang, J.L., Yao, M., Tsay, W., Ko, B.S., Wu, S.J., Huang, S.Y., Hsu, S.C., Chen, Y.C., Huang, Y.N., Chang, Y.C., Lee, F.Y., Liu, M.C., Liu, C.W., Tseng, M.H., Huang, C.F., and Tien, H.F. (2010) **Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation.** *Blood*, **115** (14): 2749-2754.

Chou, W.C., Chou, S.C., Liu, C.Y., Chen, C.Y., Hou, H.A., Kuo, Y.Y., Lee, M.C., Ko, B.S., Tang, J.L., Yao, M., Tsay, W., Wu, S.J., Huang, S.Y., Hsu, S.C., Chen, Y.C., Chang, Y.C., Kuo, Y.Y., Kuo, K.T., Lee, F.Y., Liu, M.C., Liu, C.W., Tseng, M.H., Huang, C.F., and Tien, H.F. (2011) **TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics.** *Blood*, **118** (14): 3803-3810.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001) **Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98** (25): 14541-14546.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009) **The biology of chromatin remodeling complexes.** *Annu Rev Biochem*, **78**: 273-304.

Cliffe, L.J., Kieft, R., Southern, T., Birkeland, S.R., Marshall, M., Sweeney, K., and Sabatini, R. (2009) **JBP1 and JBP2 are two distinct thymidine hydroxylases involved in J biosynthesis in genomic DNA of African trypanosomes.** *Nucleic Acids Res*, **37** (5): 1452-1462.

Cools, J., DeAngelo, D.J., Gotlib, J., Stover, E.H., Legare, R.D., Cortes, J., Kutok, J., Clark, J., Galinsky, I., Griffin, J.D., Cross, N.C., Tefferi, A., Malone, J., Alam, R., Schrier, S.L., Schmid, J., Rose, M., Vandenberghe, P., Verhoef, G., Boogaerts, M., Wlodarska, I., Kantarjian, H., Marynen, P., Coutre, S.E., Stone, R., and Gilliland, D.G. (2003) **A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome.** *N Engl J Med*, **348** (13): 1201-1214.

Cortázar, D., Kunz, C., Selfridge, J., Lettieri, T., Saito, Y., MacDougall, E., Wirz, A., Schuermann, D., Jacobs, A.L., Siegrist, F., Steinacher, R., Jiricny, J., Bird, A., and Schär, P. (2011) **Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability.** *Nature*, **470** (7334): 419-423.

Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., Abramowitz, L.K., Bartolomei, M.S., Rambow, F., Bassi, M.R., Bruno, T., Fanciulli, M., Renner, C., Klein-Szanto, A.J., Matsumoto, Y., Kobi, D., Davidson, I., Alberti, C., Larue, L., and Bellacosa, A. (2011) **Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair.** *Cell*, **146** (1): 67-79.

Couronné, L., Lippert, E., Andrieux, J., Kosmider, O., Radford-Weiss, I., Penther, D., Dastugue, N., Mugneret, F., Lafage, M., Gachard, N., Nadal, N., Bernard, O. A., and Nguyen-Khac, F. on behalf of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (2010) **Analyses of TET2 mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias.** *Leukemia*, **24** (1): 201-203.

Couronné, L., Bastard, C., and Bernard, O.A. (2012) **TET2 and DNMT3A Mutations in Human T-Cell Lymphoma.** *N Engl J Med*, **366** (1): 95-96.

Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R.W., Peng, W., and Zhao, K. (2009) **Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation.** *Cell Stem Cell*, **4** (1): 80-93.

Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F., and Godin, I. (1996) **Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura.** *Cell*, **86** (6): 907-916.

Cumano, A., and Godin, I. (2007) **Ontogeny of the hematopoietic system.** *Annu Rev Immunol*, **25**: 745-85.

Damm, F., Nguyen-Khac, F., Kosmider, O., Fontenay, M., and Bernard, O.A. (2012a) **Mutations in genes involved in splicing in human malignancies.** *Med Sci (Paris)*, **28** (5): 449-453.

Damm, F., Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Carbuccia, N., Hidalgo-Curtis, C., Della-Valle, V., Couronné, L., Scourzic, L., Chesnais, V., Guerci-Bresler, A., Slama, B., Beyne-Rauzy, O., Schmidt-Tanguy, A., Stamatoullas-Bastard, A., Dreyfus, F., Prébet, T., de Botton, S., Vey, N., Morgan, M.A., Cross, N.C., Preudhomme, C., Birnbaum, D., Bernard, O.A., and Fontenay, M. (2012b) **Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes.** *Blood*, **119** (14): 3211-3218.

Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., Marks, K.M., Prins, R.M., Ward, P.S., Yen, K.E., Liao, L.M., Rabinowitz, J.D., Cantley, L.C., Thompson, C.B., Vander Heiden, M.G., and Su, S.M. (2009) **Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate.** *Nature*, **462** (7274): 739-744.

Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., Druker, B., and Gilliland, D.G. (2002) **A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (11): 7622-7627.

Dawlaty, M.M., Ganz, K., Powell, B.E., Hu, Y.C., Markoulaki, S., Cheng, A.W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S.W., Page, D.C., and Jaenisch, R. (2011) **Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development.** *Cell Stem Cell*, **9** (2): 166-175.

Deaton, A.M., and Bird, A. (2011) **CpG islands and the regulation of transcription.** *Genes Dev*, **25** (10): 1010-1022.

Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Massé, A., Godin, I., Le Couedic, J.P., Debili, N., Saulnier, P., Casadevall, N., Vainchenker, W., and Giraudier, S. (2007) **Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis.** *Blood*, **109** (1): 71-77.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguíé, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., and Bernard, O.A. (2009) **Mutation in *TET2* in myeloid cancers.** *N Engl J Med*, **360** (22): 2289-2301.

Deneberg, S., Guardiola, P., Lennartsson, A., Qu, Y., Gaidzik, V., Blanchet, O., Karimi, M., Bengtzen, S., Nahi, H., Uggla, B., Tidefelt, U., Höglund, M., Paul, C., Ekwall, K., Döhner, K., and Lehmann, S. (2011) **Prognostic DNA methylation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks.** *Blood*, **118** (20): 5573-5582.

Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., and Bloomfield, C.D. ; European LeukemiaNet (2010) **Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet.** *Blood*, **115** (3): 453-474.

Dunbar, A.J., Gondek, L.P., O'Keefe, C.L., Makishima, H., Rataul, M.S., Szpurka, H., Sekeres, M.A., Wang, X.F., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2008) **250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of *c-Cbl*, in myeloid malignancies.** *Cancer Res*, **68** (24): 10349-10357.

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H.G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boulwood, J., and Cross, N.C. (2010) **Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders.** *Nat Genet*, **42** (8): 722-726.

Esteller, M. (2008) **Epigenetics in cancer.** *N Engl J Med*, **358** (11): 1148-1159.

Faust, C., Schumacher, A., Holdener, B., and Magnuson, T. (1995) **The *eed* mutation disrupts anterior mesoderm production in mice.** *Development*, **121** (2): 273-285.

Fenaux, P., Mufti, G.J., Hellstrom-Lindberg, E., Santini, V., Finelli, C., Giagounidis, A., Schoch, R., Gattermann, N., Sanz, G., List, A., Gore, S.D., Seymour, J.F., Bennett, J.M., Byrd, J., Backstrom, J., Zimmerman, L., McKenzie, D., Beach, C., and Silverman, L.R. ; International Vidaza High-Risk MDS Survival Study Group. (2009) **Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study.** *Lancet Oncol*, **10** (3): 223-232.

Flusberg, B.A., Webster, D.R., Lee, J.H., Travers, K.J., Olivares, E.C., Clark, T.A., Korlach, J., and Turner, S.W. (2010) **Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing.** *Nat Methods*, **7** (6): 461-465.

Ficz, G., Branco, M.R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T.A., Marques, C.J., Andrews, S., and Reik, W. (2011) **Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation.** *Nature*, **473** (7347): 398-402.

Figueroa, M.E., Skrabanek, L., Li, Y., Jiemjit, A., Fandy, T.E., Paietta, E., Fernandez, H., Tallman, M.S., Grealley, J.M., Carraway, H., Licht, J.D., Gore, S.D., and Melnick, A. (2009) **MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation.** *Blood*, **114** (16): 3448-3458.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Sun, Z., Wolniak, K., Peeters, J.K., Liu, W., Choe, S.E., Fantin, V.R., Paietta, E., Löwenberg, B., Licht, J.D., Godley, L.A., Delwel, R., Valk, P.J., Thompson, C.B., Levine, R.L., and Melnick, A. (2010a) **Leukemic *IDH1* and *IDH2* mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt *TET2* function, and impair hematopoietic differentiation.** *Cancer Cell*, **18** (6): 553-567.

Figuroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., Campagne, F., Mazumdar, M., Grealley, J.M., Valk, P.J., Löwenberg, B., Delwel, R., and Melnick, A. (2010b) **DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia.** *Cancer Cell*, **17** (1): 13-27.

Fisher, C.L., Lee, I., Bloyer, S., Bozza, S., Chevalier, J., Dahl, A., Bodner, C., Helgason, C.D., Hess, J.L., Humphries, R.K., and Brock, H.W. (2010a) **Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice.** *Dev Biol*, **337** (1): 9-15.

Fisher, C.L., Pineault, N., Brookes, C., Helgason, C.D., Ohta, H., Bodner, C., Hess, J.L., Humphries, R.K., and Brock, H.W. (2010b) **Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia.** *Blood*, **115** (1): 38-46.

Freudenberg, J.M., Ghosh, S., Lackford, B.L., Yellaboina, S., Zheng, X., Li, R., Cuddapah, S., Wade, P.A., Hu, G., and Jothi, R. (2011) **Acute depletion of Tet1-dependent 5-hydroxymethylcytosine levels impairs LIF/Stat3 signaling and results in loss of embryonic stem cell identity.** *Nucleic Acids Res*, **40** (8): 3364-3377.

Fröhling, S., and Döhner, H. (2008) **Chromosomal abnormalities in cancer.** *N Engl J Med*, **359** (7): 722-734.

Gallant, P. (2007) **Control of transcription by Pontin and Reptin.** *Trends Cell Biol*, **17** (4): 187-192.

Gaudet, F., Hodgson, J.G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J.W., Leonhardt, H., and Jaenisch, R. (2003) **Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.** *Science*, **300** (5618): 489-492.

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Aceto, N., Remy, V., Pinson, S., Houdayer, C., Arnoulet, C., Sainy, D., Bentires-Alj, M., Olschwang, S., Vey, N., Mozziconacci, M.J., Birnbaum, D., and Chaffanet, M. (2008) **Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes.** *BMC Cancer*, **8**: 299-315.

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainy, D., Olschwang, S., Xerri, L., Chaffanet, M., Mozziconacci, M.J., Vey, N., and Birnbaum, D. (2009) **Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia.** *Br J Haematol*, **145** (6): 788-800.

Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Roquain, J., Adélaïde, J., Carbuccia, N., Esterni, B., Finetti, P., Murati, A., Arnoulet, C., Zerazhi, H., Fezoui, H., Tadriz, Z., Nezri, M., Chaffanet, M., Mozziconacci, M.J., Vey, N., and Birnbaum, D. (2010) **ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia.** *Br J Haematol*, **151** (4): 365-375.

Gilliland, D.G., and Griffin, J.D. (2002) **The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia.** *Blood*, **100** (5): 1532-1542.

Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., and Carell T. (2010) **Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates.** *PLoS One*, **5** (12): e15367.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005) **Eukaryotic cytosine methyltransferases.** *Annu Rev Biochem*, **74**: 481-514.

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006) **Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.** *Science*, **311** (5759): 395-8.

Gondek, L.P., Dunbar, A.J., Szpurka, H., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2007) **SNP array karyotyping allows for the detection of uniparental disomy and cryptic chromosomal abnormalities in MDS/MPD-U and MPD.** *PLoS One*, **2** (11): e1225.

Gondek, L.P., Tiu, R., O'Keefe, C.L., Sekeres, M.A., Theil, K.S., and Maciejewski, J.P. (2008) **Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML.** *Blood*, **111** (3): 1534-1542.

Grand, F.H., Hidalgo-Curtis, C.E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., Oscier, D., Hall, A., Brandts, C., Serve, H., Reiter, A., Chase, A.J., and Cross, N.C. (2009) **Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms.** *Blood*, **113** (24): 6182-6192.

Graubert, T.A., Payton, M.A., Shao, J., Walgren, R.A., Monahan, R.S., Frater, J.L., Walshauer, M.A., Martin, M.G., Kasai, Y., and Walter, M.J. (2009) **Integrated genomic analysis implicates haploinsufficiency of multiple chromosome 5q31.2 genes in de novo myelodysplastic syndromes pathogenesis.** *PLoS One*, **4** (2): e4583.

Graubert, T.A., Shen, D., Ding, L., Okeyo-Owuor, T., Lunn, C.L., Shao, J., Krysiak, K., Harris, C.C., Koboldt, D.C., Larson, D.E., McLellan, M.D., Dooling, D.J., Abbott, R.M., Fulton, R.S., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Grillo, M., Baty, J., Heath, S., Frater, J.L., Nasim, T., Link, D.C., Tomasson, M.H., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Mardis, E.R., Ley, T.J., Wilson, R.K., and Walter, M.J. (2011) **Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes.** *Nat Genet*, **44** (1): 53-57.

Green, A., and Beer, P. (2010) **Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms.** *N Engl J Med*, **362** (4): 369-370.

Green, C.L., Evans, C.M., Zhao, L., Hills, R.K., Burnett, A.K., Linch, D.C., and Gale, R.E. (2011) **The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation.** *Blood*, **118** (2): 409-412.

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M.M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., and Bennett, J. (1997) **International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.** *Blood*, **89** (6): 2079-2088.

Gross, S., Cairns, R.A., Minden, M.D., Driggers, E.M., Bittinger, M.A., Jang, H.G., Sasaki, M., Jin, S., Schenkein, D.P., Su, S.M., Dang, L., Fantin, V.R., and Mak, T.W. (2010) **Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations.** *J Exp Med*, **207** (2): 339-344.

Grossmann, V., Kohlmann, A., Eder, C., Haferlach, C., Kern, W., Cross, N.C., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2011) **Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance.** *Leukemia*, **25** (5): 877-879.

Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S.G., Iqbal, K., Shi, Y.G., Deng, Z., Szabó, P.E., Pfeifer, G.P., Li, J., and Xu, G.L. (2011) **The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.** *Nature*, **477** (7366): 606-610.

Guglielmelli, P., Biamonte, F., Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Cervantes, F., Maffioli, M., Fanelli, T., Ernst, T., Winkelmann, N., Jones, A.V., Zoi, K., Reiter, A., Duncombe, A., Villani, L., Bosi, A., Barosi, G., Cross, N.C., and Vannucchi, A.M. (2011) **EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis.** *Blood*, **118** (19): 5227-5234.

Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., and Song, H. (2011) **Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain.** *Cell*, **145** (3): 423-434.

Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lübbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A.A., Aul, C., Trümper, L., Krieger, O., Stauder, R., Müller, T.H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C., and Steidl, C. (2007) **New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients.** *Blood*, **110** (13): 4385-4395.

Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002) **Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells.** *Mech Dev*, **117** (1-2): 15-23.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011) **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, **144** (5): 646-674.

Harrison, C.J., Cuneo, A., Clark, R., Johansson, B., Lafage-Pochitaloff, M., Mugneret, F., Moorman, A.V., and Secker-Walker, L.M. (1999) **Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. European 11q23 Workshop participants.** *Leukemia*, **12** (5): 811-822.

He, Y.F., Li, B.Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C.X., Zhang, K., He, C., and Xu, G.L. (2011) **Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA.** *Science*, **333** (6047): 1303-1307.

Herrera-Merchan, A., Arranz, L., Ligos, J.M., de Molina, A., Dominguez, O., and Gonzalez, S. (2012) **Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease.** *Nat Commun*, **3**: 623.

Ho, P.A., Kutny, M.A., Alonzo, T.A., Gerbing, R.B., Joaquin, J., Raimondi, S.C., Gamis, A.S., and Meshinchi, S. (2011) **Leukemic mutations in the methylation-associated genes DNMT3A and IDH2 are rare events in pediatric AML: a report from the Children's Oncology Group.** *Pediatr Blood Cancer*, **57** (2): 204-209.

Huang, Y., Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., and Rao, A. (2010) **The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing.** *PLoS One*, **5** (1): e8888.

Hussein, K., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Van Dyke, D.L., Levine, R.L., Hanson, C.A., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2010) **Cytogenetic correlates of TET2 mutations in 199 patients with myeloproliferative neoplasms.** *Am J Hematol*, **85** (1): 81-83.

Inoue, A., and Zhang, Y. (2011) **Replication-Dependent Loss of 5-Hydroxymethylcytosine in Mouse Preimplantation Embryos.** *Science*, **334** (6053): 194.

Inoue, A., Shen, L., Dai, Q., He, C., and Zhang, Y. (2011) **Generation and replication-dependent dilution of 5fC and 5caC during mouse preimplantation development.** *Cell Res*, **21** (12): 1670-1676.

Iqbal, K., Jin, S.G., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2011) **Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108** (9): 3642-3647.

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** (7310): 1129-1133.

Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011) **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.** *Science*, **333** (6047): 1300-1303.

Itzykson, R., Kosmider, O., Cluzeau, T., Mansat-De Mas, V., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Vey, N., Gelsi-Boyer, V., Raynaud, S., Preudhomme, C., Adès, L., Fenaux, P., and Fontenay, M.; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM) (2011) **Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias.** *Leukemia*, **25** (7): 1147-1152.

Iwasaki, H., Mizuno, S., Wells, R.A., Cantor, A.B., Watanabe, S., and Akashi, K. (2003) **GATA-1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages.** *Immunity*, **19** (3): 451-462.

Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007) **Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell.** *Immunity*, **26** (6): 726-740.

Izumi, N., Yamashita, A., Iwamatsu, A., Kurata, R., Nakamura, H., Saari, B., Hirano, H., Anderson, P., and Ohno, S. (2010) **AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay.** *Sci Signal*, **3** (116): ra27.

Jackson, M., Krassowska, A., Gilbert, N., Chevassut, T., Forrester, L., Ansell, J., and Ramsahoye, B. (2004) **Severe global DNA hypomethylation blocks differentiation and induces histone hyperacetylation in embryonic stem cells.** *Mol Cell Biol*, **24** (20): 8862-8871.

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.

Jäger, R., Gisslinger, H., Passamonti, F., Rumi, E., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Harutyunyan, A., Klampfl, T., Olcaydu, D., Cazzola, M., and Kralovics, R. (2010) **Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **24** (7): 1290-1298.

James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (2005) **A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera.** *Nature*, **434** (7037): 1144-1148.

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** (25): 6403-6410.

Jankowska, A.M., Makishima, H., Tiu, R.V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., Visconte, V., Sugimoto, Y., Prince, C., O'Keefe, C., Hsi, E.D., List, A., Sekeres, M.A., Rao, A., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2011) **Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2 and DNMT3A.** *Blood*, **118** (14): 3932-3941.

Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L.P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., Sekeres, M., Sauntharajah, Y., and Maciejewski, J.P. (2009) **Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML.** *Blood*, **113** (6): 1315-1325.

Jin, S.G., Kadam, S., and Pfeifer, G.P. (2010) **Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine.** *Nucleic Acids Res*, **38** (11): e125.

Jin, S.G., Wu, X., Li, A.X., and Pfeifer, G.P. (2011) **Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain.** *Nucleic Acids Res*, **39** (12): 5015-5024.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007) **The epigenomics of cancer.** *Cell*, **128** (4): 683-692.

Jørgensen, H.F., Ben-Porath, I., and Bird, A.P. (2004) **Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains.** *Mol Cell Biol*, **24** (8): 3387-3395.

Kalender Atak, Z., De Keersmaecker, K., Gianfelici, V., Geerdens, E., Vandepoel, R., Pauwels, D., Porcu, M., Lahortiga, I., Brys, V., Dirks, W.G., Quentmeier, H., Cloos, J., Cuppens, H., Uyttebroeck, A., Vandenberghe, P., Cools, J., and Aerts, S. (2012) **High accuracy mutation detection in leukemia on a selected panel of cancer genes.** *PLoS One*, **7** (6): e38463.

Kajiume, T., Ohno, N., Sera, Y., Kawahara, Y., Yuge, L., and Kobayashi, M. (2009) **Reciprocal expression of Bmi1 and Mel-18 is associated with functioning of primitive hematopoietic cells.** *Exp Hematol*, **37** (7): 857-866.

Kamminga, L.M., Bystrykh, L.V., de Boer, A., Houwer, S., Douma, J., Weersing, E., Dontje, B., and de Haan, G. (2006) **The Polycomb group gene Ezh2 prevents hematopoietic stem cell exhaustion.** *Blood*

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006) **Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay.** *Genes Dev*, **20** (3): 355-367.

Kelly, L.M., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L., Amaral, S.M., Curley, D.P., Ley, T.J., and Gilliland, D.G. (2002) **PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model.** *Proc Natl Acad sci USA*, **99** (12): 8283-8288.

Kelly, L.M., and Gilliland, D.G. (2002) **Genetics of myeloid leukemias.** *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **3**: 179-198.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005) **SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells.** *Cell*, **121** (7): 1109-1121.

Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008) **Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells.** *Nat Rev Immunol*, **8** (4): 290-301.

Knudson, A.G. (1971) **Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68** (4): 820-823.

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., Liu, X.S., Aravind, L., Agarwal, S., Maciejewski, J.P., and Rao, A. (2010) **Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.** *Nature*, **468** (7325): 839-843.

Ko, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Thompson, E.C., Hastie, R., Tsangaratou, A., Rajewsky, K., Korralov, S.B., and Rao, A. (2011) **Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108** (35): 14566-14571.

Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., Lahesmaa, R., Orkin, S.H., Rodig, S.J., Daley, G.Q., and Rao, A. (2011) **Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells.** *Cell Stem Cell*, **8** (2): 200-213.

Kohlmann, A., Grossmann, V., Klein, H.U., Schindela, S., Weiss, T., Kazak, B., Dicker, F., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., Haferlach, C., and Haferlach, T. (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** (24): 3858-3865.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997) **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.** *Cell*, **91** (5): 661-672.

Konstandin, N., Bultmann, S., Szwagierczak, A., Dufour, A., Ksienzyk, B., Schneider, F., Herold, T., Mulaw, M., Kakadia, P.M., Schneider, S., Spiekermann, K., Leonhardt, H., and Bohlander, S.K. (2011) **Genomic 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with TET2 mutations and a distinct global gene expression pattern in secondary acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, **25** (10): 1649-1652.

Kopp, H.G., Avecilla, S.T., Hooper, A.T., and Rafii, S. (2005) **The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization.** *Physiology (Bethesda)*, **20** :349-356.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Cheok, M., Grabar, S., Della-Valle, V., Picard, F., Viguié, F., Quesnel, B., Beyne-Rauzy, O., Solary, E., Vey, N., Hunault-Berger, M., Fenaux, P., Mansat-De Mas, V., Delabesse, E., Guardiola, P., Lacombe, C., Vainchenker, W., Preudhomme, C., Dreyfus, F., Bernard, O.A., Birnbaum, D., and Fontenay, M.; Groupe Francophone des Myélodysplasies. (2009a) **TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs).** *Blood*, **114** (15): 3285-3291.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Ciudad, M., Racœur, C., Jooste, V., Vey, N., Quesnel, B., Fenaux, P., Bastie, J. N., Beyne-Rauzy, O., Stamatoulas, A., Dreyfus, F., Ifrah, N., de Botton, S., Vainchenker, W., Bernard, O. A., Birnbaum, D., Fontenay, M., and Solary, E. (2009b) **TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia.** *Haematologica*, **94** (12): 1676-1681.

Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Slama, L., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., Quesnel, B., Hunault-Berger, M., Slama, B., Vey, N., Lacombe, C., Solary, E., Birnbaum, D., Bernard, O. A., and Fontenay, M. (2010) **Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **24** (5): 1094-1096.

Kouzarides, T. (2007) **Chromatin modifications and their function.** *Cell*, **128** (4): 693-705.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005) **A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.** *N Engl J Med*, **352** (17): 1779–1790.

Kralovics, R., Teo, S.S., Li, S., Theocharides, A., Buser, A.S., Tichelli, A., and Skoda, R.C. (2006) **Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders.** *Blood*, **108** (4): 1377-1380.

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

Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., Adli, M., Kasif, S., Ptaszek, L.M., Cowan, C.A., Lander, E.S., Koseki, H. and Bernstein, B.E. (2008) **Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains.** *PLoS Genet*, **4** (10): e1000242.

Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., Nagae, G., Yoshida, H., Aburatani, H., and Koike, K. (2012) **Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation.** *Cancer Sci*, **103** (4): 670-676.

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995) **Inducible gene targeting in mice.** *Science*, **269** (5229): 1427-1429.

Kunimoto, H., Fukuchi, Y., Sakurai, M., Sadahira, K., Ikeda, Y., Okamoto, S., and Nakajima, H. (2012) **Tet2 disruption leads to enhanced self-renewal and altered differentiation of fetal liver hematopoietic stem cells.** *Sci Rep*, **2**: 273.

Kuo, M.C., Liang, D.C., Huang, C.F., Shih, Y.S., Wu, J.H., Lin, T.L., and Shih, L.Y. (2009) **RUNX1 mutations are frequent in chronic myelomonocytic leukemia and mutations at the C-terminal region might predict acute myeloid leukemia transformation.** *Leukemia*, **23** (8): 1426-1431.

Küppers, R. (2005) **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.** *Nat Rev Cancer*, **5** (4): 251-262.

Kusy, S., Gault, N., Ferri, F., Lewandowski, D., Barroca, V., Jaracz-Ros, A., Losson, R., and Romeo, P.H. (2011) **Adult hematopoiesis is regulated by TIF1 γ , a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity.** *Cell Stem Cell*, **8** (4): 412-425.

Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2006) **JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis.** *Blood*, **108** (5): 1652-1660.

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., Kamping, E.J., Verhoef, G.E., Verburgh, E., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B.A., and Jansen, J.H. (2009) **Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes.** *Nat Genet*, **41** (7): 838-842.

Langemeijer, S.M., Jansen, J.H., Hooijer, J., van Hoogen, P., Stevens-Linders, E., Massop, M., Waanders, E., van Reijmersdal, S.V., Stevens-Kroef, M.J., Zwaan, C.M., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Sonneveld, E., Hoogerbrugge, P.M., van Kessel, A.G., and Kuiper, R.P. (2011) **TET2 mutations in childhood leukemia.** *Leukemia*, **25** (1): 189-192.

Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsiganos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J., and Wei, C.L. (2010) **Dynamic changes in the human methylome during differentiation.** *Genome Res*, **20** (3): 320-331.

Lee, J.H., Voo, K.S., and Skalnik, D.G. (2001) **Identification and characterization of the DNA binding domain of CpG-binding protein.** *J Biol Chem*, **276** (48): 44669-44676.

Lee, S.W., Cho, Y.S., Na, J.M., Park, U.H., Kang, M., Kim, E.J., and Um, S.J. (2010) **ASXL1 represses retinoic acid receptor-mediated transcription through associating with HP1 and LSD1.** *J Biol Chem*, **285** (1): 18-29.

Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Jüttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R., and Li, E. (1996) **De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells.** *Development*, **122** (10): 3195-3205.

Lessard, J., Schumacher, A., Thorsteinsdottir, U., van Lohuizen, M., Magnuson, T., and Sauvageau, G. (1999) **Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation.** *Genes Dev*, **13** (20): 2691-2703.

Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003) **Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells.** *Nature*, **423** (6937): 255-260.

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Fröhling, S., Döhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., and Gilliland, D.G. (2005a) **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** *Cancer Cell*, **7** (4): 387-397.

Levine, R.L., and Carroll, M. (2009) **A common genetic mechanism in malignant bone marrow diseases.** *N Engl J Med*, **360** (22): 2355-2357.

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., Harris, C.C., Lichti, C.F., Townsend, R.R., Fulton, R.S., Dooling, D.J., Koboldt, D.C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J.R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J.F., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Magrini, V.J., Vickery, T.L., Hundal, J., Cook, L.L., Conyers, J.J., Swift, G.W., Reed, J.P., Alldredge, P.A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M.A., Heath, S., Shannon, W.D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Link, D.C., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Mardis, E.R., and Wilson, R.K. (2010) **DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, **363** (25): 2424-2433.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992) **Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.** *Cell*, **69** (6): 915-926.

Li, S., and Wilkinson, M.F. (1998) **Nonsense surveillance in lymphocytes?** *Immunity*, **8** (2): 135-141.

Li, W., and Liu, M. (2011) **Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues.** *J Nucleic Acids*, **2011**: 870726.

Li, Z., Cai, X., Cai, C., Wang, J., Zhang, W., Petersen, B.E., Yang, F.-C., and Xu, M. (2011b) **Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies.** *Blood*, **118** (17): 4509-4518.

Lim, K.H., Pardanani, A., Butterfield, J.H., Li, C.Y., and Tefferi, A. (2009) **Cytoreductive therapy in 108 adults with systemic mastocytosis: Outcome analysis and response prediction during treatment with interferon-alpha, hydroxyurea, imatinib mesylate or 2-chlorodeoxyadenosine.** *Am J Hematol*, **84** (12): 790-794.

Lim, D.H. and Maher, E.R. (2010) **Genomic imprinting syndromes and cancer.** *Adv Genet*, **70**: 145-175.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., and Ecker, J.R. (2009) **Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences.** *Nature*, **462** (7271): 315-322.

Loenarz, C., and Schofield, C.J. (2008) **Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases.** *Nat Chem Biol*, **4** (3): 152-156.

Lorsbach, R.B., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S.C., Mukatira, S.T., and Downing, J.R. (2003) **TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in AML containing the t(10;11)(q22;q23).** *Leukemia*, **17** (3): 637-641.

Lu, J., He, M.L., Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Dong, Q., Chen, Y.C., Peng, Y., Yao, K.T., Kung, H.F., and Li, X.P. (2011) **miR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2.** *Cancer Res*, **71** (1): 225-233.

Luc, S., Buza-Vidas, N., and Jacobsen, S.E. (2008) **Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment.** *Semin Immunol*, **20** (4): 213-220.

Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R., and Misteli, T. (2011) **Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing.** *Cell*, **144** (1): 16-26.

Lujambio, A., Portela, A., Liz, J., Melo, S.A., Rossi, S., Spizzo, R., Croce, C.M., Calin, G.A., and Esteller, M. (2010) **CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer.** *Oncogene*, **29** (48): 6390-6401.

Majewski, I.J., Blewitt, M.E., de Graaf, C.A., McManus, E.J., Bahlo, M., Hilton, A.A., Hyland, C.D., Smyth, G.K., Corbin, J.E., Metcalf, D., Alexander, W.S. and Hilton, D.J. (2008) **Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity.** *PLoS Biol*, **6** (4): e93.

Majewski, I.J., Ritchie, M.E., Phipson, B., Corbin, J., Pakusch, M., Ebert, A., Busslinger, M., Koseki, H., Hu, Y., Smyth, G.K., Alexander, W.S., Hilton, D.J., and Blewitt, M.E. (2010) **Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells.** *Blood*, **116** (5): 731-739.

Makishima, H., Cazzolli, H., Szpurka, H., Dunbar, A., Tiu, R., Huh, J., Muramatsu, H., O'Keefe, C., Hsi, E., Paquette, R.L., Kojima, S., List, A.F., Sekeres, M.A., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2009) **Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies.** *J Clin Oncol*, **27** (36): 6109-6116.

Makishima, H., Jankowska, A.M., Tiu, R.V., Szpurka, H., Sugimoto, Y., Hu, Z., Sauntharajah, Y., Guinta, K., Keddache, M.A., Putnam, P., Sekeres, M.A., Moliterno, A.R., List, A.F., McDevitt, M.A., and Maciejewski, J.P. (2010) **Novel homo- and hemizygous mutations in *EZH2* in myeloid malignancies.** *Leukemia*, **24** (10): 1799-1804.

Makishima, H., Jankowska, A.M., McDevitt, M.A., O'Keefe, C., Dujardin, S., Cazzolli, H., Przychodzen, B., Prince, C., Nicoll, J., Siddaiah, H., Shaik, M., Szpurka, H., Hsi, E., Advani, A., Paquette, R., and Maciejewski, J.P. (2011) ***CBL*, *CBLB*, *TET2*, *ASXL1*, and *IDH1/2* mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia.** *Blood*, **117** (21): e198-206.

Marcucci, G., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Holland, K.B., Whitman, S.P., Becker, H., Schwind, S., Metzeler, K.H., Powell, B.L., Carter, T.H., Kolitz, J.E., Wetzler, M., Carroll, A.J., Baer, M.R., Caligiuri MA, Larson, R.A., and Bloomfield, C.D. (2010) ***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*, **28** (14): 2348-2355.

Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaunty, K.D., McGrath, S.D., Fulton, L.A., Locke, D.P., Magrini, V.J., Abbott, R.M., Vickery, T.L., Reed, J.S., Robinson, J.S., Wylie, T., Smith, S.M., Carmichael, L., Eldred, J.M., Harris, C.C., Walker, J., Peck, J.B., Du, F., Dukes, A.F., Sanderson, G.E., Brummett, A.M., Clark, E., McMichael, J.F., Meyer, R.J., Schindler, J.K., Pohl, C.S., Wallis, J.W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y., Haipek, C., Wiechert, M.E., Ivy, J.V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R.E., Payton, J.E., Westervelt, P., Tomasson, M.H., Watson, M.A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W.D., Nagarajan, R., Link, D.C., Walter, M.J., Graubert, T.A., DiPersio, J.F., Wilson, R.K., and Ley, T.J. (2009) **Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome.** *N Engl J Med*, **361** (11): 1058-1066.

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.C., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2010) **Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of *JAK2V617F* in knock-in mice.** *Blood*, **116** (5): 783-787.

Matera, A.G., Terns R.M., and Terns, M.P. (2007) **Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8** (3): 209-220.

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

Metzeler, K.H., Maharry, K., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Margeson, D., Becker, H., Curfman, J., Holland, K.B., Schwind, S., Whitman, S.P., Wu, Y.Z., Blum, W., Powell, B.L., Carter, T.H., Wetzler, M., Moore, J.O., Kolitz, J.E., Baer, M.R., Carroll, A.J., Larson, R.A., Caligiuri, M.A., Marcucci, G., and Bloomfield, C.D. (2011) ***TET2* mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study.** *J Clin Oncol*, **29** (10): 1373-1381.

Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., Delabesse, E., de Oliveira, M.P., Cavé, H., Clappier, E., van Dongen, J.J., Balgobind, B.V., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Beverloo, H.B., Panzer-Grümayer, R., Teigler-Schlegel, A., Harbott, J., Kjeldsen, E., Schnittger, S., Koehl, U., Gruhn, B., Heidenreich, O., Chan, L.C., Yip, S.F., Krzywinski, M., Eckert, C., Möricke, A., Schrappe, M., Alonso, C.N., Schäfer, B.W., Krauter, J., Lee, D.A., Zur Stadt, U., Te Kronnie, G., Sutton, R., Izraeli, S., Trakhtenbrot, L., Lo Nigro, L., Tsauro, G., Fechina, L., Szczepanski, T., Strehl, S., Ilencikova, D., Molkenin, M., Burmeister, T., Dingermann, T., Klingebiel, T., and Marschalek, R. (2009) **New insights to the *MLL* recombinome of acute leukemias.** *Leukemia*, **23** (8): 1490-1409.

Mikkola, H.K., and Orkin, S.H. (2006) **The journey of developing hematopoietic stem cells.** *Development*, **133** (19): 3733-3744.

Mochizuki-Kashio, M., Mishima, Y., Miyagi, S., Negishi, M., Saraya, A., Konuma, T., Shinga, J., Koseki, H., and Iwama, A. (2011) **Dependency on the polycomb gene Ezh2 distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells.** *Blood*, **118** (25): 6553-6561.

Mohammad, H.P., Cai, Y., McGarvey, K.M., Easwaran, H., van Neste, L., Ohm, J.E., O'Hagan, H.M., and Baylin, S.B. (2009) **Polycomb CBX7 promotes initiation of heritable repression of genes frequently silenced with cancer-specific DNA hypermethylation.** *Cancer Res*, **69** (15): 6322-6330.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S.D., Melnick, A., Godley, L.A., Aifantis, I., and Levine, R.L. (2011) **Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation.** *Cancer Cell*, **20** (1): 11-24.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005) **Epigenetic reprogramming in mammals.** *Hum Mol Genet*, **14** (Spec No 1): R47-R58.

Morin, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Mungall, A.J., An, J., Goya, R., Paul, J.E., Boyle, M., Woolcock, B.W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R.K., Griffith, O.L., Shah, S., Zhu, H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J.F., Tcherpakov, M., Corbett, R., Tam, A., Varhol, R., Smailus, D., Moksa, M., Zhao, Y., Delaney, A., Qian, H., Birol, I., Schein, J., Moore, R., Holt, R., Horsman, D.E., Connors, J.M., Jones, S., Aparicio, S., Hirst, M., Gascoyne, R.D., and Marra, M.A. (2010) **Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin.** *Nat Genet*, **42** (2): 181-185.

Morrison, S.J., and Weissman, I.L. (1994) **The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.** *Immunity*, **1** (8): 661-673.

Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002) **Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex.** *Cell*, **111** (2): 197-208.

Mullighan, C.G. (2009) **TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies.** *Nat Genet*, **41** (7): 766-767. **New and Views.**

Münzel, M., Globisch, D., Brückl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakis, S., Müller, M., Biel, M., and Carell, T. (2010) **Quantification of the sixth DNA base hydroxymethylcytosine in the brain.** *Angew Chem Int Ed Engl*, **49** (31): 5375-5377.

Myers, S.A., Panning, B., and Burlingame, A.L. (2011) **Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108** (23): 9490-9495.

Nakajima, H. (2011) **Role of transcription factors in differentiation and reprogramming of hematopoietic cells.** *Keio J Med*, **60** (2): 47-55.

Nakayama, M., Kikuno, R., and Ohara, O. (2002) **Protein-protein interactions between large proteins: two-hybrid screening using a functionally classified library composed of long cDNAs.** *Genome Res*, **12** (11): 1773-1784.

Nestor, C., Ruzov, A., Meehan, R., and Dunican, D. (2010) **Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA.** *Biotechniques*, **48** (4): 317-319.

Nibourel, O., Kosmider, O., Cheok, M., Boissel, N., Renneville, A., Philippe, N., Dombret, H., Dreyfus, F., Quesnel, B., Geffroy, S., Quentin, S., Roche-Lestienne, C., Cayuela, J. M., Roumier, C., Fenaux, P., Vainchenker, W., Bernard, O. A., Soulier, J., Fontenay, M., and Preudhomme, C. (2010) **Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission.** *Blood*, **116** (7): 1132-1135.

Nikoloski, G., Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E.R., van der Heijden, A., Scheele, T.N., Vandenbergh, P., de Witte, T., van der Reijden, B.A., and Jansen, J.H. (2010) **Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes.** *Nat Genet*, **42** (8): 665-667.

Ntziachristos, P., Tsirogos, A., Van Vlierberghe, P., Nedjic, J., Trimarchi, T., Sol Flaherty, M., Ferres-Marco, D., da Ros, V., Tang, Z., Siegle, J., Asp, P., Hadler, M., Rigo, I., De Keersmaecker, K., Patel, J., Huynh, T., Utro, F., Poglio, S., Samon, J.B., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J.M., Rabadan, R., Levine, R.L., Brown, S., Pflumio, F., Dominguez, M., Ferrando, A., and Aifantis, I. (2012) **Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia.** *Nat Med*, **18** (2): 298-301.

O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001) **The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development.** *Mol Cell Biol*, **21** (13): 4330-4336.

Oh, S.T., Simonds, E.F., Jones, C., Hale, M.B., Goltsev, Y., Gibbs, K.D. Jr, Merker, J.D., Zehnder, J.L., Nolan, G.P., and Gotlib, J. (2010) **Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms.** *Blood*, **116** (6): 988-992.

Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998) **Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases.** *Nat Genet*, **19** (3): 219-220.

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

Okuda, T., Cai, Z., Yang, S., Lenny, N., Lyu, C.J., van Deursen, J.M., Harada, H., and Downing, J.R. (1998) **Expression of a knocked-in *AML1-ETO* leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors.** *Blood*, **91** (9): 3134-3143.

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

Oguro, H., Yuan, J., Ichikawa, H., Ikawa, T., Yamazaki, S., Kawamoto, H., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2010) **Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein *Bmi1*.** *Cell Stem Cell*, **6** (3): 279-286.

Orazi, A., and Germing, U. (2008) **The myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: myeloproliferative diseases with dysplastic features.** *Leukemia*, **22** (7): 1308-1319.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996) **Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.** *Science*, **273** (5272): 242-245.

Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000) **Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote.** *Curr Biol*, **10** (8): 475-458.

Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boulton, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J.S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., Godfrey, A.L., Rapado, I., Cvejic, A., Rance, R., McGee, C., Ellis, P., Mudie, L.J., Stephens, P.J., McLaren, S., Massie, C.E., Tarpey, P.S., Varela, I., Nik-Zainal, S., Davies, H.R., Shlien, A., Jones, D., Raine, K., Hinton, J., Butler, A.P., Teague, J.W., Baxter, E.J., Score, J., Galli, A., Della Porta, M.G., Travaglino, E., Groves, M., Tauro, S., Munshi, N.C., Anderson, K.C., El-Naggar, A., Fischer, A., Mustonen, V., Warren, A.J., Cross, N.C., Green, A.R., Futreal, P.A., Stratton, M.R., and Campbell, P.J. ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium (2011) **Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts.** *N Engl J Med*, **365** (15): 1384-1395.

Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., McClure, R.F., Litzow, M.R., Gilliland, D.G., and Tefferi, A. (2006) **MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients.** *Blood*, **108** (10): 3472-3476.

Pardanani, A., Lasho, T., Finke, C., Oh, S.T., Gotlib, J., and Tefferi, A. (2010) **LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations.** *Leukemia*, **24** (10): 1713-1718.

Park, U.H., Yoon, S.K., Park, T., Kim, E.J., and Um, S.J. (2011) **Additional sex comb-like (ASXL) proteins 1 and 2 play opposite roles in adipogenesis via reciprocal regulation of peroxisome proliferator-activated receptor {gamma}.** *J Biol Chem*, **286** (2): 1354-1363.

Parkin, B., Ouillette, P., Wang, Y., Liu, Y., Wright, W., Roulston, D., Purkayastha, A., Dressel, A., Karp, J., Bockenstedt, P., Al-Zoubi, A., Talpaz, M., Kujawski, L., Liu, Y., Shedden, K., Shakhani, S., Li, C., Erba, H., and Malek, S.N. (2010) **NF1 inactivation in adult acute myelogenous leukemia.** *Clin Cancer Res*, **16** (16): 4135-4147.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivari, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A. Jr, Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., and Kinzler, K.W. (2008) **An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.** *Science*, **321** (5897): 1807-1812.

Paschka, P., Marcucci, G., Ruppert, A.S., Mrózek, K., Chen, H., Kittles, R.A., Vukosavljevic, T., Perrotti, D., Vardiman, J.W., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Larson, R.A., and Bloomfield, C.D. ; Cancer and Leukemia Group B (2006) **Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study.** *J Clin Oncol*, **24** (24): 3904-3911.

Pasini, D., Bracken, A.P., Jensen, M.R., Lazzarini Denchi, E., and Helin, K. (2004) **Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity.** *EMBO J*, **23** (20): 4061-4671.

Passegué, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005) **Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates.** *J Exp Med*, **202** (11): 1599-1611.

Pastor, W.A., Pape, U.J., Huang, Y., Henderson, H.R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E.M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., Tahilian, M., Daley, G.Q., Liu, X.S., Ecker, J.R., Milos, P.M., Agarwal, S., and Rao, A. (2011) **Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells.** *Nature*, **473** (7347): 394-397.

Patel, J.P., Gönen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., Huberman, K., Cheng, J., Viale, A., Socci, N.D., Heguy, A., Cherry, A., Vance, G., Higgins, R.R., Ketterling, R.P., Gallagher, R.E., Litzow, M., van den Brink, M.R., Lazarus, H.M., Rowe, J.M., Luger, S., Ferrando, A., Paietta, E., Tallman, M.S., Melnick, A., Abdel-Wahab, O., and Levine, R.L. (2012) **Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, **366** (12): 1079-1089.

Pei, L., Peng, Y., Yang, Y., Ling, X.B., Van Eyndhoven, W.G., Nguyen, K.C., Rubin, M., Hoey, T., Powers, S., and Li, J. (2002) **PRC17, a novel oncogene encoding a Rab GTPase-activating protein, is amplified in prostate cancer.** *Cancer Res*, **62** (19): 5420-5424.

Penn, N.W., Suwalski, R., O'Riley, C., Bojanowski, K., and Yura, R. (1972) **The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid.** *Biochem J*, **126** (4): 781-790.

Pérez, C., Martínez-Calle, N., Martín-Subero, J.I., Segura, V., Delabesse, E., Fernandez-Mercado, M., Garate, L., Alvarez, S., Rifon, J., Varea, S., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Cigudosa, J.C., Calasanz, M.J., Cross, N.C., Prósper, F., and Agirre, X. (2012) **TET2 Mutations Are Associated with Specific 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine Profiles in Patients with Chronic Myelomonocytic Leukemia.** *PLoS One*, **7** (2): e31605.

Pfaffeneder, T., Hackner, B., Truss, M., Münzel, M., Müller, M., Deiml, C.A., Hagemeyer, C., and Carell, T. (2011) **The discovery of 5-formylcytosine in embryonic stem cell DNA.** *Angew Chem Int Ed Engl*, **50** (31): 7008-7012.

Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Clark, J.J., Lee, S.J., Golub, T.R., Wadleigh, M., Gilliland, D.G., and Levine, R.L. (2006) **MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia.** *PLoS Med*, **3** (7): e270.

Pollyea, D.A., Raval, A., Kusler, B., Gotlib, J.R., Alizadeh, A.A., and Mitchell, B.S. (2011) **Impact of TET2 mutations on mRNA expression and clinical outcomes in MDS patients treated with DNA methyltransferase inhibitors.** *Hematol Oncol*, **29** (3): 157-160.

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010) **Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency.** *Nature*, **463** (7284): 1101-1105.

Pronier, E., Almiere, C., Mokrani, H., Vasanthakumar, A., Simon, A., da Costa Reis Monte Mor, B., Massé, A., Le Couédic, J.P., Pendino, F., Carbonne, B., Larghero, J., Ravanat, J.L., Casadevall, N., Bernard, O.A., Droin, N., Solary, E., Godley, L.A., Vainchenker, W., Plo, I., and Delhommeau, F. (2011a) **Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulo-monocytic differentiation of human hematopoietic progenitors.** *Blood*, **118** (9): 2551-2555.

Pronier, E., Quivoron, C., Bernard, O.A., and Villeval, J.L. (2011b) **JAK2^{V617F}/TET2 mutations: does the order matter?** *Haematologica*, **96** (5): 638-640. **Editorial.**

Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H. and Leonard, W.J. (1998) **Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency.** *Nat Genet*, **20** (4): 394-397.

Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G.R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A.J., Beà, S., Pinyol, M., Martínez-Trillos, A., López-Guerra, M., Colomer, D., Navarro, A., Baumann, T., Aymerich, M., Rozman, M., Delgado, J., Giné, E., Hernández, J.M., González-Díaz, M., Puente, D.A., Velasco, G., Freije, J.M., Tubío, J.M., Royo, R., Gelpí, J.L., Orozco, M., Pisano, D.G., Zamora, J., Vázquez, M., Valencia, A., Himmelbauer, H., Bayés, M., Heath, S., Gut, M., Gut, I., Estivill, X., López-Guillermo, A., Puente, X.S., Campo, E., and López-Otín, C. (2012) **Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia.** *Nat Genet*, **44** (1): 47-52.

Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bastard, C., Mercher, T., and Bernard, O.A. (2011) **TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis.** *Cancer Cell*, **20** (1): 25-38.

Rai, K., Huggins, I.J., James, S.R., Karpf, A.R., Jones, D.A., and Cairns, B.R. (2008) **DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45.** *Cell*, **135** (7): 1201-1212.

Ramsahoye, B.H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., and Jaenisch, R. (2000) **Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97** (10): 5237-5242.

Reitman, Z.J., and Yan, H. (2010) **Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism.** *J Natl Cancer Inst*, **102** (13): 932-941.

Ribeiro, A.F., Pratcorona, M., Erpelinck-Verschueren, C., Rockova, V., Sanders, M., Abbas, S., Figueroa, M.E., Zeilemaker, A., Melnick, A., Löwenberg, B., Valk, P.J., and Delwel, R. (2012) **Mutant DNMT3A: a new marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood*, **119** (24): 5824-5831.

Ricci, C., Spinelli, O., Salmoiraghi, S., Finazzi, G., Carobbio, A., and Rambaldi, A. (2012) **ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis.** *Br J Haematol*, **156** (3): 404-407.

Richardson, P.M., and Zon, L.I. (1995) **Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the tre-2 oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and cdc16.** *Oncogene*, **11** (6): 1139-1148.

Roberts, T., Chernova, O., and Cowell, J.K.. (1998) **NB4S, a member of the TBC1 domain family of genes, is truncated as a result of a constitutional t(1;10)(p22;q21) chromosome translocation in a patient with stage 4S neuroblastoma.** *Hum Mol Genet*, **7** (7): 1169-1178.

Roche-Lestienne, C., Marceau, A., Labis, E., Nibourel, O., Coiteux, V., Guilhot, J., Legros, L., Nicolini, F., Rousselot, P., Gardembas, M., Helevaut, N., Frimat, C., Mahon, F.X., Guilhot, F., and Preudhomme, C. (2011) **Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia.** *Leukemia*, **25** (10): 1661-1664.

Rocquain, J., Carbuccia, N., Trouplin, V., Raynaud, S., Murati, A., Nezri, M., Tadrict, Z., Olschwang, S., Vey, N., Birnbaum, D., Gelsi-Boyer, V., and Mozziconacci, M.J. (2010) **Combined mutations of ASXL1, CBL, FLT3, IDH1, IDH2, JAK2, KRAS, NPM1, NRAS, RUNX1, TET2 and WT1 genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias.** *BMC Cancer*, **10**: 401.

Rodríguez-Paredes M, and Esteller M. (2011) **Cancer epigenetics reaches mainstream oncology.** *Nat Med*, **17** (3): 330-339.

Rosenbauer, F., and Tenen, D.G. (2007) **Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation.** *Nat Rev Immunol*, **7** (2): 105-117.

Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D.M., Niveleau, A., Plachot, M., Pàldi, A., Viegas-Péquiñot, E. (1998) **Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development.** *Genes Dev*, **12** (14): 2108-2113.

Saint-Martin, C., Leroy, G., Delhommeau, F., Panelatti, G., Dupont, S., James, C., Plo, I., Bordessoule, D., Chomienne, C., Delannoy, A., Devidas, A., Gardembas-Pain, M., Isnard, F., Plumelle, Y., Bernard, O.A., Vainchenker, W., Najman, A., and Bellanné-Chantelot, C.; French Group of Familial Myeloproliferative Disorders (2009) **Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms.** *Blood*, **114** (8): 1628-1632.

Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010) **Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107** (46): 19915-19920.

Salaverria, I., Zettl, A., Beà, S., Hartmann, E.M., Dave, S.S., Wright, G.W., Boerma, E.J., Kluin, P.M., Ott, G., Chan, W.C., Weisenburger, D.D., Lopez-Guillermo, A., Gascoyne, R.D., Delabie, J., Rimsza, L.M., Braziel, R.M., Jaffe, E.S., Staudt, L.M., Müller-Hermelink, H.K., Campo, E., and Rosenwald, A. ; Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP) (2008) **Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma.** *Haematologica*, **93** (9): 1327-1334.

Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L.Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koeffler, H.P., and Ogawa, S. (2009) **Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms.** *Nature*, **460** (7257): 904-908.

Sánchez, M.J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996) **Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo.** *Immunity*, **5** (6): 513-525.

Sargin, B., Choudhary, C., Crosetto, N., Schmidt, M.H., Grundler, R., Rensinghoff, M., Thiessen, C., Tickenbrock, L., Schwäble, J., Brandts, C., August, B., Koschmieder, S., Bandi, S.R., Duyster, J., Berdel, W.E., Müller-Tidow, C., Dikic, I., and Serve, H. (2007) **Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML.** *Blood*, **110** (3): 1004-1012.

Sato, T., Onai, H., Yoshihara, H., Arai, F., Suada, T., and Otheki, T. (2009) **Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion.** *Nat Med*, **15** (6): 696-700.

Sato, N., Koinuma, J., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S., Nakamura, Y., and Daigo, Y. (2010) **Activation of an oncogenic TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis.** *Genes Chromosomes Cancer*, **49** (4): 353-367.

Saur, S.J., Sangkhae, V., Geddis, A.E., Kaushansky, K., and Hitchcock, I.S. (2010) **Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl.** *Blood*, **115** (6): 1254-1263.

Schlenk, R.F., Döhner, K., Krauter, J., Fröhling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Späth, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A., and Döhner, H. ; German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. (2008) **Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia.** *N Engl J Med*, **358** (18): 1909-1918.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W., and Müller, J. (2010) **Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB.** *Nature*, **465** (7295): 243-247.

Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007) **Genome regulation by polycomb and trithorax proteins.** *Cell*, **128** (4): 735-745.

Schroeder, T. (2007) **Asymmetric cell division in normal and malignant hematopoietic precursor cells.** *Cell Stem Cell*, **1** (5): 479-481.

Scott, B.L., and Deeg, H.J. (2010) **Myelodysplastic syndromes.** *Annu Rev Med*, **61**: 345-358.

Shen, X., Kim, W., Fujiwara, Y., Simon, M.D., Liu, Y., Mysliwiec, M.R., Yuan, G.C., Lee, Y., and Orkin, S.H. (2009) **Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells.** *Cell*, **139** (7): 1303-1314.

Shen, L., Kantarjian, H., Guo, Y., Lin, E., Shan, J., Huang, X., Berry, D., Ahmed, S., Zhu, W., Pierce, S., Kondo, Y., Oki, Y., Jelinek, J., Saba, H., Estey, E., and Issa, J.P. (2010) **DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes.** *J Clin Oncol*, **28** (4): 605-613.

Shen, Y., Zhu, Y.M., Fan, X., Shi, J.Y., Wang, Q.R., Yan, X.J., Gu, Z.H., Wang, Y.Y., Chen, B., Jiang, C.L., Yan, H., Chen, F.F., Chen, H.M., Chen, Z., Jin, J., and Chen, S.J. (2011) **Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1 185 patients with acute myeloid leukemia.** *Blood*, **118** (20): 5593-5603.

Shibata, T., Kokubu, A., Miyamoto, M., Sasajima, Y., and Yamazaki, N. (2011) **Mutant IDH1 confers an in vivo growth in a melanoma cell line with BRAF mutation.** *Am J Pathol*, **178** (3): 1395-1402.

Shide, K., Kameda, T., Shimoda, H., Yamaji, T., Abe, H., Kamiunten, A., Sekine, M., Hidaka, T., Katayose, K., Kubuki, Y., Yamamoto, S., Miike, T., Iwakiri, H., Hasuike, S., Nagata, K., Marutsuka, K., Iwama, A., Matsuda, T., Kitanaka, A., and Shimoda, K. (2012) **TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis.** *Leukemia*.

Shih, L.Y., Liang, D.C., Fu, J.F., Wu, J.H., Wang, P.N., Lin, T.L., Dunn, P., Kuo, M.C., Tang, T.C., Lin, T.H., and Lai, C.L. (2006) **Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement.** *Leukemia*, **20** (2): 218-223.

Simon, C., Chagraoui, J., Kros, J., Gendron, P., Wilhelm, B., Lemieux, S., Boucher, G., Chagnon, P., Drouin, S., Lambert, R., Rondeau, C., Bilodeau, A., Lavallée, S., Sauvageau, M., Hébert, J., and Sauvageau, G. (2012) **A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia.** *Genes Dev*, **26** (7): 651-656.

Smith, A.E., Mohamedali, A.M., Kulasekararaj, A., Lim, Z., Gäken, J., Lea, N.C., Przychodzen, B., Mian, S.A., Nasser, E.E., Shooter, C., Westwood, N.B., Strupp, C., Gattermann, N., Maciejewski, J.P., Germing, U., and Mufti, G.J. (2010) **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*, **116** (19): 3923-3932.

Sneeringer, C.J., Scott, M.P., Kuntz, K.W., Knutson, S.K., Pollock, R.M., Richon, V.M., and Copeland, R.A. (2010) **Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107** (49): 20980-20985.

Song, C.X., Szulwach, K.E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C.H., Zhang, W., Jian, X., Wang, J., Zhang, L., Looney, T.J., Zhang, B., Godley, L.A., Hicks, L.M., Lahn, B.T., Jin, P., and He, C. (2011a) **Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine.** *Nat Biotechnol*, **29** (1): 68-72.

Song, C.X., Clark, T.A., Lu, X.Y., Kislyuk, A., Dai, Q., Turner, S.W., He, C., and Korlach, J. (2011b) **Sensitive and specific single-molecule sequencing of 5-hydroxymethylcytosine.** *Nat Methods*, **9** (1): 75-77.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988) **Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.** *Science*, **241** (4861): 58-62.

Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006) **Polycomb silencers control cell fate, development and cancer.** *Nat Rev Cancer*, **6** (11): 846-856.

Stanford, W.L., Cohn, J.B., and Cordes, S.P. (2001) **Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond.** *Nat Rev Genet*, **2** (10): 756-768.

Stein, B.L., Williams, D.M., O'Keefe, C., Rogers, O., Ingersoll, R.G., Spivak, J.L., Verma, A., Maciejewski, J.P., McDevitt, M.A., and Moliterno, A.R. (2011) **Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes.** *Haematologica*, **96** (10): 1462-1469.

Stegelman, F., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Paschka, P., Griesshammer, M., Blersch, C., Kuhn, S., Schauer, S., Döhner, H., and Döhner, K. (2011) ***DNMT3A* mutations in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, **25** (7): 1217-1219.

Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. (2011) **5-hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells.** *Genome Biol*, **12** (6): R54.

Stubbs, M.C., Kim, Y.M., Krivtsov, A.V., Wright, R.D., Feng, Z., Agarwal, J., Kung, A.L., and Armstrong, S.A. (2008) **MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment.** *Leukemia*, **22** (1): 66-77.

Su, I.H., Basavaraj, A., Krutchinsky, A.N., Hobert, O., Ullrich, A., Chait, B.T., and Tarakhovsky, A. (2003) **Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement.** *Nat Immunol*, **4** (2): 124-31.

Su, I.H., Dobenecker, M.W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., and Tarakhovsky, A. (2005) **Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling.** *Cell*, **121** (3): 425-436.

Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Han, J.W., Kim, S., Namburi, S., Hermetz, K., Kim, J.J., Rudd, M.K., Yoon, Y.S., Ren, B., He, C., and Jin, P. (2011) **Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells.** *PLoS Genet*, **7** (6): e1002154.

Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C.S., Spada, F., and Leonhardt, H. (2010) **Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA.** *Nucleic Acids Res*, **38** (19): e181.

Tadokoro, Y., Ema, H., Okano, M., Li, E., and Nakauchi, H. (2007) **De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells.** *J Exp Med*, **204** (4): 715-722.

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** (5929): 930-935.

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

Tefferi, A., Pardanani, A., Lim, K.H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Gangat, N., Finke, C.M., Schwager, S., Mullally, A., Li, C.Y., Hanson, C.A., Mesa, R., Bernard, O., Delhommeau, F., Vainchenker, W., Gilliland, D.G., and Levine, R.L. (2009a) **TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis.** *Leukemia*, **23** (5): 905-911.

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** (7): 1343-1345.

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. (2009c) **Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR correlators.** *Leukemia*, **23** (5): 900-904.

Tefferi, A., and Vardiman, J.W. (2009) **Myelodysplastic Syndromes.** *N Engl J Med*, **361** (19): 1872-1885.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Abdel-Wahab, O., Guglielmelli, P., Patel, J., Caramazza, D., Pieri, L., Finke, C.M., Kilpivaara, O., Wadleigh, M., Mai, M., McClure, R.F., Gilliland, D.G., Levine, R.L., Pardanani, A., and Vannucchi, A.M. (2010) **IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis.** *Leukemia*, **24** (7): 1302-1309.

Tefferi, A., Jimma, T., Sulai, N.H., Lasho, T.L., Finke, C.M., Knudson, R.A., McClure, R.F., and Pardanani, A. (2012) **IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F.** *Leukemia*, **26** (3): 475-480.

Theocharides, A., Boissinot, M., Girodon, F., Garand, R., Teo, S.S., Lippert, E., Talmant, P., Tichelli, A., Hermouet, S., and Skoda, R.C. (2007) **Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation.** *Blood*, **110** (1): 375-379.

Thirman, M.J., Gill, H.J., Burnett, R.C., Mbangkollo, D., McCabe, N.R., Kobayashi, H., Ziemian van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A.A., Chaganti, R.S.K., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Diaz, M.O., and Rowley, J.D. (1993) **Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.** *N Engl J Med*, **329** (13): 909-914.

Thol, F., Weissinger, E.M., Krauter, J., Wagner, K., Damm, F., Wichmann, M., Göhring, G., Schumann, C., Bug, G., Ottmann, O., Hofmann, W.K., Schlegelberger, B., Ganser, A., and Heuser, M. (2010) **IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis.** *Haematologica*, **95** (10): 1668-1674.

Thol, F., Winschel, C., Lüdeking, A., Yun, H., Friesen, I., Damm, F., Wagner, K., Krauter, J., Heuser, M., and Ganser, A. (2011a) **Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes.** *Haematologica*, **96** (12): 1870-1873.

Thol, F., Damm, F., Lüdeking, A., Winschel, C., Wagner, K., Morgan, M., Yun, H., Göhring, G., Schlegelberger, B., Hoelzer, D., Lübbert, M., Kanz, L., Fiedler, W., Kirchner, H., Heil, G., Krauter, J., Ganser, A., and Heuser, M. (2011b) **Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia.** *J Clin Oncol*, **29** (21): 2889-2896.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961) **A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells.** *Radiat Res*, **14**: 213-222.

Tiu, R.V., Gondek, L.P., O'Keefe, C.L., Elson, P., Huh, J., Mohamedali, A., Kulasekararaj, A., Advani, A.S., Paquette, R., List, A.F., Sekeres, M.A., McDevitt, M.A., Mufti, G.J., and Maciejewski, J.P. (2011) **Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies.** *Blood*, **117** (17): 4552-4560.

Trowbridge, J.J., Snow, J.W., Kim, J., Orkin, S.H. (2009) **DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells.** *Cell Stem Cell*, **5** (4): 442-449.

Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., Nakayama, J., and Okano, M. (2006) **Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b.** *Genes Cells*, **11** (7): 805-814.

Tweedie, S., Charlton, J., Clark, V., and Bird, A. (1997) **Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary.** *Mol Cell Biol*, **17** (3): 1469-1475.

Valinluck, V., Tsai, H.H., Rogstad, D.K., Burdzy, A., Bird, A., and Sowers, L.C. (2004) **Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2).** *Nucleic Acid Research*, **32** (14): 4100-4108.

Valinluck, V., and Sowers, L.C. (2007) **Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1.** *Cancer Res*, **67** (3): 946-950.

Van Vlierberghe, P., Patel, J., Abdel-Wahab, O., Lobry, C., Hedvat, C.V., Balbin, M., Nicolas, C., Payer, A.R., Fernandez, H.F., Tallman, M.S., Paietta, E., Melnick, A., Vandenberghe, P., Speleman, F., Aifantis, I., Cools, J., Levine, R., and Ferrando, A. (2011) **PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, **25** (1): 130-134.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., Rubin, M.A., and Chinnaiyan, A.M. (2002) **The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.** *Nature*, **419** (6907): 624-629.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C.D. (2009) **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood*, **114** (5): 937-951.

Véron, N., and Peters, A. (2011) **Epigenetics: Tet proteins in the limelight.** *Nature*, **473** (7347): 293-294. **Perspective.**

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** (8): 1411-1415.

Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., and Fuks, F. (2006) **The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation.** *Nature*, **439** (7078): 871-874.

Visconte, V., Makishima, H., Jankowska, A., Szpurka, H., Traina, F., Jerez, A., O'Keefe, C., Rogers, H.J., Sekeres, M.A., Maciejewski, J.P., and Tiu, R.V. (2012) **SF3B1, a splicing factor is frequently mutated in refractory anemia with ring sideroblasts.** *Leukemia*, **26** (3): 542-545.

Voso, M.T., Fabiani, E., Piciocchi, A., Matteucci, C., Brandimarte, L., Finelli, C., Pogliani, E., Angelucci, E., Fioritoni, G., Musto, P., Greco, M., Criscuolo, M., Fianchi, L., Vignetti, M., Santini, V., Hohaus, S., Mecucci, C., and Leone, G. (2011) **Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-Azacytidine.** *Leukemia*, **25** (12): 1910-1913.

Wainszelbaum, M.J., Liu, J., Kong, C., Srikanth, P., Samovski, D., Su, X., and Stahl, P.D. (2012) **TBC1D3, a hominoid-specific gene, delays IRS-1 degradation and promotes insulin signaling by modulating p70 S6 kinase activity.** *PLoS One*, **7** (2): e31225.

Walter, M.J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., Fulton, R., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Kandoth, C., Baty, J., Westervelt, P., DiPersio, J.F., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., and Graubert, T.A. (2011) **Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes.** *Leukemia*, **25** (7): 1153-1158.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004) **Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing.** *Nature*, **431** (7010): 873-878.

Wang, L., Lawrence, M.S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D.S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A.R., Fernandes, S.M., Goldstein, N.R., Folco, E.G., Cibulskis, K., Tesar, B., Sievers, Q.L., Shefler, E., Gabriel, S., Hacohen, N., Reed, R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lander, E.S., Neuberg, D., Brown, J.R., Getz, G., and Wu, C.J. (2011) **SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia.** *N Engl J Med*, **365** (26): 2497-2506.

Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., Rabinowitz, J.D., Carroll, M., Su, S.M., Sharp, K.A., Levine, R.L., and Thompson, C.B. (2010) **The common feature of leukemia-associated *IDH1* and *IDH2* mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate.** *Cancer Cell*, **17** (3): 225-234.

Wade, P.A. (2001) **Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation.** *Oncogene*, **20** (24): 3166-3173.

Weishaupt, H., Sigvardsson, M., and Attema, J.L. (2010) **Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells.** *Blood*, **115** (2): 247-256.

Whelan, S.A., Dias, W.B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2010) **Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes.** *J Biol Chem*, **285** (8): 5204-5211.

Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M.T., Johansen, J.V., Cloos, P.A., Rappsilber, J., and Helin, K. (2011a) ***TET1* and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.** *Nature*, **473** (7347): 343-348.

Williams, K., Christensen, J., and Helin, K. (2011b) **DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands?** *EMBO*, **13** (1): 28-35.

Willis, T.G., and Dyer, M.J. (2000) **The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies.** *Blood*, **96** (3): 808-822.

Wilson, N.K., Foster, S.D., Wang, X., Knezevic, K., Schütte, J., Kaimakis, P., Chilarska, P.M., Kinston, S., Ouwehand, W.H., Dzierzak, E., Pimanda, J.E., de Bruijn, M.F., and Göttgens, B. (2010) **Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators.** *Cell Stem Cell*, **7** (4): 532-544.

Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C.J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., and Walter, J. (2011) **5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming.** *Nat Commun*, **2**: 241.

Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Dezso, Z., Ustyanksky, V., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Karchin, R., Wilson, P.A., Kaminker, J.S., Zhang, Z., Croshaw, R., Willis, J., Dawson, D., Shipitsin, M., Willson, J.K., Sukumar, S., Polyak, K., Park, B.H., Pethiyagoda, C.L., Pant, P.V., Ballinger, D.G., Sparks, A.B., Hartigan, J., Smith, D.R., Suh, E., Papadopoulos, N., Buckhaults, P., Markowitz, S.D., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., and Vogelstein, B. (2007) **The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.** *Science*, **318** (5853): 1108-1113.

Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., and Sun, Y.E. (2010) **Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes.** *Science*, **329** (5990): 444-448.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010) **Active DNA demethylation: many roads lead to Rome.** *Nat. Rev. Cell. Biol*, **11** (9): 607-620.

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

Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., and Zhang, Y. (2011a) **Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.** *Genes Dev*, **25** (7): 679-684.

Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., and Zhang, Y. (2011b) **Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells.** *Nature*, **473** (7347): 389-393.

Wyatt, G.R., and Cohen, S.S. (1952) **A new pyrimidine base from bacteriophage nucleic acids.** *Nature*, **170** (4338): 1072-1073.

Xie, X., Chen, Y., Xue, P., Fan, Y., Deng, Y., Peng, G., Yang, F., and Xu, T. (2009) **RUVBL2, a novel AS160-binding protein, regulates insulin-stimulated GLUT4 translocation.** *Cell Res*, **19** (9): 1090-1097.

Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S.H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M.T., Liu, L.X., Jiang, W.Q., Liu, J., Zhang, J.Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y.H., Lei, Q.Y., Guan, K.L., Zhao, S.M., and Xiong, Y. (2011a) **Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases.** *Cancer Cell*, **19** (1): 17-30.

Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A.J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K., and Shi, Y.G. (2011b) **Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells.** *Mol Cell*, **42** (4): 451-464.

Yamashita, Y., Yuan, J., Suetake, I., Suzuki, H., Ishikawa, Y., Choi, Y.L., Ueno, T., Soda, M., Hamada, T., Haruta, H., Takada, S., Miyazaki, Y., Kiyoi, H., Ito, E., Naoe, T., Tomonaga, M., Toyota, M., Tajima, S., Iwama, A., and Mano, H. (2010) **Array-based genomic resequencing of human leukemia.** *Oncogene*, **29** (25): 3723-3731.

Yamazaki, J., Taby, R., Vasanthakumar, A., Macrae, T., Ostler, K.R., Shen, L., Kantarjian, H.M., Estecio, M.R., Jelinek, J., Godley, L.A., and Issa, J.P. (2012) **Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia.** *Epigenetics*, **7** (2): 201-207.

Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., Velculescu, V.E., Vogelstein, B., and Bigner, D.D. (2009) **IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.** *N Engl J Med*, **360** (8): 765-773.

Yan, X.J., Xu, J., Gu, Z.H., Pan, C.M., Lu, G., Shen, Y., Shi, J.Y., Zhu, Y.M., Tang, L., Zhang, X.W., Liang, W.X., Mi, J.Q., Song, H.D., Li, K.Q., Chen, Z., and Chen, S.J. (2011) **Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia.** *Nat Genet*, **43** (4): 309-315.

Yap, D.B., Chu, J., Berg, T., Schapira, M., Cheng, S.W., Moradian, A., Morin, R.D., Mungall, A.J., Meissner, B., Boyle, M., Marquez, V.E., Marra, M.A., Gascoyne, R.D., Humphries, R.K., Arrowsmith, C.H., Morin, G.B., and Aparicio, S.A. (2011) **Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation.** *Blood*, **117** (8): 2451-2459.

Yildirim, O., Li, R., Hung, J.H., Chen, P.B., Dong, X., Ee, L.S., Weng, Z., Rando, O.J., and Fazio, T.G. (2011) **Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells.** *Cell*, **147** (7): 1498-1510.

Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., Chalkidis, G., Suzuki, Y., Shiosaka, M., Kawahata, R., Yamaguchi, T., Otsu, M., Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Ishiyama, K., Mori, H., Nolte, F., Hofmann, W.K., Miyawaki, S., Sugano, S., Haferlach, C., Koefler, H.P., Shih, L.Y., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S., and Ogawa, S. (2011) **Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.** *Nature*, **478** (7367): 64-69.

Yu, Z., Genest, P.A., ter Riet, B., Sweeney, K., DiPaolo, C., Kieft, R., Christodoulou, E., Perrakis, A., Simmons, J.M., Hausinger, R.P., van Luenen, H.G., Rigden, D.J., Sabatini, R., and Borst, P. (2007) **The protein that binds to DNA base J in trypanosomatids has features of a thymidine hydroxylase.** *Nucleic Acids Res*, **35** (7): 2107-2115.

Yu, M., Hon, G.C., Szulwach, K.E., Song, C.X., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., Min, J.H., Jin, P., Ren, B., and He, C. (2012) **Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine in the Mammalian Genome.** *Cell*, **149** (6):1368-1380.

Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S.L., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X., Wang, J., Rusch, M., Lu, C., Chen, S.C., Wei, L., Collins-Underwood, J.R., Ma, J., Roberts, K.G., Pounds, S.B., Ulyanov, A., Becksfort, J., Gupta, P., Huether, R., Kriwacki, R.W., Parker, M., McGoldrick, D.J., Zhao, D., Alford, D., Espy, S., Bobba, K.C., Song, G., Pei, D., Cheng, C., Roberts, S., Barbato, M.I., Campana, D., Coustan-Smith, E., Shurtleff, S.A., Raimondi, S.C., Kleppe, M., Cools, J., Shimano, K.A., Hermiston, M.L, Doulatov, S., Eppert, K., Laurenti, E., Notta, F., Dick, J.E., Basso, G., Hunger, S.P., Loh, M.L., Devidas, M., Wood, B., Winter, S., Dunsmore, K.P, Fulton, R.S., Fulton, L.L., Hong, X., Harris, C.C., Dooling, D.J., Ochoa, K., Johnson, K.J., Obenauer, J.C., Evans, W.E., Pui, C.H., Naeve, C.W., Ley, T.J., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Downing, J.R., and Mullighan, C.G. (2012) **The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia.** *Nature*, **481** (7380): 157-163.

Zhao, R., Xing, S., Li, Z., Fu, X., Li, Q., Krantz, S.B., and Zhao, Z.J. (2005) **Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera.** *J Biol Chem*, **280** (24): 22788-22792.

Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, Q., Guan, K.L., and Xiong, Y. (2009) **Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha.** *Science*, **324** (5924): 261-265.

Zhu, J.K. (2009) **Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases.** *Annu Rev Genet*, **43**: 143-166.

Zon, L.I. (2008) **Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal.** *Nature*, **453** (7193): 306-313.

ANNEXES

Article 2

TET2, a tumor suppressor in hematological disorders



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbcan

Review

TET2, a tumor suppressor in hematological disorders

Thomas Mercher^{a,b,c}, Cyril Quivoron^{a,b,c}, Lucile Couronné^{a,b,c}, Christian Bastard^d,
William Vainchenker^{b,c,e}, Olivier A. Bernard^{a,b,c,*}

^a INSERM, U985, Villejuif, France^b Université Paris-Sud, Orsay, France^c Institut Gustave Roussy, Villejuif, France^d INSERM, U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen, France^e INSERM, U1009, Villejuif, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2011

Accepted 24 December 2011

Available online 3 January 2012

Keywords:

Hematology

Oncology

Tumor suppressor

Mouse models

Epigenetics

ABSTRACT

The TET family of proteins has been described a few years ago. Only recently, their roles in DNA modification, through the oxidation of methyl-cytosine, and in normal and malignant development, through the description of *TET2* as a tumor suppressor have been documented. The conjunction of these findings has prompted large efforts to understand the biology of these novel entities. Here, we summarize the recent results implicating *TET2* in hematological malignancies suggesting that further studies are required to fully understand the role of DNA methylation alterations during transformation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. A candidate tumor suppressor in myeloid malignancies	173
2. Being a tumor suppressor	174
3. <i>TET2</i> mutations in lymphoid malignancies	174
4. What is so special about <i>TET2</i> ?	175
5. Concluding remarks	175
Acknowledgements	175
References	175

1. A candidate tumor suppressor in myeloid malignancies

Tumor suppressor genes correspond to genes whose inactivation participates to cellular transformation. To fulfill a tumor suppressor status, the first requirements were that both copies of the gene should be mutated thereby achieving a full functional inactivation. Many examples now show that inactivation of a single copy is enough to participate to tumor development (see ref [1] for review).

The Ten-Eleven-Translocation gene family (*TET1*, *TET2*, and *TET3*) was first involved in human hematological malignancies following

the identification of *TET1* as a partner of MLL in rare t(10;11)(p12;q23) chromosomal translocations found in acute leukemia [2,3]. Few years later, others and we demonstrated acquired mutations targeting *TET2* on chromosome band 4q24, in various myeloid malignancies, Myelodysplastic Syndrome (MDS), Myeloproliferative Neoplasm (MPN) and Acute Myeloblastic Leukemia (AML) [4–10]. In human, Chronic MyeloMonocytic Leukemia (CMML) shows the highest incidence of *TET2* alterations with up to 50% of the patients carrying a *TET2* mutation [11]. The observed mutations targeted evolutionary conserved amino acids, or resulted in protein truncation due to non-sense mutations or small insertion/deletion events and thereby were predicted to be inactivating. Genomic deletions, that included the entire *TET2* gene, were also observed. The presence of two mutations, reflecting the targeting of both *TET2* copies, is however observed only in a fraction of the samples. The description of an oncogenic

* Corresponding author at: INSERM U985, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulines, 94805 Villejuif, France. Tel.: +33 42 11 42 33; fax: +33 142 11 51 01.

E-mail address: olivier.bernard@inserm.fr (O.A. Bernard).

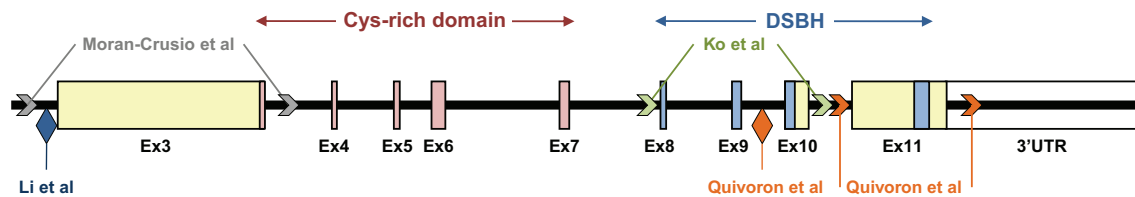


Fig. 1. Structure of the Tet2 gene showing the regions targeted in the different mouse models. Horizontal arrowheads show the lox sites. Vertical arrows show "genetrap" insertion sites. The TET2 proteins include 2 evolutionary conserved domains, a cystein-rich region (in pink) and the catalytic domain (double strand β helix DSBH) in blue.

event common to most of the myeloid neoplasms suggested that common mechanisms could trigger these malignancies [12].

The first reports indicated that *TET2* mutations may occur at an early phase of the disease(s), as judged from its apparition before JAK2V617F in some MPN and potentially in a hematopoietic stem cell [4,13–17]. Other studies have reported that it may also be a late event in MPN and during MPN transformation [13,16,18–20]. Studies regarding the prognostic impact of *TET2* mutations in human myeloid malignancies led to conflicting results, being favorable, neutral or unfavorable [10,11,21,22]. Recent reports indicate association with biological features in some diseases [22–24] and a poor prognosis impact of *TET2* mutations for AML patients in specific risk subgroups [25,26]. The discrepancy between these results might depend on the disease studied and/or the interaction with other genetic events.

2. Being a tumor suppressor

To establish the status of *TET2* as a tumor suppressor and to investigate its role during hematopoiesis, several groups targeted the mouse *Tet2* gene (Fig. 2). Two constructs, one conditional and one

that substitutes GFP sequences to the *Tet2* sequences, targeted the third exon 3 of the gene, which is included in all known transcripts and encode half of the largest predicted protein. Two conditional constructs targeted either the exons 8 to 10 that code for half of the catalytic domain of the protein or the coding sequences of the last exon, which encodes the other half. A fifth model is a genetrap allele, which may be considered as a hypomorphic allele of *Tet2*.

The four reports describe similar phenotypes [27–30], which is reassuring for both authors and journal editors. *Tet2*-deficient mice exhibit a progressive expansion of the immature hematopoietic compartment that includes both stem cell and multiple progenitors. Within the myeloid lineages, abnormalities were observed in the granulo-monocyte, erythroid and megakaryocytic differentiation pathways. Abnormalities in B- and T-lymphoid differentiation were also observed. A transformation to myeloid malignancy reminiscent of human CMML occurred in a fraction of the mice. All these properties were demonstrated to be cell-autonomous, using *in vivo* transplantation and *in vitro* assays. When engrafted in recipient mice, *Tet2*-deficient bone marrow or Lineage-negative, Sca1-positive, cKit-positive (LSK) cells out-competed wild-type cells and reproduced the amplification of the immature compartment and the differentiation abnormalities. *In vitro*, *Tet2*-deficient cells were able to serially replat and exhibited delayed myelomonocytic differentiation. In addition, similar features were observed in animals heterozygous or homozygous for *Tet2*-modified alleles. Subtle differences between the animal models may however exist. Indeed, in strategies targeting directly the ATG and first coding exon, animals appear to present an earlier disease onset and develop neoplasms with erythroid features compared to models targeting the catalytic region only. Although, a *bona fide* comparison of these models using similar genetic background and gene deletion strategy is required, it is possible that mutations in this amino-terminal conserved domain affect other functions of *TET2* influencing disease development and progression.

3. TET2 mutations in lymphoid malignancies

Identification of lymphoid abnormalities in *Tet2*-deficient mice [27] and observation of lymphoma in patients with *TET2*-mutated malignancies [4,31], prompted us to investigate the status of the *TET2* gene in human mature lymphoid neoplasms. *TET2* mutations were observed in 2% of B-cell and 12% of T-cell neoplasms, mainly in the angioimmunoblastic lymphoma (AITL) subtype. Recent massive parallel sequencing report confirmed the presence of acquired *TET2* mutations in a fraction of B-cell lymphoma [32]. As in myeloid malignancies, small insertion/deletion events, nonsense and missense mutations were observed. An additional similarity with myeloid neoplasms is that *TET2* mutations identified in the tumor cells of lymphoma patients may also be observed in immature myeloid progenitors of the same patients [27]. So *TET2* mutations may result in both myeloid and lymphoid neoplasms and, in both types of diseases, may affect the stem cell compartment. This situation may also apply to other genes and hematological tumors, as suggested by the recent description of a stem cell defect in chronic lymphocytic leukemia patients [33]. Mutations in *TET2* are not observed in non-hematopoietic tumors (P Campbell, personal communication and <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).

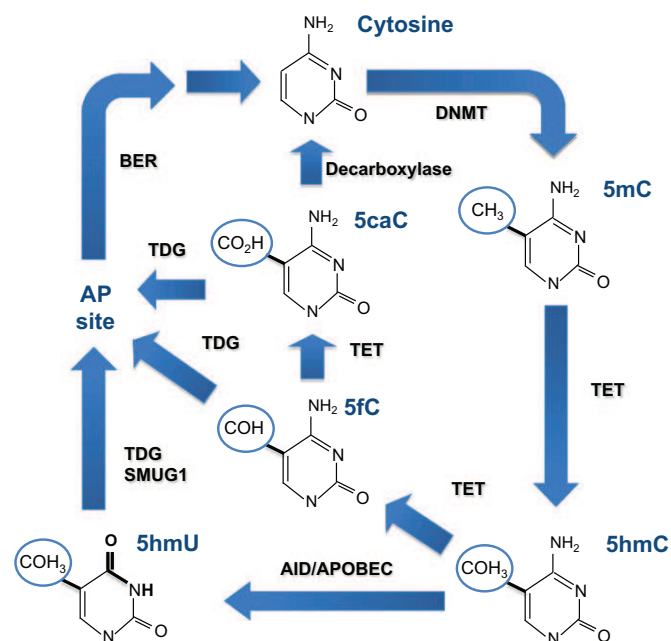


Fig. 2. Proposed cytosine cycle. Five-hydroxymethylcytosine (hmC) is generated from 5-methylcytosine (mC) through oxidation catalyzed by the TET family of oxygenases. HmC may then be deaminated by members of the AID/APOBEC family and the resulting 5-hydroxymethyluracil (hmU) is excised by thymine-DNA glycosylase (TDG), or another DNA glycosylase. This initiates the base excision repair process (BER), leading to replacement of hmU by an unmethylated cytosine. Further oxidation of hmC by TET enzymes may lead to 5-formylcytosine (fC) or 5-carboxylcytosine (caC). These modified cytosines may be specifically recognized and excised by TDG, leading to subsequent BER activity. CaC may also be converted to cytosine by a not yet identified decarboxylase. Oxidation of mC may also impair their recognition by maintenance methyltransferase DNMT1 and allow replication-dependent demethylation. A: abasic (apurinic/apyrimidinic) site.

4. What is so special about *TET2*?

The initial description of TET proteins, hmC and their implication in the control of normal and malignant differentiation stimulated a high number of publications [34–37].

TET2, together with *TET1* and *TET3*, belongs to a family of oxygenase that is dependent on iron and 2-oxoglutarate [38]. This family of protein is conserved in evolution and related to the Trypanosoma JBP1 and JBP2 proteins. All three proteins are able to oxidize methylcytosine (mC) into 5-hydroxymethylcytosine (hmC), 5-formylcytosine (fC) and 5-carboxylcytosine (caC) [38–42] (Fig. 1).

These three modified nucleotides are detected in mouse DNA [38,43,44]. Each of them may represent a step toward DNA demethylation. HmC are supposed to be subjected to deamination by the APO-BEC protein family, then excised by DNA glycosylase, and then the abasic site is processed by the Base Exchange Repair (BER) mechanism that allows to go back to an unmethylated cytosine. Thymine-DNA glycosylase (TDG) was shown to participate in the removal of caC from DNA [45].

HmC (but also fC and caC) may also have a specific function, and it has been described to suppress interaction with mC binding proteins. Impaired binding with DNMT1, which is involved in DNA methylation maintenance, would participate to passive DNA demethylation [46]. Extensive mapping of hmC and mC in the mouse ES cell genome did not lead to crystal clear results but suggested low hmC levels at CpG island and predominant association with gene expression [35]. *TET1* proteins appear to lie within gene bodies, transcriptional start sites and exons, and might act at the same sites as the polycomb repressive complex (PRC)2 [47].

Knock-down experiments in ES cells indicated that *Tet1* might control cell fate and/or differentiation, although it appears dispensable for mouse development [48]. Concordant reports indicate a role for *TET3* in the demethylation of the paternal genome upon fertilization. Indeed, maternal *TET3* seems essential to trigger cytosine demethylation [49] and *TET3* deficiency induces marked reduced fecundity and increased incidence of developmental failures in offspring [50].

Regarding *TET2*, it seems to participate in the control of the level of hmC during hematopoietic differentiation in both human and mouse [27–29,51,52]. The impact of *TET2* inactivation on the overall mC level is however yet unclear. In addition, the respective contribution of variations in the cellular mC and hmC content and of potentially other *TET2* function(s) to cellular transformation remains to be determined. An indirect hint indicates that hmC could be the principal culprit. In myeloid malignancies, activating mutations of the *IDH1* and *IDH2* enzymes that are mostly exclusive with *TET2* mutations have been described [53,54]. Mutated *IDH1* and *IDH2* enzymes are able to synthesize 2-hydroxyglutarate, a metabolite that compete with 2-oxoglutarate [55] on which TET and other proteins of this oxygenase family rely for their catalytic activities [54,56,57]. As a result, *IDH*-mutated AML patients have a methylation profile that is comparable to *TET2*-mutated patients [54]. The similar phenotypes observed in all *Tet2*-deficient mouse models further point to an important role of hmC deregulation in hematopoietic transformation.

5. Concluding remarks

Regarding *TET2*, several conclusions can be drawn from these results.

- *TET2* is a *bona fide* haploinsufficient tumor suppressor gene.
- *TET2* deficiency may be germline transmitted, without consequences markedly different from somatic inactivation [19,27–30].
- *TET2* deficiency endows the cells with a competitive advantage over wild type cells, induces hematopoietic differentiation abnormalities but is not directly responsible for full cellular transformation.

All published mouse models show that alteration of the *Tet2* gene dosage, even subtle, predisposes to the development of CMML-like disease. Indeed, human CMML is the disease exhibiting, to date, the highest frequency of *TET2* mutations. The latency observed for CMML development in murine models of *Tet2* deficiency suggests a requirement for cooperating mutations. Furthermore, *TET2* deficiency in human diseases does not seem to be, *per se* strongly associated with a specific hematological phenotype [13,19]. Identifying the mutations that drive the phenotype of the developing neoplasms will allow a better understanding of the tumorigenesis mechanisms. In addition, the simultaneous identification of novel nucleotides derived from hmC, fC and caC, the enzymes that are involved in their generation and their involvement in normal and malignant hematopoiesis opened very exciting avenues for both fundamental and clinical research.

Acknowledgements

The work performed in the authors' laboratories has been funded by INSERM, Institut National du Cancer (INCa), Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC), Association de Recherche contre le Cancer (ARC) and Fondation Gustave Roussy.

References

- [1] A.H. Berger, P.P. Pandolfi, Haplo-insufficiency: a driving force in cancer, *J. Pathol.* 223 (2011) 137–146.
- [2] R.B. Lorschach, J. Moore, S. Mathew, S.C. Raimondi, S.T. Mukatira, J.R. Downing, *TET1*, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23), *Leukemia* 17 (2003) 637–641.
- [3] R. Ono, T. Taki, T. Taketani, M. Taniwaki, H. Kobayashi, Y. Hayashi, 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.* 62 (2002) 4075–4080.
- [4] F. Delhommeau, S. Dupont, V. Della Valle, C. James, S. Trannoy, A. Masse, O. Kosmider, J.P. Le Couedic, F. Robert, A. Alberdi, Y. Lecluse, I. Plo, F.J. Dreyfus, C. Marzac, N. Casadevall, C. Lacombe, S.P. Romana, P. Dessen, J. Soulier, F. Viguie, M. Fontenay, W. Vainchenker, O.A. Bernard, Mutation in *TET2* in myeloid cancers, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 2289–2301.
- [5] S.M. Langemeijer, R.P. Kuiper, M. Berends, R. Knops, M.G. Aslanyan, M. Massop, E. Stevens-Linders, P. van Hoogen, A.G. van Kessel, R.A. Raymakers, E.J. Kamping, G.E. Verhoef, E. Verburgh, A. Hagemeijer, P. Vandenberghe, T. de Witte, B.A. van der Reijden, J.H. Jansen, Acquired mutations in *TET2* are common in myelodysplastic syndromes, *Nat. Genet.* 41 (2009) 838–842.
- [6] A. Tefferi, R.L. Levine, K.H. Lim, O. Abdel-Wahab, T.L. Lasho, J. Patel, C.M. Finke, A. Mullally, C.Y. Li, A. Pardanani, D.G. Gilliland, Frequent *TET2* mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates, *Leukemia* 23 (2009) 900–904.
- [7] A. Tefferi, K.H. Lim, O. Abdel-Wahab, T.L. Lasho, J. Patel, M.M. Patnaik, C.A. Hanson, A. Pardanani, D.G. Gilliland, R.L. Levine, Detection of mutant *TET2* in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML, *Leukemia* 23 (2009) 1343–1345.
- [8] A. Tefferi, A. Pardanani, K.H. Lim, O. Abdel-Wahab, T.L. Lasho, J. Patel, N. Gangat, C.M. Finke, S. Schwager, A. Mullally, C.Y. Li, C.A. Hanson, R. Mesa, O. Bernard, F. Delhommeau, W. Vainchenker, D.G. Gilliland, R.L. Levine, *TET2* mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis, *Leukemia* 23 (2009) 905–911.
- [9] A.M. Jankowska, H. Szpurka, R.V. Tiu, H. Makishima, M. Afable, J. Huh, C.L. O'Keefe, R. Ganetzky, M.A. McDevitt, J.P. Maciejewski, Loss of heterozygosity 4q24 and *TET2* mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms, *Blood* 113 (2009) 6403–6410.
- [10] O. Abdel-Wahab, A. Mullally, C. Hedvat, G. Garcia-Manero, J. Patel, M. Wadleigh, S. Malinge, J. Yao, O. Kilpivaara, R. Bhat, K. Huberman, S. Thomas, I. Dolgalev, A. Heguy, E. Paietta, M.M. Le Beau, M. Beran, M.S. Tallman, B.L. Ebert, H.M. Kantarjian, R.M. Stone, D.G. Gilliland, J.D. Crispino, R.L. Levine, Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies, *Blood* 114 (2009) 144–147.
- [11] O. Kosmider, V. Gelsi-Boyer, M. Ciudad, C. Racœur, V. Jooste, N. Vey, B. Quesnel, P. Fenaux, J.N. Bastie, O. Beyne-Rauzy, A. Stamatoulas, F. Dreyfus, N. Ifrah, S. de Botton, W. Vainchenker, O.A. Bernard, D. Birnbaum, M. Fontenay, E. Solary, *TET2* gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia, *Haematologica* 94 (2009) 1676–1681.
- [12] R.L. Levine, M. Carroll, A common genetic mechanism in malignant bone marrow diseases, *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 2355–2357.
- [13] L. Couronne, E. Lippert, J. Andrieux, O. Kosmider, I. Radford-Weiss, D. Penhler, N. Dastugue, F. Mugneret, M. Lafage, N. Gachard, N. Nadal, O.A. Bernard, F. Nguyen-Khac, Analyses of *TET2* mutations in post-myeloproliferative neoplasm acute myeloid leukemias, *Leukemia* 24 (2010) 201–203.

- [14] J.J. Kiladjan, A. Masse, B. Cassinat, H. Mokrani, I. Teyssandier, J.P. le Couedic, N. Cambier, C. Almire, E. Pronier, N. Casadevall, W. Vainchenker, C. Chomienne, F. Delhommeau, Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets JAK2V617F clones without affecting TET2 mutant cells, *Leukemia* 24 (2010) 1519–1523.
- [15] W. Vainchenker, F. Delhommeau, S.N. Constantinescu, O.A. Bernard, New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms, *Blood* 118 (2011) 1723–1735.
- [16] E. Pronier, C. Quivoron, O.A. Bernard, J.L. Villeval, JAK2V(1)F/TET2 mutations: does the order matter? *Haematologica* 96 (2011) 638–640.
- [17] S.I. Swierczek, D. Yoon, C. Bellanne-Chantelot, S.J. Kim, C. Saint-Martin, F. Delhommeau, A. Najman, J.T. Prchal, Extent of hematopoietic involvement by TET2 mutations in JAK2V(1)F polycythemia vera, *Haematologica* 96 (2011) 775–778.
- [18] C. Saint-Martin, G. Leroy, F. Delhommeau, G. Panelatti, S. Dupont, C. James, I. Plo, D. Bordesoule, C. Chomienne, A. Delannoy, A. Devidas, M. Gardembas-Pain, F. Isnard, Y. Plumelle, O. Bernard, W. Vainchenker, A. Najman, C. Bellanne-Chantelot, Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms, *Blood* 114 (2009) 1628–1632.
- [19] F.X. Schaub, R. Looser, S. Li, H. Hao-Shen, T. Lehmann, A. Tichelli, R.C. Skoda, Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms, *Blood* 115 (2010) 2003–2007.
- [20] P.A. Beer, F. Delhommeau, J.P. LeCouedic, M.A. Dawson, E. Chen, D. Bareford, R. Kusec, M.F. McMullin, C.N. Harrison, A.M. Vannucchi, W. Vainchenker, A.R. Green, Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm, *Blood* 115 (2010) 2891–2900.
- [21] O. Kosmider, V. Gelsi-Boyer, M. Cheok, S. Grabar, V. Della-Valle, F. Picard, F. Viguie, B. Quesnel, O. Beyne-Rauzy, E. Solary, N. Vey, M. Hunault-Berger, P. Fenaux, Y. Mansat-De Mas, E. Delabesse, P. Guardiola, C. Lacombe, W. Vainchenker, C. Preudhomme, F. Dreyfus, O.A. Bernard, D. Birnbaum, M. Fontenay, TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs), *Blood* 114 (2009) 3285–3291.
- [22] O. Nibourel, O. Kosmider, M. Cheok, N. Boissel, A. Renneville, N. Philippe, H. Dombret, F. Dreyfus, B. Quesnel, S. Geoffroy, S. Quentin, C. Roche-Lestienne, J.M. Cayuela, C. Roumier, P. Fenaux, W. Vainchenker, O.A. Bernard, J. Soulier, M. Fontenay, C. Preudhomme, Incidence and prognostic value of TET2 alterations in de novo acute myeloid leukemia achieving complete remission, *Blood* 116 (2010) 1132–1135.
- [23] O. Kosmider, E. Delabesse, V.M. de Mas, P. Cornillet-Lefebvre, O. Blanchet, A. Delmer, C. Recher, S. Raynaud, D. Bouscary, F. Viguie, C. Lacombe, O.A. Bernard, N. Ifrah, F. Dreyfus, M. Fontenay, TET2 mutations in secondary acute myeloid leukemias: a French retrospective study, *Haematologica* 96 (2011) 1059–1063.
- [24] F. Nguyen-Khac, C. Lesty, V. Eclache, L. Couronne, O. Kosmider, J. Andrieux, M.A. Collonge-Rame, D. Penther, M. Lafage, C. Bilhou-Nabera, E. Chapiro, M.J. Mozziconacci, F. Mugneret, N. Gachard, N. Nadal, E. Lippert, S. Struski, N. Dastugue, C. Cabrol, O.A. Bernard, Chromosomal abnormalities in transformed Ph-negative myeloproliferative neoplasms are associated to the transformation subtype and independent of JAK2 and the TET2 mutations, *Genes Chromosomes Cancer* 49 (2010) 919–927.
- [25] W.C. Chou, S.C. Chou, Y. Liu, C.Y. Chen, H.A. Hou, Y.Y. Kuo, M.C. Lee, B.S. Ko, J.L. Tang, M. Yao, W. Tsay, S.J. Wu, S.Y. Huang, S.C. Hsu, Y.C. Chen, Y.C. Chang, K.T. Kuo, F.Y. Lee, M.C. Liu, C.W. Liu, M.H. Tseng, C.F. Huang, H.F. Tien, TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics, *Blood* 118 (2011) 3803–3810.
- [26] K.H. Metzeler, K. Maharry, M.D. Radmacher, K. Mrozek, D. Margeson, H. Becker, J. Curfman, K.B. Holland, S. Schwind, S.P. Whitman, Y.Z. Wu, W. Blum, B.L. Powell, T.H. Carter, M. Wetzler, J.O. Moore, J.E. Kollitz, M.R. Baer, A.J. Carroll, R.A. Larson, M.A. Caligiuri, G. Marcucci, C.D. Bloomfield, TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 1373–1381.
- [27] C. Quivoron, L. Couronne, V. Della Valle, C.K. Lopez, I. Plo, O. Wagner-Ballon, M. Do Cruzeiro, F. Delhommeau, B. Arnulf, M.H. Stern, L. Godley, P. Opolon, H. Tilly, E. Solary, Y. Duffourd, P. Dessen, H. Merle-Beral, F. Nguyen-Khac, M. Fontenay, W. Vainchenker, C. Bastard, T. Mercher, O.A. Bernard, TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis, *Cancer Cell* 20 (2011) 25–38.
- [28] K. Moran-Crusio, L. Reavie, A. Shih, O. Abdel-Wahab, D. Ndiaye-Lobry, C. Lobry, M.E. Figueroa, A. Vasanthakumar, J. Patel, X. Zhao, F. Perna, S. Pandey, J. Madzo, C. Song, Q. Dai, C. He, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, S.D. Nimer, A. Melnick, L.A. Godley, I. Aifantis, R.L. Levine, Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation, *Cancer Cell* 20 (2011) 11–24.
- [29] Z. Li, X. Cai, C. Cai, J. Wang, W. Zhang, B.E. Petersen, F.C. Yang, M. Xu, Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies, *Blood* 118 (2011) 4509–4518.
- [30] M. Ko, H.S. Bandukwala, J. An, E.D. Lamperti, E.C. Thompson, R. Hastie, A. Tsangaratos, K. Rajewsky, S.B. Koralov, A. Rao, Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 14566–14571.
- [31] F. Viguie, A. Aboura, D. Bouscary, S. Ramond, A. Delmer, G. Tachdjian, J.P. Marie, N. Casadevall, Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia* 19 (2005) 1411–1415.
- [32] R.D. Morin, M. Mendez-Lago, A.J. Mungall, R. Goya, K.L. Mungall, R.D. Corbett, N.A. Johnson, T.M. Severson, R. Chiu, M. Field, S. Jackman, M. Krzywinski, D.W. Scott, D.L. Trinh, J. Tamura-Wells, S. Li, M.R. Firme, S. Rogic, M. Griffith, S. Chan, O. Yakovenko, I.M. Meyer, E.Y. Zhao, D. Smailus, M. Moks, S. Chittaranjan, L. Rimsza, A. Brooks-Wilson, J.J. Spinelli, S. Ben-Neriah, B. Meissner, B. Woolcock, M. Boyle, H. McDonald, A. Tam, Y. Zhao, A. Delaney, T. Zeng, K. Tse, Y. Butterfield, I. Birol, R. Holt, J. Schein, D.E. Horsman, R. Moore, S.J. Jones, J.M. Connors, M. Hirst, R.D. Gascoyne, M.A. Marra, Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma, *Nature* 476 (2011) 298–303.
- [33] Y. Kikushige, F. Ishikawa, T. Miyamoto, T. Shima, S. Urata, G. Yoshimoto, Y. Mori, T. Iino, T. Yamauchi, T. Eto, H. Niuro, H. Iwasaki, K. Takenaka, K. Akashi, Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia, *Cancer Cell* 20 (2011) 246–259.
- [34] L. Cimmino, TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation, *Cell Stem Cell* 9 (2011).
- [35] F. Matarese, E. Carrillo de Santa Pau, H.G. Stunnenberg, 5-hydroxymethylcytosine: a new kid on the epigenetic block? *Mol Syst Biol* 7 (2011) 562.
- [36] J.U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G.L. Ming, H. Song, Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond, *Cell Cycle* 10 (2011).
- [37] K. Williams, J. Christensen, K. Helin, DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO Rep* 13 (2011) 28–35.
- [38] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind, A. Rao, Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324 (2009) 930–935.
- [39] K.P. Koh, A. Yabuuchi, S. Rao, Y. Huang, K. Cunniff, J. Nardone, A. Laiho, M. Tahiliani, C.A. Sommer, G. Mostoslavsky, R. Lahesmaa, S.H. Orkin, S.J. Rodig, G.Q. Daley, A. Rao, Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells, *Cell Stem Cell* 8 (2011) 200–213.
- [40] Y.F. He, B.Z. Li, Z. Li, P. Liu, Y. Wang, Q. Tang, J. Ding, Y. Jia, Z. Chen, L. Li, Y. Sun, X. Li, Q. Dai, C.X. Song, K. Zhang, C. He, G.L. Xu, Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA, *Science* 333 (2011) 1303–1307.
- [41] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science* 333 (2011) 1300–1303.
- [42] J.U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G.L. Ming, H. Song, Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain, *Cell* 145 (2011) 423–434.
- [43] N.W. Penn, R. Suwalski, C. O'Riley, K. Bojanowski, R. Yura, The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.* 126 (1972) 781–790.
- [44] S. Kiaucionis, N. Heintz, The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain, *Science* 324 (2009) 929–930.
- [45] S. Cortellino, J. Xu, M. Sannai, R. Moore, E. Caretti, A. Cigliano, M. Le Coz, K. Devarajan, A. Wessels, D. Soprano, L.K. Abramowitz, M.S. Bartolomei, F. Rambow, M.R. Bassi, T. Bruno, M. Fanciulli, C. Renner, A.J. Klein-Szanto, Y. Matsumoto, D. Kobi, I. Davidson, C. Alberti, L. Larue, A. Bellacosa, Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair, *Cell* 146 (2011) 67–79.
- [46] V. Valinluck, L.C. Sowers, Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1, *Cancer Res.* 67 (2007) 946–950.
- [47] K. Williams, J. Christensen, M.T. Pedersen, J.V. Johansen, P.A. Cloos, J. Rappsilber, K. Helin, TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity, *Nature* 473 (2011) 343–348.
- [48] M.M. Dawlaty, K. Ganz, B.E. Powell, Y.C. Hu, S. Markoulaki, A.W. Cheng, Q. Gao, J. Kim, S.W. Choi, D.C. Page, R. Jaenisch, Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 166–175.
- [49] M. Wossidlo, T. Nakamura, K. Lepikhov, C.J. Marques, V. Zakhartchenko, M. Boiani, J. Arand, T. Nakano, W. Reik, J. Walter, 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming, *Nat. Commun.* 2 (2011) 241.
- [50] T.-P. Gu, F. Guo, H. Yang, H.-P. Wu, G.-F. Xu, W. Liu, Z.-G. Xie, L. Shi, X. He, S.-g. Jin, K. Iqbal, Y.G. Shi, Z. Deng, P.E. Szabo, G.P. Pfeifer, J. Li, G.-L. Xu, The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes, *Nature* 477 (2011) 606–610.
- [51] M. Ko, Y. Huang, A.M. Jankowska, U.J. Pape, M. Tahiliani, H.S. Bandukwala, J. An, E.D. Lamperti, K.P. Koh, R. Ganetzky, X.S. Liu, L. Aravind, S. Agarwal, J.P. Maciejewski, A. Rao, Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2, *Nature* 468 (2010) 839–843.
- [52] E. Pronier, C. Almire, H. Mokrani, A. Vasanthakumar, A. Simon, B. da Costa Reis Monte Mor, A. Masse, J.P. Le Couedic, F. Pendino, B. Carbonne, J. Larghero, J.L. Ravanat, N. Casadevall, O.A. Bernard, N. Droin, E. Solary, L.A. Godley, W. Vainchenker, I. Plo, F. Delhommeau, Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors, *Blood* 118 (2011) 2551–2555.
- [53] E.R. Mardis, L. Ding, D.J. Doelling, D.E. Larson, M.D. McLellan, K. Chen, D.C. Koboldt, R.S. Fulton, K.D. Delehaunty, S.D. McGrath, L.A. Fulton, D.P. Locke, V.J. Magrini, R.M. Abbott, T.L. Vickery, J.S. Reed, J.S. Robinson, T. Wylie, S.M. Smith, L. Carmichael, J.M. Eldred, C.C. Harris, J. Walker, J.B. Peck, F. Du, A.F. Dukes, G.E. Sanderson, A.M. Brummett, E. Clark, J.F. McMichael, R.J. Meyer, J.K. Schindler, C.S. Pohl, J.W. Wallis, X. Shi, L. Lin, H. Schmidt, Y. Tang, C. Haipek, M.E. Wiechert, J.V. Ivy, J. Kalicki, G. Elliott, R.E. Ries, J.E. Payton, P. Westervelt, M.H. Tomasson, M.A. Watson, J. Baty, S. Heath, W.D. Shannon, R. Nagarajan, D.C. Link, M.J. Walter, T.A. Graubert, J.F. DiPersio, R.K. Wilson, T.J. Ley, Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 1058–1066.
- [54] M.E. Figueroa, O. Abdel-Wahab, C. Lu, P.S. Ward, J. Patel, A. Shih, Y. Li, N. Bhagwat, A. Vasanthakumar, H.F. Fernandez, M.S. Tallman, Z. Sun, K. Wolniak, J.K. Peeters, W. Liu, S.E. Choe, V.R. Fantin, E. Paietta, B. Lowenberg, J.D. Licht, L.A. Godley, R. Delwel, P.J. Valk, C.B. Thompson, R.L. Levine, A. Melnick, Leukemic IDH1 and

- IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation, *Cancer Cell* 18 (2010) 553–567.
- [55] P.S. Ward, J. Patel, D.R. Wise, O. Abdel-Wahab, B.D. Bennett, H.A. Coller, J.R. Cross, V.R. Fantin, C.V. Hedvat, A.E. Perl, J.D. Rabinowitz, M. Carroll, S.M. Su, K.A. Sharp, R.L. Levine, C.B. Thompson, The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate, *Cancer Cell* 17 (2010) 225–234.
- [56] W. Xu, H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.H. Kim, S. Ito, C. Yang, M.T. Xiao, L.X. Liu, W.Q. Jiang, J. Liu, J.Y. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y.H. Xu, Q.Y. Lei, K.L. Guan, S.M. Zhao, Y. Xiong, Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases, *Cancer Cell* 19 (2011) 17–30.
- [57] C. Loenarz, C.J. Schofield, Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation, *Chem. Biol.* 16 (2009) 580–583.

Article 3

***In cauda venenum* ou de l'importance de (la) TET(2)**

lité, et il est fort probable qu'elle ouvre la porte à une plus large compréhension de la morphogenèse d'autres organes. Un effort conjoint doit être effectué pour déterminer à la fois les propriétés biophysiques qui contrôlent la morphogenèse et la signalisation moléculaire qui régit ces propriétés au niveau cellulaire. ♦

Gut looping morphogenesis

CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Jérôme Flakowski, Anne-Ruxandra Carvunis, Daphne Warlamis, Romain Koszul, Guillaume Adelmant, Monique Savin et Michel Savin pour leurs commentaires sur ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Stainier DYR. No organ left behind: tales of gut development and evolution. *Science* 2005 ; 307 : 1902-4.
2. Savin T, Kurpios NA, Shyer AE, et al. On the growth and form of the gut. *Nature* 2011 ; 476 : 57-62.
3. Davis NM, Kurpios NA, Sun X, et al. The chirality of gut rotation derives from left-right asymmetric changes

in the architecture of the dorsal mesentery. *Dev Cell* 2008 ; 15 : 134-45.

4. Kurpios NA, Ibañez M, Davis NM, et al. The direction of gut looping is established by changes in the extracellular matrix and in cell:cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 8499-506.
5. Liang H, Mahadevan L. The shape of a long leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 22049-54.
6. Liang H, Mahadevan L. Growth, geometry and mechanics of the blooming lily. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 5516-21.
7. Schreiber AM, Cai L, Brown DD. Remodeling of the intestine during metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 3720-5.
8. Thompson DW. *On growth and form*. Cambridge : Cambridge University Press, 1917 : 794 p.

NOUVELLE

In cauda venenum ou de l'importance de (la) TET(2)

Thomas Mercher, Cyril Quivoron, Lucile Couronné, William Vainchenker, Christian Bastard, Olivier A. Bernard

T. Mercher, C. Quivoron, L. Couronné, O. Bernard : Inserm U985, Villejuif, France ; Université Paris-Sud, Orsay, France ; Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. W. Vainchenker : Inserm U1009, Villejuif, France ; Université Paris-Sud, Orsay, France ; Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. C. Bastard : Inserm U918, Université de Rouen, Centre Henri Becquerel, Rouen, France. thomas.mercher@inserm.fr olivier.bernard@inserm.fr

► Le gène *ten-eleven-translocation (TET) 2* fait partie d'une famille de trois gènes codant pour des oxygénases dépendantes du Fe²⁺ et du 2-oxoglutarate. Les trois protéines, TET1, TET2 et TET3, sont capables d'oxyder les cytosines méthylées (5mC) en hydroxyméthylcytosines (5hmC) ainsi qu'en 5-formylcytosines (5fC) et 5-carboxylcytosines (5caC) [1-4] (Figure 1). Ces cytosines modifiées peuvent à leur tour être modifiées par des glycosylases ou par des désaminases. Le système de réparation par excision de base, *base excision repair (BER)*, intervient ensuite pour réintroduire une cytosine non méthylée [5]. L'oxydation des méthylcytosines par les facteurs TET semble donc constituer une étape vers leur déméthylation active. De plus, les 5hmC pourraient posséder une fonction propre [6], et TET1 elle-même pourrait réguler la transcription indépendamment des 5hmC [7].

Des mutations acquises du gène *TET2* ont d'abord été décrites dans les hémopathies malignes humaines de type myéloïde [8]. Elles sont observées dans tous

ces sous-types d'hémopathies, avec une fréquence variable atteignant 50 % dans les échantillons de LMMC (leucémies myélomonocytaires chroniques). Ces mutations sont principalement des insertions ou des délétions de petite taille, entraînant des sauts de phase, et des mutations ponctuelles non-sens créant des codons stop. Des mutations faux-sens qui touchent des acides aminés conservés dans l'évolution ont également été décrites (Figure 2). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que *TET2* est un gène de type suppresseur de tumeurs et que les mutations observées dans les hémopathies conduisent à une perte de fonction de la protéine. La présence de deux mutations, indiquant l'atteinte des deux copies du gène *TET2*, n'est détectée que chez une partie des patients, suggérant un effet d'une inactivation hétérozygote (haplo-insuffisance).

Pour étudier la fonction de Tet2, quatre groupes ont généré des lignées de souris invalidées pour *Tet2* chez lesquelles le gène peut être éteint de façon condi-

tionnelle [9-12]. Les souris porteuses de mutations homozygotes de *Tet2* transmises de façon germinale sont viables et leur phénotype est semblable à celles qui présentent une inactivation somatique du gène. L'invalidation de *Tet2* entraîne une baisse du niveau global de 5hmC dans les cellules hématopoïétiques. Toutes les publications décrivent un phénotype similaire d'amplification des populations hématopoïétiques immatures (cellules souches et progéniteurs multipotents) ainsi que des anomalies de différenciation des lignées myéloïdes, mais aussi lymphoïdes B et T. Ces anomalies sont intrinsèques puisqu'elles sont observées chez des souris sauvages syngéniques greffées avec de la moelle osseuse de souris invalidées pour *Tet2*, et que des anomalies de différenciation des progéniteurs sont observées également dans des tests *in vitro*. De plus, les cellules invalidées pour *Tet2* présentent un avantage compétitif par rapport aux cellules sauvages dans des expériences de greffe de moelle, aussi bien à partir de moelle totale que de cellules

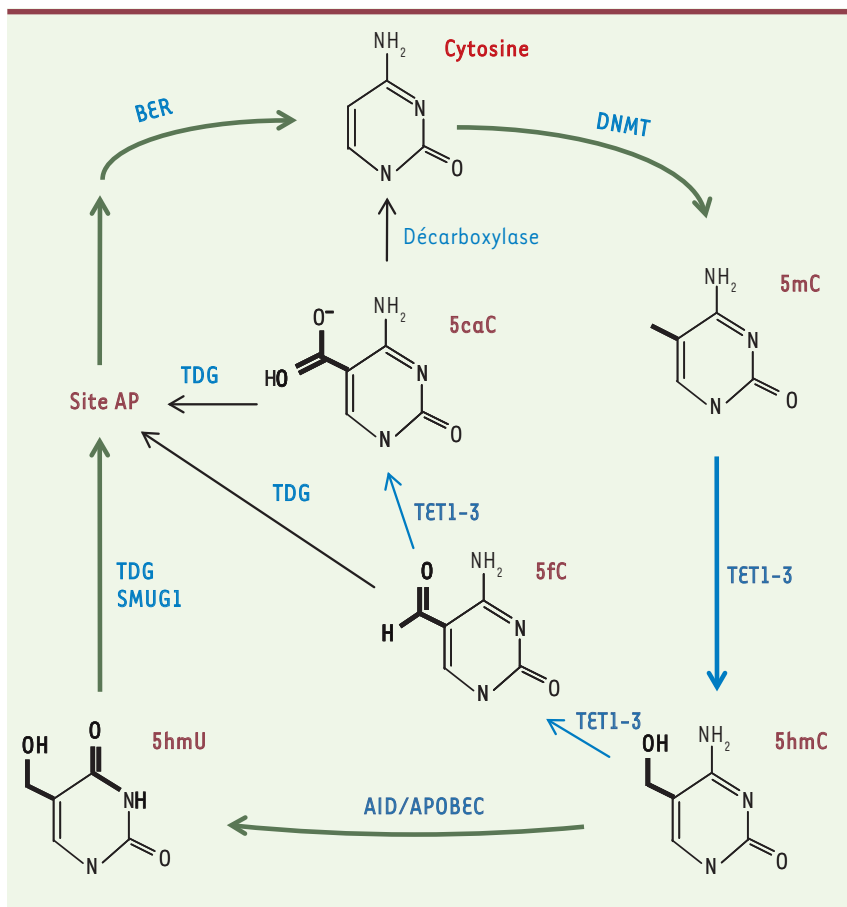


Figure 1. Mécanisme proposé de déméthylation active. La 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) est produite à partir de 5-méthylcytosine (5mC) par les oxygénases de la famille TET. Les 5hmC peuvent ensuite être déaminées par les enzymes de la famille AID/APOBEC (*activation-induced deaminase*), générant des 5-hydroxyméthyluracil (5hmU), qui sont ensuite excisées par la *thymine-DNA glycosylase* (TDG) ou d'autres ADN glycosylases, telles que SMUG1 (*single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*). Le système de base excision repair (BER) réintroduit une cytosine non méthylée qui pourra à son tour être méthylée par les ADN méthylases de la famille DNMT. Alternativement, la réaction d'oxydation par les enzymes TET peut se poursuivre générant des 5-formylcytosines (5fC) et des 5-carboxylcytosines (5caC) qui sont alors directement reconnues par la TDG. Les 5caC pourraient être converties en cytosines par une décarboxylase restant à identifier.

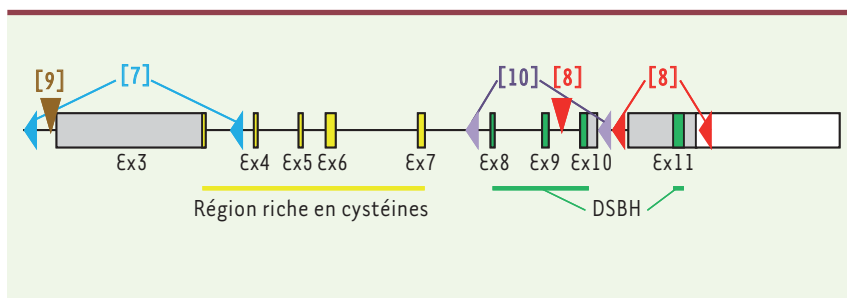


Figure 2. Représentation de la structure du gène Tet2. Les régions ciblées dans les différents modèles d'inactivation chez la souris sont indiquées. Les têtes de flèches horizontales indiquent les sites LoxP. Les flèches verticales indiquent les sites d'insertion des cassettes *gene trap*. La protéine TET2 comprend deux domaines conservés dans l'évolution : une région riche en cystéines en jaune et le domaine catalytique DSBH (*double strand β helix*) en vert.

médullaires immatures (isolées sur leur phénotype LSK : *lineage⁻Sca1⁺cKit⁺*). Dans la plupart des modèles, l'inactivation de *Tet2* entraîne, chez une fraction des souris, le développement de maladies malignes ressemblant à une leucémie myélomonocytaire chronique humaine (monocytose persistante, splénomégalie, moins de 20 % de blastes dans le sang ou la moelle osseuse, dysplasie de plusieurs lignées myéloïdes). La latence du développement de

ces tumeurs suggère que d'autres événements oncogéniques coopérant avec l'anomalie initiale sont nécessaires au développement tumoral. Des anomalies équivalentes sont observées chez les souris hétérozygotes pour l'allèle *Tet2* invalidé et chez des souris portant un allèle hypomorphe du gène. L'observation d'anomalies de la différenciation lymphoïde chez les souris déficientes pour *Tet2* [10] ainsi que la présence de lymphomes concomitants

des pathologies myéloïdes chez les premiers patients chez lesquels nous avons analysés le gène *TET2* [13] nous ont poussés à analyser la séquence de *TET2* dans les proliférations lymphoïdes matures humaines. Nous avons pu observer des mutations de la séquence codante de *TET2* dans 2 % des lymphomes de type B et 12 % des lymphomes de type T. La fréquence des anomalies de *TET2* s'élève à 30 % dans les lymphomes angio-immunoblastiques de type T.

Les types d'anomalies de *TET2* observées dans les lymphomes T sont semblables à ceux qui sont observés dans les hémopathies myéloïdes. De plus, chez certains patients, les mutations observées dans les cellules lymphomateuses ont également été identifiées dans des cellules hématopoïétiques immatures, exprimant l'antigène CD34 et capables de se différencier vers les lignées myéloïdes. Ces données indiquent que les anomalies de *TET2* peuvent survenir dans une cellule à potentialité lymphoïde et myéloïde, voire une cellule souche hématopoïétique, et entraîner le développement aussi bien d'hémopathies myéloïdes que lymphoïdes.

Le gène *TET2* est donc bien un gène de type suppresseur de tumeur. Des variations, même faibles, de l'activité ou de l'expression de *TET2* confèrent aux cellules hématopoïétiques un avantage compétitif vis-à-vis des cellules sauvages. Elles provoquent des anomalies de l'hématopoïèse mais n'entraînent pas directement la transformation cellulaire. Le développement d'hémopathies malignes myéloïdes ou lymphoïdes résulterait plutôt de la

survenue d'autres mutations. Ces deux types de pathologies pourraient donc se développer à partir d'une même atteinte du compartiment des cellules souches hématopoïétiques. ♦

In cauda venenum or the importance of TET(2)

REMERCIEMENTS

Le travail effectué dans les équipes des auteurs a été financé par l'Inserm, l'Institut national du cancer (INCa), la Ligue nationale contre le cancer (LNCC), l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC), la Fondation Gustave Roussy.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. 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 : 930-5.
2. Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* 2011 ; 477 : 606-10.
3. 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 : 166-75.

4. Nabel CS, Kohli RM. Molecular biology. Demystifying DNA demethylation. *Science* 2011 ; 333 : 1229-30.
5. Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 2011 ; 10 : 2662-8.
6. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 946-50.
7. Münzel M, Globisch D, Carell T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011 ; 50 : 6460-8.
8. Bernard OA, Delhommeau F, Fontenay M, Vainchenker W. Mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes humaines. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 785-8.
9. 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 : 11-24.
10. 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 : 25-38.
11. Li Z, Cai X, Cai C, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. *Blood* 2011 ; 118 : 4509-18.
12. 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 USA* 2011 ; 108 : 14566-71.
13. Viguie F, Aboura A, Bouscary D, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? *Leukemia* 2005 ; 19 : 1411-5.

NOUVELLE

VEGF, un facteur responsable de la formation des vaisseaux sanguins au service de la connectique neuronale

Pierre J. Fabre, Frédéric Charron

Laboratoire de biologie moléculaire du développement neuronal, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM) et Département de médecine, Université de Montréal, 110, avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada.
frederic.charron@ircm.qc.ca

► Lors du développement des circuits nerveux et du système vasculaire, l'embryon devient une véritable carte qui indique les positions et les chemins à suivre pour permettre la croissance orientée des axones et des vaisseaux sanguins.

Les neurones se connectent entre eux en suivant de façon très précise les voies délimitées par des molécules attractives et répulsives, qui guident les axones un peu comme les panneaux de signalisation nous guident sur les routes. La découverte des principes généraux sous-

jacents au câblage du système nerveux en développement a fourni les bases génétiques et moléculaires permettant de comprendre comment un ensemble relativement restreint de signaux de guidage suffit à l'assemblage de réseaux nerveux très complexes.

RESUME

Des mutations acquises du gène *TET2* ont été décrites dans les hémopathies malignes humaines. La fréquence de ces anomalies dans les hémopathies myéloïdes est de 10 à 20%, atteignant 50% dans les échantillons de leucémies myélo-monocytaires chroniques (LMMC). Les mutations observées sont inactivatrices, ce qui suggère que *TET2* est un gène de type suppresseur de tumeur et que les mutations retrouvées conduisent à une perte de fonction de la protéine. Ce gène code pour une enzyme capable de modifier les cytosines méthylées. Il participerait ainsi au contrôle de la méthylation de l'ADN et donc à la régulation épigénétique de l'expression génique. Afin de mieux comprendre son rôle au cours de l'hématopoïèse, deux modèles murins d'inactivation du gène *Tet2* ont été développés. Des expériences de greffe de cellules médullaires dans des souris syngéniques montrent que les cellules déficientes pour ce gène présentent un avantage compétitif par rapport aux cellules sauvages. L'analyse des souris invalidées pour ce gène montre une amplification des populations hématopoïétiques immatures, ainsi que des anomalies de la différenciation des lignages myéloïdes et également des lignages lymphoïdes. Une fraction des souris invalidées pour *Tet2* âgées de plus de six mois développe des hémopathies malignes ressemblant à la LMMC humaine. Des anomalies équivalentes sont retrouvées dans les souris hémizygotés pour *Tet2* et dans des souris portant un allèle hypomorphe du gène. L'ensemble de ces résultats montre qu'une dérégulation de l'activité de *Tet2* conduit à des anomalies précoces de l'hématopoïèse, mais n'entraîne pas directement la transformation des cellules progénitrices immatures. La latence du développement de ces tumeurs suggère la nécessité d'une coopération avec d'autres événements oncogéniques, comme des anomalies d'autres acteurs épigénétiques.

Acquired loss-of-function mutations of *TET2* gene are frequently observed in patients with myeloid malignancies, including acute myeloblastic leukemia, myeloproliferative neoplasm, myelodysplastic syndrome, and chronic myelomonocytic leukemia (CMML). The *Ten-Eleven-Translocation* (TET) family proteins are 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases that catalyze the conversion of 5-methyl-cytosine into 5-hydroxymethyl-cytosine, which is proposed to constitute a first step toward cytosine demethylation. To study the function of *Tet2* in murine hematopoiesis, we developed two mouse models in which the catalytic domain of the protein is disrupted. In both models, *Tet2* deficiency leads to the progressive expansion of the immature hematopoietic compartment that includes stem cell and multipotent progenitors. In addition, both *Tet2*-deficient animals display abnormalities of erythroid, megakaryocytic, myelo-monocytic and lymphoid lineages, recapitulated in competitive transplantation assays. With age, *Tet2*-deficient mice develop *bona fide* myeloid tumors. All these properties were shown to be cell-autonomous by bone marrow cells transplantation and *in vitro* assays. Together these data suggest that TET2 activity is essential for normal homeostasis of the hematopoietic system. Its inactivation results in the development of hematologic disorders resembling human CMML myeloid disorders. *TET2* deficiency endows the cells with a competitive advantage over wild type cells, induces hematopoietic differentiation abnormalities but is not responsible for full cellular transformation. The latency observed for CMML development in mouse models of *Tet2* deficiency suggests a requirement for cooperating mutations, such other epigenetic regulator alterations.

MOTS-CLES Hémopathies malignes – TET2 – Suppresseur de tumeur – LMMC – Modélisation

DISCIPLINE Génétique cellulaire et moléculaire

LABORATOIRE INSERM U985 « Génétique des tumeurs », Institut Gustave Roussy, Villejuif