

Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique

Emna Mahfoudhi

► To cite this version:

Emna Mahfoudhi. Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLS026 . tel-01591482

HAL Id: tel-01591482 https://theses.hal.science/tel-01591482

Submitted on 21 Sep 2017

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.







NNT: 2016SACLS026

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS-SUD/INSERM U1170

ECOLE DOCTORALE N° 582 Cancérologie : biologie - médecine - santé

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Par

Emna MAHFOUDHI

Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 29 janvier 2016:

Composition du Jury :

Dr Saparbaev Murat Pr Mossuz Pascal Dr Kosmider Olivier Dr James Chloé Dr Plo Isabelle Dr Villeval Jean-Luc Pr Abbes Salem

DR2, UMR 8200, Gustave Roussy Professeur, CHU Grenoble MCU, INSERM 1016, Institut Cochin MCU, INSERM 1034, Bordeaux CR1, INSERM U1170, Gustave Roussy DR2, INSERM U1170, Gustave Roussy Professeur, Institut Pasteur de Tunis Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Directeur de thèse Co-directeur de thèse Co-encadrant de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le docteur Murat SAPARBAEV d'avoir accepté de présider ce jury de thèse mais aussi de sa collaboration et des discussions intéressantes autour de ce projet.

Je remercie Monsieur le professeur Pascal Mossuz et Monsieur le docteur Olivier KOSMIDER d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Madame le Docteur Chloé James d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur.

Mes sincères remerciements à Isabelle Plo, ma directrice de thèse, qui m'a guidé tout au long de ce travail. Merci Isabelle de ta disponibilité, de ta gentillesse et de ta patience. Merci pour tes compétences qui ont permis de mener à bien cette thèse. C'est un plaisir de travailler avec toi. Le soutien scientifique et la confiance que tu m'as accordés m'ont permis d'apprendre beaucoup.

Je tiens à exprimer mes remerciements à William Vainchenker de m'avoir accueilli dans son équipe, pour ses conseils et la qualité de son encadrement. Grâce à lui j'ai pu finir ma thèse dans les bonnes conditions. Je lui exprime ma reconnaissance et mon respect.

Je remercie Monsieur le professeur Salem Abbes, mon co-encadrant de thèse de m'avoir initié à la recherche mais aussi de m'avoir encouragé à continuer.

Je remercie Monsieur le Docteur Jean-Luc Villeval d'avoir accepté d'être mon co-directeur de thèse

Un grand merci à Ibtissam Talhaoui et à Larissa Lordier qui ont contribué à ce travail.

Je Tiens également à remercier :

Les chercheurs du labo qui n'ont pas hésité à m'aider ou à m'apporter conseil chaque fois que j'en avais besoin : Najet, Nathalie droin, Fawzia, Hana, Antonio, Monika et Isabelle Godin.

Mes chères amies : Kahia, Daniela, Mira et Hind. Ce que je partage avec chacune d'entre vous ne se raconte pas en quelques lignes... Merci de votre solidarité et votre soutien. Merci pour tous les bons moments passés ensembles au labo ou ailleurs. Que de beaux souvenirs !! ⁽²⁾ C'est à qui le prochain anniversaire à propos ?! ;)

Mes adorables voisins de bureau : Mallorie ma conseillère, Stéfania et Liang pour votre sympathie et votre bonne humeur.

Les futurs docteurs du laboratoire : Alberta, Alessandro, Matthieu, Marc, Katé, Fabrizia, Laura, Lise, Franck et Alain, je vous passe plein d'ondes positives et beaucoup de courage.

Tous les membres de l'U1170 : Jane, Cathrine, Caroline, Barbara, Séverine, Valérie, Nathalie Balyn, YanYan, Sagana, Sébastien, Anita, Dominika, Marie, Laure, Delphine, Franck, Laetitia et Richard.

Paul, Rahma et Laurence, toujours de bonne humeur et surtout très généreuses.

Je remercie aussi les ingénieurs de la plate forme Imagerie et cytométrie, Philippe Rameau et Yann Lecluse.

Je dédie cette thèse,

A mes chers parents, un grand MERCI pour tout ce que vous avez fait pour moi, MERCI d'avoir toujours respecté mes choix personnels et professionnels. J'espère vous avoir rendu fiers.

A ma sœur et mon frère toujours présents et si proches malgré les distances. Merci pour votre soutien et vos encouragements.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien financier de :

L'Institut National de la Santé et de la Recherche médicale « INSERM ».

La Direction générale de la recherche scientifique de Tunis « DGRST ».

Sanofi-aventis

L'institut Pasteur de Tunis « IPT »

Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES	6
ABBREVIATIONS	7
RESUME/ ABSTRACT	13
INTRODUCTION	14
I- Hématopoïèse1	5
I-1 Hiérarchie de l'hématopoïèse	15
I-2 Localisation de l'hématopoïèse	17
I-3 Régulation de l'hématopoïèse	.18
I-3-1 Cytokines et facteurs de croissance	18
I-3-2 Facteurs de transcription hématopoïétiques	20
I-4 La différenciation érythroïde	.22
I-5 La différenciation mégacaryocytaire	.24
I-6 La différenciation granulo-monocytaire	25
II-Les hémopathies myéloïdes malignes	.26
II-I Classification	26
II-2 La leucémie aiguë myéloïde (LAM)	27
II-3 Les syndromes myélodysplasiques	28
II-4 Les néoplasmes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs	.29
II-5 Les néoplasmes myéloprolifératifs	30
II-5-1 La leucémie myéloïde chronique (LMC)	.30
II-5-2 Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques	.30
II-5-2-a Mutation JAK2-V617F	.31

II-5-2-b Les autres gènes mutés dans les NMP	.32
II-5-2-c Mutations impliquées dans les leucémies secondaires	.34
III- TET2 et instabilité génétique	.36
III-1 L'épigénétique	.36
III-1-1 Méthylation de l'ADN	.37
III-1-2 Déméthylation de l'ADN	.38
III-2 La famille TET	.39
III-2-1 Expression et localisation cellulaires des TETs	.39
III-2-2 Structure des protéines TET	.40
III-2-3 Fonction enzymatique des TETs	.40
III-3 Les fonctions biologiques de TET2	.41
III-4 Les mutations de TET2 dans les hémopathies myéloïdes malignes	.41
III-5 Conséquences de l'altération de TET2 dans les modèles murins	.44
III-6 TET2, 5-hmC et méthylation	.46
III-6-1 Autres mutations affectant les 5-hmC	.47
III-6-1-a IDH1/ IDH2	.47
III-6-1-b Autres	.48
III-6-2 Métabolisation des 5-hmC : la réparation par excision de base	.50
III-6-2-1 Etapes et mécanisme de la réparation par BER	.51
III-6-1-a Détection de la lésion par les ADN glycosylases	.51
-Les glycosylases monofonctionnelles	.51
-Les glycosylases bifonctionnelles	.52
III-6-1-b La BER Short-patch	.52
III-6-1-c La BER Long-patch	.52
	2

III-7 La thymidine DNA glycosylase (TDG)	54
III-7-1 Structure de TDG	54
III-7-2 Fonctions et rôle de TDG au cours de la déméthylation active	55
III-8 BER et cancer	56
III-9 TET2, BER et instabilité génétique	56
Article 1 : Propriétés et rôles biologiques des protéines TET au cours du développer l'hématopoïès.	nent et de 58
IV-P53	59
IV-1 Structure de P53	59
IV-2 Fonctions de P53	60
IV-2-1 Générales	60
IV-2-2 Rôle de p53 dans l'hématopoïèse	63
IV-3 Régulation de p53	64
IV-3-1 Régulation négative par MDM2 et MDM4	65
IV-3-2 Rôle de MDM2 et MDM4 dans l'hématopoïèse	66
IV-4 Les mutations de P53 ou les amplifications de MDM2 ou MDM4 dans les cancers	66
IV-5 Les mutations de <i>P53</i> dans les hémopathies malignes	68
IV-6 Implication de P53 dans les maladies hématologiques comme les ribosomopathies	69
IV-7 Implication de P53 en clinique dans les hémopathies myéloïdes malignes	70
IV-7-1 Les petites molécules inhibitrices de l'interaction P53-MDM2	
a. La Nutline	71
b. Le MI-219	71
c. Le RG1172	72
d. Le SAR405838	73

OBJECTIFS DU TRAVAIL
RESULTATS
Résultats 1 : la surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5-hmC induit l'instabilité génétique et augmente la mutagenèse en absence de Tdg
Contexte et objectif du travail
Résultats
Discussion et perspectives
Article 2: TET2-mediated 5-hydroxymethylcytosine induces genetic instability and mutagenesis
Résultats 2: Effet de l'activation de P53 par les antagonistes de MDM2 sur les progéniteurs hématopoïètiques et la mégacaryopoïèse
Contexte et objectif du travail
Résultats
Discussion
Perspectives
Article 3: Impaired hematopoietic progenitors and megakaryopoiesis by P53 activation
DISCUSSION ET PERSPECTIVES
Partie I: La surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5-hmC induit l'instabilité génomique et augmente la mutagenèse en absence de TDG
I- Surexpression de TET2 et ralentissement du cycle cellulaire
II- Surexpression de TET2 et instabilité chromosomique
III- TDG/TET un partenariat pour la maintenance de la déméthylation et de l'intégrité du génome97
La transition C->T97
TDG protège les ilots CpG de l'hyperméthylation97
Implication potentielle de MBD4, une autre glycosylase

IV- Comparaison entre le phénotype observé suite à l'augmentation des 5-hmC et le traitement par les agents déméthylants
V- Défaut en TET2 et instabilité chromosomique
VI- Divers rôles joués par les 5-hmC101
Parties II : Effet de l'activation de p53 par des antagonistes de mdm2 au cours de l'hématopoïèse103
I- Un effet dépendant des divisions cellulaires
II- L'addition de fortes doses de TPO ne diminue pas la cytotoxicité105
II- Effet du SAR sur la mutation JAK2V617F dans les hémopathies malignes105
IV- Résistance aux drogues et autres approches pour cibler P53106
IV-1 Restauration des fonctions normales de P53 mutée107
IV-2 La thérapie génique par un gène <i>P53</i> wild-type107
IV-3 La létalité synthétique
IV-3-1 Combinaison avec d'autres drogues
IV-3-1-a Dans notre étude : combinaison de SAR405838 avec un anti-CHK1, le MK-776108
IV-3-1-b Dans les autres études
CONCLUSION : TET2 et P53, deux suppresseurs de tumeurs
LISTE DES PUBLICATIONS
ANNEXES PUBLICATIONS
Annexe1: Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone
Annexe 2: Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Hiérarchie de l'hématopoïèse selon le modèle classique et sa régulation par les cytokines
Figure 2 : Régulation de l'hématopoïèse par les facteurs de transcription22
Figure 3 : Classification des hémopathies myéloïdes malignes selon l'OMS 200827
Figure 4 : Fréquence des mutations de <i>TET2</i> dans les hémopathies myéloïdes42
Figure 5 : Effet de l'inactivation de TET2 au cours du développement des hémopathies myéloïdes
Figure 6 : Les différents facteurs affectant le taux des 5-hmC50
Figure 7 : Les différentes étapes de la réparation par excision de base53
Figure 8 : Structure d'un monomère de la protéine P5360
Figure 9 : Régulation de P53 par MDM2 au repos et en réponse à un stress62
Figure 10 : Rôle de P53 au cours de l'hématopoïèse64
Figure 11 : Régulation de P53 par les antagonistes de MDM275
Figure 12 : Hypothèse du projet81
Figure 13 : Mécanismes aboutissant à la transition C->T après méthylation des cytosines
Figure 14 : Effet de la stabilisation de P53 au cours de l'hématopoïèse104
Figure 15 : Effet des antagonistes de MDM2 sur les cellules JAK2V617F positives dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP)
Figure 16 : Effet combiné du SAR405838 et de MK-8776 sur les cellules JAK2V617F positives dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP)109
Figure 17 : Rôles de P53 et TET2, deux suppresseurs de tumeurs dans un contexte hématopoïétique

ABBREVIATIONS

Α

aa	:	Acide aminé
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
AKT	:	Protéine kinase-B
α-KG	:	alpha-KétoGlutarate
α-HG	:	alpha-HydroxyGlutarate
ASXL1	:	Additionnel Sex Combs Like 1
AID/APOBEC	:	Activation Induced cytidine Deaminase/Apolipoprotein B
AIM2	:	Absent in melanoma 2
AP	:	apurinique/apyrimidinique
APE1	:	Endonuclease-AP
ATP	:	Adenosine Tri Phosphate
В		
Bax		Bcl-2 associated X protein
BER	:	Base excision repair
C		
CALR	:	Calréticuline
5-caC	:	5-carboxylcytosine
CSE	:	Cellule Souche Embryonnaire
CSB	:	Cassures simple brin
CDB	:	Cassures double brin
CD	:	Cluster de différenciation
CSF	:	Colony-Stimulating Factor

CFU-GEMM	:	Colony forming units-Granulocyte/ Erythrocyte/ Macrophage/ Megacaryocyte
CBL	:	Casitas B-lineage lymphoma
CSH	:	Cellule souche hématopoïétique
CUX1		Cut-Like Homeobox 1
D		
DB	:	Dommages des bases
DNMT	:	DNA Méthyltransférase
Ε		
EZH2	:	Enhancer of Zeste Homologue 1
EED	:	Embryonic Ectoderm Development
EPO	:	Erythropoïétine
EVI 1	:	Ectopic virus integration site 1 protein homolog
F		
FEN1	:	Endonuclease flap 1
FGFR1	:	Fibroblasts growth factor receptor 1
FH	:	fumarate hydratase
5-fC	:	5-formylcytosine
G		
GATA	:	GATA binding protein
GADD45a		Growth-arrest and DNA-damage-inducible protein 45
GM-CSF	:	Granulocyte Monocyte- Colony-Stimulating Factor
Н		
HpaII	:	Haemophilus parainfluenzae type-2 restriction enzyme
HoxA	:	Homeobox A cluster
HDM2	:	Human Double Minute2

2-HG	:	2-hydroxyglutarate
5-hmU	:	5-hydroxyméthylUracyl
Ι	:	
IDAX	:	Inhibition of the Dvl And Axin Complex
IDH1/2	:	Isocitrate DéHydrogenase 1/2
IL	:	Interleukine
IFNα	:	Interferon-a
IKZF1		IKaros family Zinc Finger protein 1
J		
JAK2	:	Janus kinase2
JENH	:	Jonction des extrémités non homologue
К		
KRAS	:	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KIT	:	Récepteur du stem cell factor
L		
LMMC	:	Leucémie myélomonocytaire chronique
LNK	:	Lymphocyte specific adaptor protein
LMC	:	Leucémie myéloïde chronique
LAM	:	Leucémie aigue myéloide
LIG3	:	ADN ligase III
Μ		
MPL	:	Myeloproliferative leukemia protein
mTOR	:	mammalian Target Of Rapamycin
MFP	:	Myélofibrose primaire
MDM2/4	:	Murine Double Minute2/4

MLL	:	Mixed Lineage Leukemia
MEIS 1	:	Myeloid ectopic viral integration site 1
MUTYH	:	MutY homolog glycosylase
MUG	:	Mismatch Uracil Glycosylase
MPG	:	N-methylpurine-DNA glycosylase
MBD	:	Methyl-CpG-binding domain protein
MPT	:	Modifications post traductionnelles
5-mC	:	5-méthylcytosine
5-hmC	:	5-hydroxyméthylcytosine
Ν		
NMP	:	Néoplasmes myéloprolifératifs
NurD	:	Nuclesome remodeling and histone Deacetylase complex
NRAS	:	Neuroblastoma RAS viraloncogene homolog
NCSTN	:	Nicastrin
NTH1	:	Endonuclease III-like protein 1
NEIL1	:	Endonucléases VIII-like protein 1
NPM1	:	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
0		
2-OG	:	2-Oxoglutarate
OGG1	:	80x0-Guanine glycosylase
Р		
PLC	:	Progéniteur lymphoïde commun
РМС	:	Progéniteur myéloïde commun
PV	:	Polyglobulie de Vaquez
PIP2	:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PDGFRA	:	Platelet-derived growth factor receptor alpha polypeptide

PDGFRB	:	Platelet-derived growth factor receptor beta polypeptide
Ph		Phyladelphie
PI3K	:	Phosphatidylinositol 3-kinase
PTEN	:	Phosphatase and TENsin homolog
PR-DUB	:	Polycomb Repressive DeUBiquitylase complex
PRC	:	Polycomb Repressive Complex
PIP3	:	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PPT	:	Proplaquettes
РМС	:	Progéniteur Myéloide commun
PGM	:	Progéniteur GRANULEUX COMMUN
PME	:	Prog2niteur mégacaryocyte commun
Polβ	:	ADN polymérase β
PCNA	:	Proliferating cell nuclear antigen
PPARα	:	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PRIMA-1	:	P53 reactivation and induction of massive apoptosis-1
PU.1	:	Purine-rich box1
PUMA	:	P53 up-regulated modulator of apoptosis
R	:	
RH	:	Recombinaison homologue
ROS	:	Reactive Oxygen Spicies
RI	:	Radiations Ionisantes
S		
SMD	:	Syndromes myélodysplasiques
STAT	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUZ12	:	SUppressor of Zeste 12 homolog
SAM	:	S-adénosyl-méthionine

SRSF2	:	Sérine/arginine rich splicing factor 2
SP140	:	SP140 nuclear body protein
SDH	:	succinate dehydrogénase
SMUG	:	single-strand selective monofunctional uracil glycosylase
Sh RNA	:	Small hairpin RNA
Τ		
TE	:	Thrombocytémie essentielle
TET	:	Ten eleven translocation
TDG	:	Thymine DNA Glycosylase
TPO	:	Thrombopoïétine
TGF-β	:	Transforming growth factor beta
TNF-α	:	Tumor necrosis factor alpha
TP53	:	Tumor protein 53
U		
UNG	:	Uracil N-glycosylase
X		
XRCC1	:	X-Ray repair cross-complementing
W		
WHO	:	World Health Organization

Titre : Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique

Mots clés : TET2, 5-hmC, instabilité génomique, mutagenèse, P53, MDM2.

Résumé

TET2 et P53, deux suppresseurs de tumeurs, jouent un rôle important dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques et sont trouvés mutés dans les hémopathies malignes. Ils sont aussi impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, notamment la voie de réparation par excision de base (BER). Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5-hmC, ralentit la progression du cycle cellulaire et la transition G1/S et induit une instabilité chromosomique associée à une instabilité centrosomique dans un modèle cellulaire Ba/F3. De plus, la surexpression de TET2 induit l'augmentation de la mutagenèse particulièrement des transitions C->T dans les sites CpG dans un contexte déficient en thymidine DNA glycosylase (TDG), une protéine initiatrice du BER. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons montré que l'activation de P53, par des antagonistes de MDM2, a un effet délétère sur tous les progéniteurs hématopoïétiques. Ces antagonistes induisent une cytotoxicité non seulement dans les stades précoces de la mégacaryopoïèse, mais aussi dans les stades tardifs. Cette cytotoxicité n'est pas réversible, contrairement à ce qui est observé en clinique, et ne peut pas être restaurée par des doses croissantes de thrombopoïétine. Au total, TET2 et P53 doivent être strictement régulés pour assurer l'homéostasie et la stabilité génétique des cellules hématopoïétiques.

Title: Role of Two tumor suppressors, TET2 and P53, in a hematopoietic context.

Key words: TET2, 5-hmC, genomic instability, mutagenesis, P53, MDM2.

Abstract

Two tumor suppressors, TET2 and P53, play an important role in the homeostasis of hematopoietic stem cells and have been found mutated in hematological malignancies. They are also involved in cell cycle control and DNA repair mechanisms, including the base excision repair pathway (BER). In the first part of this work, we showed that TET2 overexpression and the consequent increase of 5-hmC, inhibit cell cycle progression particularly G1/S transition and induce chromosomal instability associated with centrosome instability in Ba/F3 cellular model. In addition, overexpression of TET2 induces increased mutagenesis particularly transitions C->T at CpG sites in a context deficient in thymidine DNA glycosylase (TDG), a protein initiating BER. In the second part of this work, we have shown that P53 activation by MDM2 antagonists has deleterious effect on all haematopoietic progenitors. These antagonists also induce cytotoxicity not only in the early stages of megakaryopoiesis but also mainly in the late stages. This cytotoxicity is not reversible, in contrast to what is observed in clinic, and cannot be restored by increasing thrombopoietin doses. To conclude, TET2 and P53 must be strictly controlled to ensure homeostasis and genetic stability of the hematopoietic cells.

INTRODUCTION

I- Hématopoïèse:

I-1 Hiérarchie de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique qui aboutit à la formation, à la maturation et au remplacement continu de toutes les cellules sanguines matures dites myéloïdes à savoir, les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes et l'ensemble du système immunitaire innée et adaptatif (lymphocytes T et B, cellules NK, cellules dendritiques, lymphocytes de l'immunité innée) à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH).

Le système hématopoïétique est un tissu très hiérarchisé et pyramidal. Au sommet de la pyramide se trouvent les CSHs. Ces cellules sont caractérisées par deux propriétés fondamentales : l'auto-renouvellement, c'est à dire la capacité de se diviser à l'identique afin de conserver le stock médullaire des CSHs et la multipotence qui représente la capacité de se différencier pour générer les différentes lignées cellulaires du sang (Orkin 2000). Ainsi, une CSH peut générer, de façon asymétrique, deux cellules filles dont une restera en contact avec la niche hématopoïétique des cellules souches tout en conservant sa propriété d'auto-renouvellement, tandis que l'autre s'engage spécifiquement vers l'une des deux principales voies de différenciation hématopoïétique : la lignée lymphoïde ou la lignée myéloïde.

L'hématopoïèse est décrite comme un système dans lequel une CSH donne des progéniteurs, des précurseurs et finalement des cellules matures différenciées, sous l'effet des cytokines et des facteurs de croissance.

Les progéniteurs sont des cellules ayant une capacité d'auto-renouvellement et de multipotence plus restreinte que celle des CSHs. Après plusieurs divisions, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée à ce stade et vont après division, rentrer dans la différenciation dite terminale ou maturation. Les précurseurs les plus immatures sont les myéloblastes, les proérythroblastes, les mégacaryoblastes, les lymphoblastes et les monoblastes. Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables.

Selon le modèle classique, une CSH donne naissance à un progéniteur multipotent commun (PMC) qui à son tour se différencie en progéniteur lymphoïde commun (PLC) et progéniteur myéloïde commun (PMyC) (Kondo et al. 1997) (Akashi et al. 2000). Le PLC se différencie d'abord en différents progéniteurs qui vont donner les différentes lignées lymphoïdes y compris les cellules NK et les cellules dendritiques d'origine lymphocytaire.

La hiérarchie des cellules hématopoïétiques a été déterminée par deux types d'analyses : le premier basé sur des tests biologiques (Colony Forming Unit) et de transplantation, le second sur l'immunophénotypage des cellules.

Dans les abords biologiques, les CSHs ont été d'abord définies par des tests de transplantation qui ont abouti à la démonstration de l'hétérogénéité des CSHs avec des CSHs reconstituant à long terme et d'autres à court terme. Le premier test quantitatif du compartiment des CSHs a été décrit en 1961 par Till et Mc Culloch (Till and Mc 1961), le test du CFU-S correspondant à une cellule multipotente avec des capacités d'autorenouvellement. Ces cellules correspondent à des CSHs reconstituant à court terme ou même des cellules encore plus engagées. Les progéniteurs ont eux été définis par des tests de clonage in vitro en milieu semi solide. Le progéniteur le plus immmature est multipotent et est appelé CFU-GEMM (Colony Forming Units-Granulocyte/ Erythrocyte/ Macrophage/ Megacaryocyte), ce dernier va générer des progéniteurs plus différenciés comme les CFU-GM (Granulocyte/Monocyte), -Eo (Eosinophile), -B (Basophile ou mastocytaire), -MK (Mégacaryocyte) ou -E (Erythrocyte) sachant que dans la lignée érythroblastique deux types au moins de progéniteurs ont été définis l'un immature appelé BFU-E et l'autre plus mature appelé CFU-E. Ces progéniteurs sont spécifiques d'une seule lignée et après un nombre variable de divisions aboutissent euxmêmes à des précurseurs immatures (myéloblastes, monoblastes, proérythroblastes et mégacaryoblastes), qui donneront naissance aux granulocytes neutrophiles, aux granulocytes éosinophiles, aux granulocytes basophiles, aux mastocytes et aux monocytes/macrophages qui peuvent donner ensuite des ostéoclastes et des cellules dendritiques myéloïdes, aux érythrocytes et aux plaquettes, respectivement. Dans ce système deux types de progéniteurs bipotents on été définis, les granulo-monocytaires (CFU-GM) et les érythroïdesmégacaryocytaires (CFU-EMég). Les différentes étapes de l'hématopoïèse, selon le modèle classique, sont résumées dans la figure 1 (Figure 1).

Le développement hiérarchique depuis les CSHs jusqu'aux cellules sanguines matures implique une perte progressive des capacités de la CSH et l'acquisition de potentiels spécifiques des lignées engagées. Cette hiérarchie peut aussi être étudiée par des antigènes de différenciation (CD) à l'aide d'anticorps pour réaliser des immunophénotypages. Cet abord a en particulier permis de définir une hiérarchie complète chez la souris avec la purification de CSH à long terme avec des puretés de 50%. Des approches similaires mais plus préliminaires ont été réalisées chez l'homme. Les cellules multipotentes ayant la capacité

d'autorenouvellement sont des cellules Lin⁻CD34⁺CD38⁻Thy1⁺CD45RA⁻ chez l'homme. Thy1 (CD90) et le CD34 sont des glycoprotéines membranaires fortement glycosylées. Ces cellules seraient l'équivalents des CSHs à long terme, les cellules CD34⁺CD38⁻CD90⁻ CD45RA⁻ seraient l'équivalent des CSHs à court terme et les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁺ FLT3⁺ représenteraient l'équivalent du PLC. L'expression du CD38 marque la perte de la capacité d'autorenouvellement et du potentiel bipotent lymphomyeloïde (Hao et al. 1998) (Terstappen et al. 1991). Ainsi les cellules CD34⁺CD38⁺, qui représentent la fraction majeure de la population CD34⁺ sont des cellules plus différenciées. La coexpression du CD10 ou CD7 dans les cellules CD34⁺ caractérise l'engagement vers les progéniteurs lymphoïdes (Galy et al. 1995) (Hao et al. 2001; Manz et al. 2002). La fraction lin⁻CD34⁺CD38⁺ peut être séparée en trois populations distinctes: les cellules IL-3Ra⁻CD45RA⁻ (les PMyCs), les cellules IL-3Ra^{lo}CD45RA⁺ (les PGMs) et les cellules IL-3Ra⁻CD45RA⁻ (les PMEs). Ces trois populations expriment de façon relativement uniforme le récepteur du SCF c-Kit (CD117), le CD13, le CD33, et le HLA-DR, mais elles n'expriment plus le marqueur Thy-1 (CD90) (Manz et al. 2002).

I-2 Localisation de l'hématopoïèse :

Chez l'homme, la mise en place de l'hématopoïèse se déroule en trois étapes: i) l'hématopoïèse primitive au cours de l'embryogenèse, ii) l'hématopoïèse définitive au cours du développement fœtal et iii) l'hématopoïèse adulte. L'hématopoïèse primitive commence à partir de la 3^{ème} semaine (J19) de la vie embryonnaire et dure jusqu'à la fin de la 8^{ème} semaine du développement intra-utérin. Elle est caractérisée par la formation d'îlots sanguins au niveau du sac vitellin. Au sein des îlots sanguins, les cellules centrales se différencient en érythrocytes nucléés et les cellules périphériques forment les premières cellules endothéliales. A ce stade il n'y a pas de vraies CSH. L'hématopoïèse définitive commence à partir de la 8^{ème} semaine et se poursuivit jusqu'au 6^{ème} mois, d'abord localisée dans la région splanchnique. Elle émerge à partir de cellules endothéliales de l'aorte dorsale de la région dite AGM (Aorte-Gonade-Mésonéphros) par une transdifférenciation des cellules endothéliales en CSH, processus appelé transition endothelio- hématopoïétique, TEM). Les mécanismes responsables ou régulant cette TEM sont en cours de caractérisation mais le flux sanguin par la génération d'AMPc joue un rôle majeur ainsi que probablement la voie Notch. Un des points fondamentaux dans les théories actuelles est que les CSHs émergent en seule fois en nombres restreints et seront ensuite amplifiées pour la vie entière. Une fois formées, les CSHs initiales migrent dans le foie fœtal pour être amplifiées et donner une hématopoïèse qui va donner tous les types de cellules sanguines, puis dans la rate. Parallèlement et à partir du 4^{ème} mois de la vie intra-utérine, la moelle osseuse commence à être colonisée, et prendra progressivement la relève des autres sites. Elle sera le site exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et pour toute la vie. Jusqu'à l'âge de 5 ans tous les os ont une activité hématopoïétique. Ensuite, cette activité va progressivement se limiter au niveau des os courts et plats (sternum, cotes, vertèbres, os iliaques)

I-3 Régulation de l'hématopoïèse :

I-3-1 Cytokines et facteurs de croissance

La régulation de l'hématopoïèse est assurée en grande partie par des facteurs de croissance appartenant à la superfamille des cytokines. Cette dernière 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), la TPO au contraire de l'EPO étant à la fois une hormone et une cytokine classique.

Ces facteurs agissent soit à toutes les étapes de la différenciation, soit à des stades précis. Leur action majeure est impliquée dans la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules en cours de maturation. Cependant, il existe des arguments de plus en plus importants sur le rôle des cytokines sur les CSHs (quiescence, prolifération, survie et même détermination vers une lignée). L'ensemble des cytokines agissant au niveau des différentes étapes de l'hématopoïèse est indiqué dans la figure 1 (**Figure 1**).

En fonction de leur site d'action au cours de l'hématopoïèse, on peut distinguer 3 types de facteurs de croissance :

-Les facteurs multipotents : ils permettent la survie et la différenciation des CSHs. Ce sont l'IL3 et le GM-CSF que l'on retrouve à tous les stades de différenciation de la lignée myéloïde.

-Les facteurs de promotion : ils augmentent le nombre des CSHs et les sensibilisent à l'action d'autres facteurs de croissance. Ce sont principalement l'IL1, l'IL4, l'IL6, le SCF (Stem Cell Factor) et le Flt3-L.

-Les facteurs restreints (ou spécifiques de lignées) : ils agissent sur les cellules déjà engagées en favorisant la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont le G-CSF, le M-CSF, l'IL4, l'IL5, l'IL6, l'EPO et la TPO.

En fait cette classification ne correspond pas à la réalité car de nombreuses cytokines ont des actions majeures à la fois sur les temps précoces et tardifs de l'hématopoïèse. Les trois exemples sont le SCF (il a une action sur les mastocytes et les CSHs), la TPO (elle a une action sur les mégacaryocytes/plaquettes et les CSHs) et le M-CSF (qui a une action sur les macrophages et les CSHs).

Des interactions complexes des différentes cytokines assurent le maintien de l'hématopoïèse normale. Les facteurs de croissance comme l'EPO, le GM-CSF, le SCF, le G-CSF et l'IL-3 favorisent la différenciation des progéniteurs érythroïdes et myéloïdes. D'autre part, l'interféron, les interleukines, le TGF- β et le TNF- α ont une action complexe sur les CSHs pouvant les mettre en cycle (Interférons et TNF- α) ou au contraire les mettre en quiescence (TGF- β). Le déséquilibre entre l'action des facteurs stimulateurs d'un coté et les facteurs inhibiteurs de l'autre coté pourrait être à l'origine d'un effet myélo-suppresseur et d'une défaillance de la moelle osseuse.

L'hématopoïèse est aussi régulée par un système complexe de nombreux composants non cytokiniques liés au microenvironnement (les interactions cellulaires, les médiateurs du système neurologique et la matrice extracellulaire). Ce système aboutit à la notion de niches hématopoïétiques. La caractérisation de ces niches a été ces dernières années un sujet d'investigation très important avec la caractérisation de deux niches : une niche sinusoïdale et une niche péri artériolaire, ayant des rôles importants dans la régulation des CSHs. De manière intéressante des cellules hématopoïétiques jouent un rôle important dans cette niche comme les ostéoclastes, les macrophages, les cellules lymphoïdes et les mégacaryocytes. Des altérations de cette niche pourraient être à l'origine de maladies hématologiques (aplasies, hémopathies malignes) et contribuer au vieillissement du système hématopoïétique, processus majeur dans le déficit immunitaire et l'émergence d'hémopathies myéloïdes malignes associées avec l'âge.



Figure 1 : Hiérarchie de l'hématopoïèse selon le modèle classique et sa régulation par les cytokines. Au cours de l'hématopoïèse la cellule souche hématopoïétique (CSH) donne naissance à un progéniteur lymphoïde commun (PLC) et à un progéniteur myéloïde commun (PMyC). Le PLC se différencie d'abord en progéniteurs immatures, les lymphoblastes (Pro-B et Pro-T), qui aboutiront aux lymphocytes B et T. Le PMyC se différencie en progéniteurs plus matures appelés CFU-GM (Granulocyte/Monocyte) et CFU-E/Még (Erythrocyte/ mégacaryocyte) qui donneront naissance aux granulocytes, aux monocytes/macrophages, aux érythrocytes et aux plaquettes, respectivement. Un ensemble de cytokines régulent la prolifération et la différenciation des CSHs et des progéniteurs vers les cellules matures. Certains de ces cytokines sont nécessaires pour les stades précoces de l'hématopoïèse, d'autres sont requises pour les stades terminaux et la maturation cellulaire.

I-3-2 Facteurs de transcription hématopoïétiques

La différenciation des CSHs multipotentes vers des cellules sanguines matures et fonctionnelles exige la régulation des profils d'expression des gènes spécifiques de chaque lignée et à chaque stade de l'hématopoïèse. Ce processus est assuré par de nombreux facteurs de transcription qui agissent de façon synergique ou antagoniste. Ces facteurs modulent l'expression de gènes qui sont impliqués dans le maintient des fonctions de la CSH (comme

RUNX1/CBFα, SCL/TAL-1 et GATA2) ou qui aboutissent à l'engagement de progéniteurs immatures dans la lignée myéloïde (comme GATA1 et PU.1) ou lymphoïde (comme GATA3, PAX5 et Ikaro)

Au niveau de la CSH : SCL/TAL-1 et son partenaire LMO2 (Lim-domain only 2) sont essentiels pour le développement de l'hématopoïèse primitive et définitive (Kim et Bresnick 2007). En leur absence, aucune génération de cellules sanguines n'est possible. MLL et RUNX1 sont aussi essentiels pour la génération des CSHs au niveau des différents sites (Orkin 2000). RUNX1 est le facteur de transcription directement impliqué dans la TEM au niveau de l'aorte dorsale. La diminution de l'expression de PU.1 et de C/EBP α peut affecter le contrôle de l'autorenouvellement des CSHs. L'altération de l'expression de PU.1 à la naissance conduit à l'épuisement rapide des CSH (Iwasaki et al. 2005), tandis que celle de C/EBP α induit l'expansion des CSHs (Zhang et al. 2004).

Au cours de la différenciation : l'expression de PU.1 est requise pour passer aux stades de PMC et PLC. L'expression des facteurs GATA et l'interaction de GATA-1 avec FOG-1 (Friend of GATA) sont indispensables pour le développement érythroïde et mégacaryocytaire (Iwasaki et Akashi 2007) (Chang et al. 2002). Il existerait une compétition entre GATA1 et PU.1 pour induire la détermination d'un PMyC vers les lignées granulo-monocytaires ou érythro-Mégacaryocytaires. GATA-1 régule tous les stades de la différenciation terminale mégacaryocytaire et érythroblastique (Kaushansky 2005). D'autres facteurs de transcription sont aussi impliqués dans le contrôle de la différenciation MK, FLI-1 est essentiel dans les stades précoces et intermédiaires de la mégacaryopoïèse alors que NF-E2 régule les stades tardifs et la production des plaquettes (Shivdasani 1996) (Shivdasani 2001). EKLF n'est pas exprimé dans les CSHs, il est faiblement détecté au niveau du PMC, cependant, son expression augmente sélectivement au cours des stades terminaux de la différenciation érythroïde (Siatecka et Bieker 2011). On a suggéré qu'il existait une compétition entre EKLF et FLI1 qui détermine la différenciation d'un PEMég ou bien vers la lignée mégacaryocytaire ou bien vers la lignée érythroblastique (Bouilloux et al. 2008).

L'engagement du progéniteur myéloïde vers la granulopoïèse est conditionné par un équilibre entre l'action du C/EBP α et celle du PU.1. En effet, tandis que C/EBP α permet préférentiellement la différentiation en polynucléaires neutrophiles, la forte expression de PU.1 favorise plutôt la différentiation en monocyte (Borregaard 2010) (Reddy VA et al. 2002) (Dahl R et al. 2003). Le facteur C/EBP α est actif durant toute la différenciation granulocytaire. GFI-1 favorise l'engagement et la progression de la granulopoïèse et inhibe la transcription des gènes impliqués dans la différentiation monocytaire (Horman et al. 2009). C/EBP α en synergie avec le G-CSF induit l'augmentation de l'expression de C/EBP ϵ permettant ainsi la formation des granulations spécifiques et la différentiation terminale des granulocytes. Les principaux facteurs de transcription régulant l'hématopoïèse sont indiqués dans la figure 2 (**Figure 2**).



Figure 2: Régulation de l'hématopoïèse par les facteurs de transcription. La différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) vers des cellules sanguines matures et fonctionnelles exige la régulation des profils d'expression des gènes spécifiques de chaque lignée et à chaque stade de l'hématopoïèse. Ce processus est assuré par de nombreux facteurs de transcription qui agissent de façon synergique ou antagoniste. Ces facteurs modulent l'expression de gènes qui sont impliqués dans le maintien des fonctions de la CSH ou qui aboutissent à l'engagement de progéniteurs immatures dans la lignée myéloïde ou lymphoïde, ainsi que pour la différenciation terminale et la maturation cellulaire.

I-4 La différenciation érythroïde :

L'érythropoïèse est également hiérarchisée tout comme l'hématopoïèse. Les progéniteurs érythroïdes les plus précoces sont les BFU-E. Ces cellules expriment les antigènes CD33, CD34, HLA-DR et peu de récepteurs à l'érythropoïétine (EPO-R). Les BFU-E ont une forte capacité de prolifération et nécessitent les facteurs de croissance multi lignage comme l'IL3, le GM-CSF et surtout le SCF pour leur prolifération et leur survie en plus de l'EPO. L'EPO est à la fois un facteur mitogène et un facteur de survie pour les BFU-E. Le SCF synergie avec l'EPO pour induire l'augmentation de la taille des colonies de BFU-E et éviter l'apoptose. Il a été suggéré que des BFU-E en présence de SCF et de corticostéroïdes et plus récemment d'activateur de PPARa pouvaient s'autorenouveler permettant une expansion majeure de l'érythropoïèse en cas de stress (Kolbus et al. 2003) (Lee et al. 2015). Les CFU-E sont les descendants directs des BFU-E, ils ont un potentiel prolifératif limité. Les CFU-E n'expriment plus le CD34 et le HLA-DR mais expriment le CD36, fortement le récepteur de la transferrine (le CD71), et l'EPO-R dont l'expression a augmenté. A ce stade, l'EPO est plutôt un facteur de survie qu'un facteur mitogène. Il a été suggéré que la régulation de l'érythropoïèse est régulé par la sensibilité à l'EPO, en condition basale seules les progéniteurs très sensibles à l'EPO survivent, en cas de stress l'ensemble des progéniteurs entrent en différenciation. Chez les souris transgénique qui n'expriment pas l'EPO ou l'EPO-R, l'érythropoïèse s'arrête au stade CFU-E (Kieran et al. 1996). En effet jusqu'au stade CFU-E, le SCF est le facteur majeur, ensuite l'EPO devient indispensable. Les CFU-E donnent naissance aux proérythroblastes, les premières cellules érythroïdes morphologiquement identifiables. Au cours de leur maturation, les proérythroblastes passent par différents stades (basophile, polychromatophile et acidophile) qui représentent les stades successifs du processus d'hémoglobinisation et de condensation nucléaire. L'énucléation des érythroblastes acidophiles donne naissance aux réticulocytes. Les réticulocytes perdent progressivement leurs ARN et leurs mitochondries dans la moelle puis deviennent des globules rouges matures après leur entrée dans la circulation (Robb 2007) (Nakahata and Okumura 1994).

Il existe des preuves croissantes que la régulation de l'érythropoïèse terminale en particulier les modifications de taille et du noyau est assurée par un processus dépendant des caspases proche de l'apoptose (Zermati et al. 2001) (Ribeil et al. 2007) (Zeuner et al. 2003).

Les cytokines inflammatoires comme l'interféron- γ (IFN- γ), IL-1 (α et β), IL6 et le tumornecrosis factor- α (TNF- α) empêchent la production de l'EPO (Faquin et al. 1992) (Vannucchi et al. 1994) (Frede et al. 1997).

I-5 La différenciation mégacaryocytaire:

La mégacaryocytopoïèse est un processus physiologique complexe qui consiste en la différenciation de la cellule souche multipotente vers la lignée mégacaryocytaire, la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires et la différenciation terminale générant les plaquettes ou thrombocytes à partir de cellules géantes, les mégacaryocytes (MK).

Les BFU-MK, générés à partir du PMC, représentent les progéniteurs mégacaryocytaires les plus primitifs et possèdent une aptitude de prolifération très élevée. Les BFU-MK sont caractérisés par les marqueurs CD34 et CD117 (Briddell et al. 1989). Les BFU-MK donnent naissance à des colonies composées de plus de 50 cellules, les CFU-MK (Briddell et al. 1989), qui continuent à exprimer à leurs surfaces le CD34 mais aussi le CD38 et le CD33. Les CFU-MK ont une plus faible capacité de prolifération que les BFU-MK. Les CFU-MK génèrent les promégacaryoblastes caractérisés par le CD33, CD41 et le CD61 puis les mégacaryoblastes. Ces dernières se différencient en promégacaryocytes puis en mégacaryocytes. Les mégacaryoblastes et les mégacaryocytes expriment les CD41, CD61, CD42a et CD42b (Chang et al. 2007) (Patel et al. 2005).

Avant que le MK acquière la capacité de libérer les plaquettes, il doit achever sa maturation. Ainsi, le mégacaryoblaste augmente considérablement son diamètre (100 μ m) et sa masse cytoplasmique et accumule de grandes quantités de ribosomes qui facilitent la production de protéines spécifiques des plaquettes (Long et al. 1982). Cette augmentation du volume de la cellule est assurée par polyploïdisation, conséquence d'une succession d'endomitoses, un processus qui amplifie la quantité de l'ADN avec absence de division cellulaire. Au cours de l'endomitose, la cellule entre en phase S puis fait une mitose incomplète au cours de laquelle la cytokinèse ne se produit pas puis la cellule ré-initie un nouveau cycle cellulaire. Il en résulte la formation de MK polyploïdes dont le noyau multilobé renferme un ADN allant de 4N jusqu'à 128N dans chaque mégacaryocyte (Odell et al. 1970).

La masse cytoplasmique du mégacaryocyte mature forme des projections appelées proplaquettes (Tablin et al. 1990). L'action du flux sanguin permet, ensuite, la fragmentation des proplaquettes et la production des plaquettes (Junt et al. 2007).

La thrombopoietine (TPO) est le régulateur principal de la mégacaryopoïèse (Kaushansky 2005) (Kaushansky et Drachman 2002). La TPO assure la survie et l'expansion des CSH et des progéniteurs MK seule ou en combinaison avec d'autres cytokines y compris le GM-CSF,

l'IL-3, l'IL-6, l'IL-11, le SCF, le FMS-like tyrosine kinase (FLT), le fibroblast growth factor (FGF) et l'EPO (Pick et al. 2002) (Bruno et al. 2003) (Ivanovic 2004) (Sitnicka et al. 1996). Cependant, la TPO n'est pas impliquée directement dans la formation des plaquettes. Son rôle est d'assurer la prolifération, la polyploïdisation et la maturation des MK.

I-6 La différenciation granulo-monocytaire :

La granulopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui aboutissent à la production de granulocytes appelés aussi polynucléaires (PN), ce sont des cellules dont le cytoplasme est riche en granulations, il s'agit des neutrophiles, des éosinophiles et des basophiles. Tous les PN sont issus d'un même progéniteur commun le CFU-GEMM qui se différencie en progéniteurs plus matures, le CFU-Eo à l'origine des polynucléaires eosinophiles, le CFU-Basophile qui génère les polynucléaires basophiles et le CFU-GM (CD34⁺) qui donnent naissance aux CFU-M et CFU-G. Le CFU-G (CD34⁻) est à l'origine des polynucléaires neutrophiles alors que le CFU-M donnera les monocytes. Dans cette analyse de la différenciation les liens entre la lignée basophile et mastocytaire sont mal connus mais il s'agirait de deux différenciations indépendantes.

Même si les précurseurs tardifs sont différents pour chaque type de PN, les stades précoces de la différenciation sont communs à tous les PN. Les promyélocytes sont les premières cellules de la différenciation à posséder des granulations présentes dans les trois types de PN donc non-spécifiques. Les promyélocytes donnent des myélocytes qui possèdent des granulations différentes et dites spécifiques selon le PN. Ce stade est caractérisé par l'arrêt des divisions cellulaires. Les myélocytes donnent ensuite des métamyélocytes, qui vont eux-mêmes être à l'origine des PN matures. Ces derniers restent dans la moelle osseuse pendant 4-6 jours afin de former un stock ou un réservoir à partir duquel ces cellules sont rapidement mobilisées en réponse à une infection ou inflammation pour les PN neutrophiles (Rankin 2010). Les PN-Eos sont essentiellement des cellules résidents dans les tissus.

Les marqueurs précoces de la granulopoïèse sont représentés par l'expression du récepteur au G-CSF et des marqueurs de surface CD33 et CD13.

Le G-CSF est la cytokine régulatrice la plus importante dans le processus de granulopoïèse neutrophile, il induit la différenciation myéloïde, stimule la prolifération des précurseurs

granulocytaires et joue un rôle dans la mobilisation des granuleux matures de la moelle osseuse (Semerad et al. 2002). Les effets biologiques du G-CSF sont transmis via son récepteur le G-CSFR (CD114). Le G-CSF agit en synergie avec de nombreux autres facteurs en particulier aux stades les plus précoces comme le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL6.

Les monocytes sont les cellules sanguines ayant la plus grande taille. Ils dérivent de la lignée CFU-GEMM puis des CFU-GM et enfin des progéniteurs tardifs CFU-M. La première cellule de la lignée morphologiquement identifiable est le promonocyte. Le promonocyte se différencie par la suite en monocyte. Les monocytes sont une population cellulaire très hétérogène avec différents types spécialisés soit dans l'inflammation et la réaction immunitaire soit au contraire dans les remaniements tissulaires et peuvent être distinguées en ces différents sous types par différents marqueurs. Les monocytes sont des cellules de transition qui dans les tissus vont donner des macrophages, des cellules dendritiques et des ostéoclastes.

II- Les hémopathies myéloïdes malignes :

II-1 Classification :

La classification des hémopathies malignes tient compte de la voie de différenciation qui est affectée : lymphoïde ou myéloïde, du caractère chronique ou aigu de la maladie, de certains caractères morphologiques, cytochimiques, histologiques et aussi immunophénotypiques.

Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2008 (Vardiman et al. 2009), il existe cinq catégories d'hémopathies myéloïdes malignes: les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), les syndromes myélodysplasiques (SMD), les formes intermédiaires entre les deux appelées néoplasmes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/NMP), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les néoplasmes myéloïdes et lymphoïdes associés avec une éosinophilie et des anomalies du PDGFRA, PDGFRB et FGFR1 (**Figure 3**).



Figure 3: Classification des hémopathies myéloïdes malignes selon l'OMS 2008. Les néoplasmes myéloïdes sont classés en cinq catégories: les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), les syndromes myélodysplasiques (SMD), les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), les formes intermédiaires entre les deux appelées néoplasmes myélodysplasiques /myéloprolifératifs (SMD/NMP), et les néoplasmes myéloïdes et lymphoïdes associés avec une éosinophilie et des anomalies du PDGFRA, PDGFRB et FGR1 (NML-Eo). Les NMP sont à leurs tours subdivisés en NMP rares, NMP non classés, NMP positifs pour le chromosome Phyladelphie (NMP-Ph+) appelés aussi leucémies myéloïdes chroniques (LMC) et NMP classiques ou (NMP-Ph-) qui englobent la thrombocytémie essentielle (TE), la polyglobulie de Vaquez (PV) et la myélofibrose primaire (MFP).

Le caractère principal des hémopathies myéloïdes malignes est la myélopoïèse clonale dues à des dérégulations au niveau du compartiment des CSH, à l'exception des LAM qui peuvent provenir de l'amplification de progéniteurs plus ou moins engagés. Ils sont la résultante d'anomalies de prolifération et/ou de différenciation.

II-2- La leucémie aiguë myéloïde (LAM) :

La LAM est une maladie génétiquement hétérogène, due à l'accumulation d'altérations génétiques dans la CSH et/ou dans les cellules progénitrices. Elle est caractérisée par l'arrêt de la différenciation myéloïde avec une prolifération clonale des cellules myéloïdes immatures dans la moelle osseuse et qui infiltrent d'autres organes comme le foie et la rate. Selon l'OMS, les LAM se définissent par la présence de 20% de blastes (cellules immatures) dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique. La LAM est considérée comme la leucémie aiguë la plus répandue chez les adultes. L'âge moyen de développement de la maladie est de 72 ans avec une incidence de 15 à 25 cas sur 100 000 à partir de cet âge. Il existe les LAM de novo et les LAM secondaires survenant suite à un traitement ou à la progression de NMP ou de SMD (Marcucci et al. 2011). Les altérations génétiques qui caractérisent la LAM peuvent être des aberrations chromosomiques (translocations, inversions

et délétions) ou bien des mutations somatiques plus subtiles. Les études les plus récentes ont montré que plus que 70% de cas de LAM présentent des mutations des gènes de méthylation de l'ADN ou de modification des histones ce qui montre que les modifications épigénétiques jouent un rôle important dans le développement de la maladie (Deneberg et al. 2011). Il a été montré que les mutations de DNMT3A, par exemple, apparaissent tôt au cours de l'évolution de la maladie et entrainent l'expansion clonale de sous-populations de cellules préleucémiques (Shlush et al. 2014). TET2 est muté dans 7-23% des cas de LAM. Les mutations de TET2 ont été toujours associées à un mauvais pronostic dans les LAM sans anomalies cytogénétiques (Patel et al. 2012). Les LAM peuvent être dues à des translocations comme la t(15;17) ou la translocation t(8;21) ou à des délétions comme la monosomie 7. Ces translocations impliquent des facteurs de transcription ou des composants du complexe transcriptionnel ce qui montre que l'initiation et la progression de la maladie est en partie due à l'altération de l'activité des facteurs de transcription (Mehdipour et al. 2015). Une étude a identifié 9 catégories de gènes impliqués dans la pathogénèse de la LAM y compris les facteurs de transcription dans 18% des cas, NPM1 (nucléophosmine) dans 27% des cas, les gènes suppresseurs de tumeurs dans 16% des cas, les gènes liés à la méthylation de l'ADN dans 44% des cas, les gènes de signalisation dans 59% des cas, les gènes modificateurs de la chromatine dans 30% des cas, les facteurs de transcription myéloïdes dans 22% des cas, les gènes du complexe des cohésines dans 13%, et les gènes de l'épissage dans 14% des cas. Presque tous les patients atteints de LAM présentent au moins une de ces mutations (Ley et al. 2010)

II-3 Les syndromes myélodysplasiques

Les SMD sont un groupe d'hémopathies malignes hétérogènes dues à des anomalies acquises au niveau de la CSH conduisant à la prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale (= dysmyélopoïèse). L'apoptose excessive des précurseurs aboutit à un défaut de production et à des cytopénies périphériques, donc une hématopoïèse inefficace. Les SMD surviennent généralement chez le sujet âgé au delà de 70 ans avec une incidence qui dépasse les 20%. Ceci montre que l'origine de ces maladies pourrait être liée à la sénescence et au vieillissement (Blau et al. 2011) (Konopleva et al. 2009). Dans 45% des cas, le taux de survie est de 3 ans, mais le pronostic est très variable suivant le type de SMD. Hormis l'âge, les facteurs de risques de survenu des SMD incluent la chimiothérapie, la radiothérapie et moins fréquemment le tabac et l'exposition aux solvants et à certains agents chimiques (Nisse et al. 1995).

L'événement déclencheur, à l'origine de l'avantage prolifératif et de l'expansion clonale n'est pas connu. Presque la moitié des patients atteints de SMD présente des aberrations chromosomiques affectant les chromosomes 5, 7, 8 et 20. Les microARN (miR), des régulateurs de la chromatine et des facteurs d'épissage sont aussi impliqués dans l'étiologie des SMD. Des études récentes ont montré qu'il y a 40 gènes différents mutés dans les SMD (Papaemmanuil et al. 2013) (Haferlach et al. 2014). Presque 90% des patients atteints de SMD présente au moins une mutation avec une moyenne de 2-3 mutations par patient. On distingue : les mutations des gènes d'épissage (*SF3B1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF1*, *U2AF2*, *ZRSR2*), les gènes de la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3*, *IDH1*, *IDH2*), les gènes impliqués dans la modification de la chromatine (*ASXL1*, *EZH2*), les voies de signalisation avec une prévalence des mutations de RAS (*NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *JAK2*), les facteurs de transcription (*TP53*, *RUNX1*, *EV1*, *GATA2*) et les gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN. Les mutations affectant l'épissage et les anomalies épigénétiques sont les altérations les plus observées dans les SMD ce qui montre l'importance de ces deux voies dans la pathogénèse des SMD.

Les SMD constituent un état pré-leucémique car ils présentent un grand risque d'évolution vers les LAM qui surviennent chez un tiers des patients (Ades et al. 2014) (Mufti 2004). Cette évolution est due à la perte de l'apoptose excessive observées au début de la maladie (Raza et Galili 2012). Le traitement des SMD varie du traitement symptomatique de la cytopénie par la transfusion sanguine à la transplantation allogénique de cellules souches (alloTCS). L'alloTCS reste le seul traitement curatif chez ces patients (Vaughn et al. 2013).

II-4 Les néoplasmes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs :

C'est un ensemble hétérogène d'hémopathies malignes clonales qui présentent à la fois les caractéristiques des NMP et ceux des SMD. Ils incluent la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) qui est la maladie la plus fréquente dans ce groupe, la JMMC une LMMC juvénile, la leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa) et les NMP/SMD inclassables. Les mutations des gènes *TET2*, *ASXL1* et *SRSF2* sont très récurrentes dans la LMMC, chacun

de ces gènes a été identifié muté dans plus que 45% des patients (Smith et al. 2010) (Meggendorfer et al. 2012).

II-5 Les néoplasmes myéloprolifératifs :

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) ont été décrits pour la première fois en 1951 par William Dameshek (Dameshek 1951). Ce sont des maladies malignes clonales, caractérisées par la prolifération excessive des CSH dans la moelle osseuse sans trouble de la maturation ni de la différenciation. Il en résulte une production augmentée de cellules sanguines matures dans le sang périphérique. Selon la classification de OMS 2008 (Vardiman et al. 2009), les néoplasmes myéloprolifératifs chroniques regroupent plusieurs hémopathies : principalement, la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primaire (MFP) et la leucémie myéloïde chronique (LMC), mais également la mastocytose systémique, la leucémie chronique à éosinophiles, la leucémie à polynucléaires et les néoplasmes myéloprolifératifs non classés. (**Figure 3**)

II-5-1 La leucémie myéloïde chronique (LMC) :

La LMC est caractérisée la plupart du temps par la présence du chromosome Philadelphie, produit de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 [t (9; 22) (q34; q11)]. Cette fusion des gènes, *Breakpoint cluster region (BCR)* et *Abelson (ABL)* aboutit à la synthèse d'un gène chimère codant pour une protéine de fusion à activité tyrosine kinase constitutive localisée dans le cytoplasme (BCR-ABL). La LMC est une entité clinique homogène dont le pronostic a été révolutionné grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase. Cette maladie toujours létale en 3 ans du fait d'une transformation en LAM voir LAL (leucémie aiguë lymphoïde) secondaires est devenue une maladie chronique avec une survie proche ou identique à des sujets de même âge. Il s'agit d'une des rares maladies malignes monogéniques.

Les autres NMP (PV, TE et MFP) représentent un ensemble hétérogène de syndromes, regroupés sous le terme de néoplasmes myéloprolifératifs Philadelphie négatif (NMP-Ph-) ou NMP BCR-ABL négatifs dits aussi NMP « classiques ».

II-5-2 Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques :

Ces maladies sont caractérisées par une hypersensibilité ou par une indépendance aux cytokines, qui est la caractéristique biologique de ces pathologies. Dans la PV, le lignage affecté est celui de la production des globules rouges. L'atteinte de la lignée mégacaryocytaire entraine un excès de plaquettes sanguines qui caractérise la TE, alors que la MFP est caractérisée par des défauts de différenciation des lignées MK et érythroblastiques et un excès de précurseurs granulocytaires associés à une fibrose médullaire qui définit la maladie.

Les aspects moléculaires des NMP classiques étaient méconnus jusqu'à l'identification de la mutation *JAK2V617F* en 2005. Il s'agit de la mutation somatique la plus récurrente dans les NMP. Cette mutation induit la substitution de la valine en position 617 par la phénylalanine (James et al. 2005), (Kralovics et al. 2005), (Levine et al. 2005), (Baxter et al. 2005). *JAK2*-V617F touche environ 95% des PV et entre 50% et 60% des TE et des MFP. Ainsi *JAK2V617F* n'est pas spécifique d'un NMP particulier et son absence ne peut exclure aucun de ces néoplasmes.

Dans les TE, la mutation *JAK2V617F* est le plus souvent hétérozygote. Cependant, dans la majorité des cas de PV et de PMF, la mutation est observée sous forme homozygote ; ceci résulte le plus souvent d'une recombinaison mitotique aboutissant à la perte de l'allèle sauvage et à la duplication de l'allèle mutée (Jones et al. 2005). Ces observations suggèrent un lien entre la charge allélique de *JAK2V617F* et le phénotype clinique de la maladie.

Les NMP classiques sont des maladies hétérogènes avec des tableaux cliniques différents mais qui peuvent progresser entre elles de la TE à la myélofibrose (MF) en passant parfois par la PV. Elles peuvent aussi évoluer en leucémies secondaires (Tefferi 2013).

L'âge moyen de diagnostic des NMP est compris entre 65-74 ans pour la PV, 64-73 ans pour la TE et 69-76 ans pour la MFP (Moulard et al. 2014)

II-5-2- a Mutation JAK2-V617F :

JAK2 est une protéine à activité tyrosine kinase qui se lie à des récepteurs de cytokine plus particulièrement des récepteurs homodimériques comme ceux de l'érythropoïétine (EPO-R), de la thrombopoïétine (MPL) et du G-CSF (GSF-R). La fixation du ligand à son récepteur provoque un changement conformationnel permettant l'activation de la kinase JAK2 par autophophorylation, puis la transphosphorylation des récepteurs servant alors de sites d'échaffaudage permettant l'induction des voies de signalisation intracellulaires en aval,
comme la voie PI3K/AKT ou la voie des MAPK et ERK kinases. L'activation des récepteurs induit surtout la phosphorylation et la translocation nucléaire des facteurs de transcription STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) et par conséquent l'activation de la transcription des cibles surtout impliquées dans la prolifération et les processus anti-apoptotiques.

L'absence de la protéine JAK2 chez les souris *Jak2* knockout induit la mort embryonnaire à cause de l'altération de l'érythropoïèse définitive (Neubauer et al. 1998). D'autre part la délétion conditionnelle inductible de *Jak2* chez des souris adultes entraîne une anémie sévère et une thrombocytopénie induisant la mort de l'animal (Park et al. 2013) (Grisouard et al. 2014) (Akada et al. 2014). Dans les lignées cellulaires, l'expression ectopique de *JAK2*V617F induit une indépendance aux facteurs de croissance (James et al. 2005). De plus, tous les modèles murins rétroviraux, knock-in ou transgéniques de *Jak2*V617F, dans les cellules hématopoïétiques de souris induisent un phénotype allant de la TE à la PV et évoluant selon les modèles en MF. (Lacout et al. 2006) (Hasan et al. 2013) (Marty et al. 2010) (Tiedt et al. 2008) (Wernig et al. 2006). Ainsi, *JAK2*V617F est une mutation responsable du phénotype et de la progression de la maladie en MF.

Hormis *JAK2*V617F, d'autres mutations somatiques (délétions/ duplications/ substitutions) du gène *JAK2* ont aussi été détectées dans les NMP. Ces mutations touchent l'exon 12 du gène *JAK2* et surviennent exclusivement dans 2-4% des cas de PV (Scott et al. 2007).

Récemment des mutations germinales de *JAK2* ont été décrites dans des syndromes familiaux, dont la plupart sont associées à des thrombocytoses héréditaires (Mead et al. 2012) (Etheridge et al. 2014) (Marty et al. 2014). Chez ces patients l'hématopoïèse reste polyclonale.

II-5-2- b Les autres gènes mutés dans les NMP :

Pour mieux comprendre les mécanismes génétiques et moléculaires à l'origine de ces pathologies, de nombreuses études génétiques ont été menées qui ont permis d'identifier d'autres mutations somatiques touchant des gènes codant pour des protéines impliqués dans la voie récepteur de cytokine/JAK2 comme le gène « Myeloproliferative leukemia protein» (MPL), le gène *SH2B3* codant pour le « lymphocyte specific adaptor protein » (LNK) qui est un facteur de régulation négative de la voie d'activation JAK-STAT, le gène Casitas B-

lineage lymphoma (*CBL*) et plus récemment le gène de la calréticuline (*CALR*). Toutes ces mutations induisent une activation de la voie de signalisation JAK/STAT.

Les mutations du gène *MPL* sont spécifiques de la TE et de la MFP et surviennent chez 3% et 5-10% des cas, respectivement. Plusieurs mutations du gène *MPL* ont été décrites particulièrement dans l'exon 10 mais également dans d'autres exons. Elles touchent principalement le résidu tryptophane en position 515 qui peut être remplacé par n'importe quel autre résidu (W515L, W515K, W515A, W515A) mais aussi le résidu sérine en position 505 (S505N) qui peut être aussi impliqué dans des thrombocytoses héréditaires et enfin le résidu S204 et Y591. Les mutations les plus fréquentes de ce gène sont les substitutions W515L et W515K. Toutes ces mutations induisent l'activation constitutive du récepteur en modifiant la conformation du récepteur (Pardanani et al. 2006).

Récemment, des études ont identifiées des mutations dans le gène de la calréticuline (*CALR*) 25-35% des patients atteints de TE et de MFP, et de rares cas de PV. Les mutations de *CALR* sont observées théoriquement exclusivement des mutations de *JAK2* et de *MPL*. Toutes les mutations *CALR* décrites sont situées dans l'exon 9 entrainent un décalage du cadre de la lecture (+1) entrainant la génération d'une nouvelle séquence en C-terminal identique quelque soient les mutants et la perte du motif de rétention au réticulum endoplasmique, le motif KDEL (Klampfl et al. 2013) (Nangalia et al. 2013) (Chi et al. 2014) (Lundberg et al. 2014) (Maffioli et al. 2014) (Rumi et al. 2014). Comme les mutations de *JAK2* et *MPL*, les mutations de *CALR* activeraient également la voie JAK/STAT (Klampfl et al. 2013) (Lau et al. 2015) (Rampal et al. 2014).

Les mutations de signalisation des gènes *JAK2*, *MPL* et *CALR* sont les plus récurrentes chez les patients atteints de NMP. Ces mutations sont dites des mutations « driver » ou motrices, car elles sont capables d'induire le phénotype de la maladie. Tout ceci fait de la voie JAK2/STAT une voie initiatrice centrale dans les NMP classiques. Dans les NMP, ces mutations sont jusqu'à présent mutuellement exclusive mais de rares cas d'association ont été décrits y compris avec *BCR-ABL* (Lundberg et al. 2014) (Lin et al. 2015) Nous avons d'ailleurs identifié un patient présentant une myélofibrose positive pour *JAK2V*617F qui a développé en plus une LMC positive pour *BCR-ABL*. Dans ce travail, nous avons montré que l'anomalie *BCR-ABL* est survenue dans un clone JAK2V617F pré-existant et nous avons mis en évidence des pertes d'hétérozygotie de JAK2V617F successives dans des clones

indépendants. Malgré la rémission complète de ce patient pour la LMC après traitement, nous avons trouvé une persistance du clone *JAK2V617F/BCR-ABL* dans les CSHs (Yamada et al. 2014). Ceci montre qu'il existe une instabilité génétique dans ces maladies et que des gènes de prédispositions favorisant celle-ci pourraient être identifiés.

Les patients atteints de MFP et qui ne présentent aucune de ces trois types de mutations sont appelés les patients triple-négatifs et représentent 10% des patients MFP. Dans cette catégorie, les mutations « driver» ne sont pas encore identifiées.

Le concept de mutations « driver non phénotypiques » a été aussi décrit. Ces mutations touchent un ensemble de gènes qui peut être subdivisé en deux groupes : les gènes initiateurs à la maladie comme *TET2* et *DNMT3A* et les gènes impliqués dans la progression de la maladie comme *CBL*, *AXSL1*, *EZH2*, *IDH1* et *IDH2*. Ces mutations touchent des cellules déjà mutées pour l'un des gènes « driver », souvent *JAK2*-V617F et jouent un rôle important dans la progression des NMP (Skoda et al. 2015). Par ailleurs, les mutations des facteurs d'épissage induisent des phénotypes dysplasiques.

Actuellement, il semble que 50% des NMP BCR-ABL négatifs sont comme la LMC des maladies monogéniques.

II-5-2- c Mutations impliquées dans les leucémies secondaires :

Les mutations d'*IDH1/2* ou d'*ASXL1* voir d'*EZH2* sont associées au risque de transformation en LAM secondaire, cependant d'autres mutations, également non spécifiques des NMP, peuvent être acquises lors de la progression de la maladie.

Des mutations, le plus souvent bi-alléliques et associées à une disomie uniparentale en 17p, du gène suppresseur de tumeur *TP53* sont retrouvées dans 27.3% des LAM post-NMP contre 4.3% des LAM *de novo* et 1.6% des NMP en phase chronique, où elles sont de plus généralement mono-alléliques (Milosevic et al. 2012) (Harutyunyan et al. 2011). De plus, des amplifications de *MDM4* sont retrouvées ce qui amène à 40% des cas les anomalies sur la voie p53. Des mutations d'*IKZF1* ou des délétions 7p sont observées dans 19% des LAM post-NMP (Jager et al. 2010). *In vitro*, le knock-down d'*IKAROS* induit une hypersensibilité aux cytokines et la surexpression d'un dominant négatif active la voie de signalisation JAK-STAT (Jager et al. 2010) (Kano et al. 2008). Les anomalies d'*IKZF1* sont retrouvées à la même fréquence dans les LAM post-NMP et les LAM *de novo*. La délétion 7q a été reliée à la

perte du facteur de transcription *CUX1*, régulateur du cycle cellulaire (Truscott et al. 2008) et apparaît, comme les mutations de *TP53*, relativement spécifiques des LAM secondaires. Des mutations de *RUNX1* et des délétions d'*ETV6* (del12p) ont également été décrites dans les LAM post-NMP (Milosevic et al. 2012). Seules les mutations de *TP53* ont un impact pronostique péjoratif pour la survie des patients atteins de LAM secondaires (Milosevic et al. 2012).

III- TET2 et instabilité génétique

III-1 L'épigénétique :

Les changements de phénotype cellulaire qui ne dérivent pas de l'altération de la séquence de l'ADN sont attribués aux mécanismes épigénétiques qui incluent les modifications covalentes de la cytosine, les modifications covalentes des histones et les séquences d'ARN non codantes comme les miRNA. Les modifications épigénétiques sont essentielles dans de nombreux processus cellulaires comme le développement embryonnaire et la différenciation, la réplication de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, l'assemblage et la ségrégation des chromosomes et les réponses au microenvironnement cellulaire.

L'organisation de la chromatine fluctue entre une configuration ouverte, dite euchromatine, accessible aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle et une configuration fermée, dite hétérochromatine, où la transcription est réprimée. Cette accessibilité de la chromatine à la transcription est dépendante de plusieurs enzymes régulant le degré de méthylation de l'ADN, induisant des modifications post-traductionnelles des histones ou encore modifiant leurs interactions avec la fibre chromatinienne. La capacité de certaines protéines comme les facteurs de transcription de se lier à l'ADN est dépendante de la structure de la chromatine et elle est majoritairement influencée par le type et le degré des modifications des cytosines et des histones au niveau d'un locus particulier.

La modification des histones la plus étudiée est la méthylation des histones qui est assurée par plus de 80 méthyltransférases et deméthylases différentes. Les histones méthyltransférases méthylent le résidu lysine ou arginine, généralement, des histones H3 et H4 (Plass et al. 2013) (Helin and Dhanak 2013). Ces marques peuvent être soit activatrices soit répressives et sont à l'origine de l'activation des oncogènes ou de la répression des gènes suppresseurs de tumeurs.

Par exemple, la LAM avec réarrangement *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) est considérée comme le prototype de cancer dérivé par des dérégulations épigénétiques. MLL est une lysine méthyltransférase qui méthyle la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4). Les réarrangements MLL sont détectés dans 5-10% des cas de LAM et ils impliquent la translocation de l'extrémité terminale 5' du gène *MLL* (11q23) avec plus que 70 partenaires de fusion identifiés. Le partenaire de fusion le plus commun dans la LAM est *AF9*. Le mécanisme par le quel la translocation *MLL-AF9* aboutit à la leucémogenèse n'est pas bien élucidé. Cependant, il a été

montré que les protéines de fusion associées à MLL induisent une élévation de l'expression d'environ 100 gènes probablement due à l'induction des marques H3K4me3 et H3K7me2. Les gènes les plus caractérisés par cette régulation positive sont la famille des gènes *HOXA*, en effet la surexpression du gène *HOXA9* est associée à la leucémogenèse.

III-1-1 Méthylation de l'ADN

La méthylation du résidu cytosine sur son carbone en position 5 (5-mC) est une marque épigénétique répressive de la transcription que l'on retrouve dans un contexte cytosine guanine dinucléotide (CpG). Dans le génome humain, 70-90% des CpG sont normalement méthylés (Ehrlich et al. 1982). Au niveau de certaines régions nommées ilots CpG, les dinucléoides CpG sont concentrés avec une densité élevée avec un ratio de 60% de CG sur un minimum de 200 paires de bases (pb). Les ilots CpG sont souvent localisés tout au long ou juste à proximité de 60% des promoteurs des gènes dans le génome humain. Les ilots CpG non méthylés favorisent la structure de l'euchromatine et se trouvent au niveau des promoteurs des gènes activement transcrits, souvent ayant la fonction de gène de ménage. Par contre, les ilots CpG méthylés sont associées avec la structure d'hétérochromatine et par conséquent à la répression de la transcription. Ils sont localisés au niveau des loci suppresseurs de tumeurs dans les cellules cancéreuses (Estecio and Issa 2011). Le rôle de la méthylation en dehors des dinucléotides CpG n'est pas connu (Laurent et al. 2010) hormis dans les cellules souches embryonnaires humaines et murines où la méthylation de la cytosine a été décrite dans un contexte CHG ou CHH (ou H peut être une adénine, une cytosine ou une thymine) (Ramsahoye et al. 2000) (Lister et al. 2009), indiquant une probable caractéristique des cellules souches embryonnaires indifférenciées.

La méthylation de l'ADN est assurée par des enzymes spécifiques, les DNA methyltransférases (DNMTs) à partir d'un donneur de méthyl, la S-adénosyl-méthionine (SAM). Chez les mammifères, il existe 3 DNMTs, DNMT1, DNMT3A et DNMT3B, qui catalysent le transfert du groupement méthyl (CH3) sur la cytosine. Durant l'action de méthylation, une cystéine dérivée de la DNMT se comporte comme un nucléophile et forme une liaison covalente avec le carbone C6 de la cytosine. En même temps, un résidu glutamate stabilise la charge négative de la cytosine qui récupère le groupement méthyl de la S-adenosyl-L-méthionine (SAM) et le convertit en S-adenosyl-L-homocystéine. L'étape finale consiste en l'élimination de la liaison C(5)-C(6) qui libère la DNMT et établit un groupement méthyl sur le carbone (5) de la cytosine.

Les modifications covalentes de la cytosine génèrent une série de dérivés oxydés de la cytosine incluant la 5-méthylcytosine (5-mC), la 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC), 5-formylcytosine (5-fC) et 5-carboxylcytosine (5-caC).

L'hypothèse que l'altération de la méthylation de l'ADN peut être impliquée dans la leucémogenèse a été renforcée par la découverte des mutations récurrentes de *DNMT3A* (Ley et al. 2010). Les mutations de *DNMT3A* ont été détectées dans de nombreuses hémopathies myéloïdes malignes comme la LAM (Ley et al. 2010) (Yan et al. 2011) (Patel et al. 2012) (Thol et al. 2011), les SMD (Walter et al. 2011) (Bejar et al. 2012), la LMMC (Jankowska et al. 2011) la mastocytose systémique (Traina et al. 2012), et rarement dans les NMP (Stegelmann et al. 2011) (Brecqueville et al. 2012). On pense que l'altération de la méthylation contribue à l'oncogenèse en altérant la transcription des gènes clé dans le cancer (oncogènes et suppresseurs de tumeurs). Le profil de méthylation de patients atteints de LAM et de SMD définit différents groupes en fonction du schéma global du statut de méthylation des CpG qui corrèle avec des aspects génétiques et cliniques spécifiques (Figueroa et al. 2009) (Shen et al. 2010). Cependant, l'altération de la méthylation a été aussi dissociée des mutations de *DNMT3A*, laissant ainsi penser qu'il pourrait y avoir des mécanismes alternatifs.

III-1-2 Déméthylation de l'ADN

Durant longtemps, il a été admis que la méthylation de l'ADN était un processus irréversible, il est maintenant évident que la déméthylation de l'ADN est incontournable et importante pour un ensemble de processus cellulaire durant l'embryogenèse, la différenciation des cellules souches embryonnaires et les processus de cancérogenèse.

La déméthylation de la cytosine consiste en l'élimination du groupement répressif méthyl au niveau de l'ADN. Initialement, on pensait que la déméthylation de la cytosine était un processus exclusivement passif qui se produisait par les cycles de réplication de l'ADN. Un processus actif avait été suggéré sans qu'aucun mécanisme n'ait été mis en évidence. Cependant la perte rapide de la méthylation de l'ADN qui se produit en un seul cycle cellulaire lors du développement embryonnaire indique la présence d'activités enzymatiques qui éliminent et/ou modifient des résidus 5-mC dans l'ADN. Des études récentes ont mis en lumière des mécanismes sous-jacents à la déméthylation active des 5-mC. Notamment, la découverte de la famille des protéines TET a montré que la déméthylation peut se produire via un mécanisme actif (Tahiliani et al. 2009). De plus, certaines études on montré que les 5-

mC peuvent se désaminer spontanément pour générer un produit mutagène la thymine, convertissant les CpG en TpG (Zhao and Jiang 2007).

III-2 La famille TET :

La famille des protéines TET comprend trois membres TET1, TET2 et TET3. *TET1*, situé en 10q21, était le premier membre de la famille identifié, comme un partenaire de fusion du gène *MLL*, dans la translocation chromosomique t(10 ;11) (q22 ;q23) détectée dans de rares cas de LAM (Ono et al. 2002) (Lorsbach et al. 2003). Des recherches similaires ont permis par la suite d'identifier *TET2* et *TET3* en 4q24 et 2p13, respectivement.

Le gène *TET2* comprend 11 exons et s'étend sur plus de 150 Kb (96 Kb), codant pour un ARNm de 9.7Kb et une protéine TET2 codée par les exons 3 à 11 et qui comporte 2002 acides aminés (15, 16). L'ARNm de *TET2* code par épissage alternatif pour 3 isoformes 1, 2 et 3 de 2002, 1164 et 1194 acides aminés respectivement. Les 3 isoformes sont ubiquitaires mais s'expriment différemment d'un tissu à l'autre y compris dans les cellules hématopoïétiques (Langemeijer et al. 2009).

III-2-1 Expression et localisation cellulaires des TETs

Les gènes de la famille *TET* 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 CSH et leur expression diminue au cours de l'engagement dans la différenciation (Lorsbach et al. 2003). L'expression de *TET2* augmente au cours de la granulopoïèse (de façon similaire à *TET3*) et de la lymphopoïèse B (Langemeijer et al. 2009).

Les protéines TET1 et TET2 sont généralement localisées dans le noyau alors que TET3 est nucléo-cytoplasmique. Une étude a montré que la surexpression de la protéine AID induit un changement de localisation des protéines TET vers le cytoplasme et une relocalisation de AID dans le noyau suggérant que l'activation d'AID régule leur localisation subcellulaire (Arioka et al. 2012).

III-2-2 Structure des protéines TET

Les analyses de structure ont montré des similitudes entre les trois protéines. La région carboxy- (C) terminale des trois membres comprend un domaine catalytique dioxygénase en double hélice β . L'activité de ce domaine est d'oxyder les 5-mC. Ce domaine contient des sites de liaison pour l' α -Kétoglutarate (α -KG) et le Fe(II) qui sont nécessaire pour sa fonction catalytique. On distingue pour les trois protéines: 3 sites de liaison au Fe(II) (TET1 : aa 1672, 1674, 2028 ; TET2 : aa1382, 1384, 1884 ; TET3 : aa 942, 944, 1538) et un site de liaison au 2-oxoglutarate (TET1 : aa 2043, TET2 : aa 1896, TET3 : aa 1553). Au centre et juste avant le domaine catalytique en double hélice, les protéines TET partagent aussi une région riche en cystéine, ce domaine est nécessaire pour assurer la liaison à l'ADN. La région (N) terminale des protéines TET1 et TET3 comprend un domaine CXXC qui joue un rôle dans la liaison des résidus cytosine non méthylés (Xu et al. 2012). TET2 ne présente pas ce domaine. Le domaine CXXC de TET2 s'en est séparé au cours de l'évolution et est devenu une protéine à part codée par le gène *IDAX*, localisé à l'extrémité 5' de *TET2* (Ko et al. 2013). (**Figure 1**. **Article1**). IDAX régule négativement l'activité de TET2 en facilitant sa dégradation (Ko et al. 2013).

Les protéines à domaine CXXC sont impliquées dans la répression transcriptionnelle (comme CXXC1/Cfp1 et CXXC3/Mbd1) (Jorgensen 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).

III-2-3 Fonction enzymatique des TETs

Les trois membres sont des enzymes dioxygénases dépendantes du Fe(II) et de l' α -KG, qui hydroxylent les résidus cytosines pour générer les 5-hmC qui constituent des composants intermédiaires clé dans le processus de déméthylation. Les 5-hmC sont à leur tour oxydées par les TET pour produire les 5-fC puis les 5-caC. Ces derniers sont reconnus et réparés par la thymidine DNA glycosylase (TDG) via la voie de réparation par excision de base (He et al. 2011). Dans le génome, les 5-fC et 5-caC sont beaucoup moins abondantes que les 5-hmC

(Ito et al. 2011). Ceci est du au fait qu'ils sont générés moins activement et qu'ils sont pris en charge par des enzymes spécifiques, éventuellement des décarboxylases et des déformylases (Wu and Zhang 2014). Des études récentes ont montré que les protéines TET sont également capables d'hydroxyler la thymine en 5-hmU (Pfaffeneder et al. 2014). (**Figure 2. Article1**)

De nombreuses études suggèrent que les 5-hmC ne sont pas simplement des produits intermédiaires dans le processus de déméthylation, mais peuvent aussi réguler l'expression génique dans la cellule (Wu et al. 2011) (Shen et al. 2013).

Les protéines TET jouent ainsi un rôle dans la régulation épigénétique de la transcription, mais il parait évident que les 5-hmC puissent aussi avoir une fonction épigénétique propre (Valinluck et 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).

Les protéines TET sont devenues des enzymes clé dans la déméthylation de l'ADN et la découverte de mutations récurrentes de *TET2* dans les hémopathies malignes suggère que la régulation de la méthylation de la cytosine est critique dans la transformation des cellules hématopoïétiques et dans l'hématopoïèse normale.

III-3 Les fonctions biologiques de TET2 sont décrites en détails dans l'article1.

III-4 Les mutations de TET2 dans les hémopathies myéloïdes malignes

Les mutations récurrentes de *TET2* ont d'abord été décrites par notre laboratoire conjointement avec l'équipe d'Olivier Bernard dans des cas de SMD et de NMP (Delhommeau et al. 2009). Ces mutations ont été identifiées à partir d'une combinaison d'outils moléculaires incluant la cytogénétique, l'hybridation génomique comparative et des SNP arrays qui ont permis de mettre en évidence des pertes d'hétérozygotie ou des délétions dans la région du chromosome 4q24.

Les mutations de *TET2* sont parmi les évènements les plus fréquents dans les hémopathies myéloïdes même si elles ont aussi été identifiées dans les pathologies lymphoïdes (Quivoron et al. 2011). Elles sont présentes dans plus de 50% des patients atteints de LMMC, dans environ 26% des patients atteints de SMD, dans environ 10-20% des cas de NMP, dans les mastocytoses (35%) et dans 7-23% des cas de LAM. Dans les NMP, les mutations de *TET2*

ont été observées dans 16% des PV, 5% des TE, 17% des MFP, 14% des PV ayant évolué vers la MFP, 14% des TE ayant évolué vers une MFP, et dans 17% des NMP en phase blastique (Delhommeau et al. 2009), (Tefferi et al. 2009) (Langemeijer et al. 2009) (**Figure 4**).



Figure 4 : Fréquence des mutations de *TET2* **dans les hémopathies myéloïdes.** *TET2* est muté dans diverses hémopathies myéloïdes avec différentes fréquences mais aussi chez certains sujets âgés sains.

Ces mutations touchent surtout les parties codantes (exons 3-11) mais aussi des mutations au niveau des sites d'épissage de *TET2*. Différents types de mutations on été observés : fauxsens, non-sens, insertions/délétions avec décalage du cadre de la lecture. Les mutations fauxsens sont relativement plus présentes dans le domaine catalytique (Huang et al. 2014). La présence de mutations induisant le décalage du cadre la lecture et/ou l'apparition d'un codon stop suggère que les anomalies de *TET2* entrainent l'inactivation du gène. La présence d'une seule mutation chez la moitié des patients indique un effet haplo-insuffisant (Langemeijer et al. 2009), (Delhommeau et al. 2009), (Viguie et al. 2005). Cependant, l'observation des mutations bi-alléliques de *TET2* chez 50% des cas mutés (Delhommeau et al. 2009) suggère que la perte totale de TET2 est surement importante pour la progression des pathologies notamment des NMP.

Ainsi, il est évident que toutes les mutations décrites altèrent la fonction normale de TET2 (Delhommeau et al. 2009) (Abdel-Wahab et al. 2009) (Tefferi et al. 2009) (Kosmider et al. 2009). L'étude du statut mutationnel des cellules de patients présentant des SMD, NMP, CMML, et LAM et la quantification du taux global des 5-hmC par dot blot ou par spectrométrie de masse ont montré que les mutations *TET2* corrèlent avec une réduction

significative du taux des 5-hmC génomique (Ko et al. 2010) (Pronier et al. 2011) (Figueroa et al. 2010). Aucune évidence de la présence de dominants négatifs n'a été encore reportée.

Au niveau de l'hématopoïèse, les mutations de TET2 ont été identifiées dans les NMP, les LMMC et les SMD dans les populations de progéniteurs immatures CD90⁺CD34⁺ chez les patients montrant que ces mutations sont acquises très tôt au niveau de l'hématopoïèse, très probablement au niveau des CSHs (Smith et al. 2010).

De nombreuses études suggèrent que les mutations *TET2* sont des évènements précoces et initiateurs de la maladie dans certains cas comme les SMD et les NMP. Dans les NMP, elles pourraient être acquises avant JAK2V617F, par exemple, probablement pour induire une dominance clonale qui pourrait permettre d'amplifier le clone JAK2V617F. Elles pourraient aussi être acquises secondairement à JAK2V617F au cours de la progression vers la myélofibrose ou vers la transformation leucémique. En effet, elles on été aussi détectées chez des patients atteints de LAM secondaire à des NMP transformés. Enfin, l'ordre d'apparition des mutations pourrait également avoir un impact sur le phénotype de la maladie. En effet, une étude récente a montré que l'acquisition d'une mutation de *TET2* avant *JAK2*V617F résultait en un phénotype de TE alors que lorsque quand *JAK2*V617F précédait celle de *TET2*, les patients développaient plus fréquemment une PV (Ortmann et al. 2015).

Les mutations de *TET2* peuvent co-exister dans certaines maladies avec d'autres mutations comme des mutations de signalisation ou d'autres mutations d'épigénétique ou liés à l'épissage des ARN (*NRAS*, *KRAS*, *KIT*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2*, *JAK2* et *SRSF2* (Shih et al. 2012) (Tefferi 2011). Il a été récemment reporté que l'altération de *Tet2* coopère avec la perte concomitante d'autres suppresseurs de tumeurs comme *Asxl1* (Abdel-Wahab et al. 2013), *Ezh2* (Muto et al. 2013) et *Ncstn* (Lobry et al. 2013) ou avec la mutation *KIT*D816V (De Vita et al. 2014) pour accélérer le phénotype de la maladie dans des modèles de souris.

Les mutations de *TET2* sont associées à un mauvais prognostic chez les patients atteints de LAM sans anomalie cytogénétique (Patel et al. 2012). Pour les SMD, il semble qu'elles soient plutôt de bon pronostic. En revanche, leur rôle sur le pronostic des patients atteints de NMP est controversé (Metzeler et al. 2011) (Bejar et al. 2011).

A l'heure actuelle deux hypothèses, non exclusives, sur le mécanisme de prédisposition aux hémopathies induit par les mutations de *TET2* ont été émises. Elles pourraient induire un

phénotype d'hypermutabilité, en altérant par exemple les mécanismes de réparation de l'ADN ou de la réponse aux dommages de l'ADN, favorisant l'acquisition d'autres mutations et le développement des maladies. Au contraire, les mutations de *TET2* pourraient également donner un avantage de sélection à des clones mutés préexistants incapables de se développer seuls puisque récemment, des mutations de *JAK2*V617F ont été identifiées dans la population générale.

De plus, toutes ces mutations y compris celles de *TET2* sont retrouvées enrichies chez les sujets âgés et associées à une hématopoïèse clonale sans que les sujets soient atteints d'une quelconque pathologie. Ceci est probablement dû au changement de l'hématopoïèse avec le vieillissement et suggère que ces mutations donnent probablement un avantage prolifératif aux CSHs permettant de contrebalancer les effets du vieillissement de l'hématopoïèse, mais qui pourrait augmenter le risque d'hémopathies myéloïdes malignes (Busque et al. 2012) (Xie et al. 2014) (McKerrell et al. 2015) (Jaiswal et al. 2014).

III-5 Conséquences de l'altération de TET2 dans les modèles murins

Afin de mieux comprendre le rôle de TET2 dans le développement hématopoïétique, de nombreuses équipes ont généré des modèles murins de *Tet2* par différentes approches : des knock out, des knock out conditionnels, des stratégies de « gene-trap » générant des transcrits de fusion comme Tet2- β Galactosidase. Les souris avec la délétion conditionnelle de l'exon 11 (Quivoron et al. 2011) ou de l'exon 3 (Moran-Crusio et al. 2011) ou la délétion systémique des exons 8-10 (Ko et al. 2011) sont viables et suivent les lois mendéliennes. Cependant, l'altération de *Tet2* affecte de différentes façons la survie des souris gène-trap : les souris avec insertion d'une casettes *LacZ-néomycine* au niveau de l'intron 2 du locus *Tet2* meurent en période périnatale (Kunimoto et al. 2012) (Shide et al. 2012). Par contre les souris gène-trap avec insertion dans l'exon 3 (Li et al. 2011) ou l'intron 9 (Quivoron et al. 2011) étaient viables. Dans tous ces modèles de souris, la quantité de l'ARNm de *Tet2* était significativement réduite, aucune régulation compensatrice n'a été observée au niveau des ARNm de *Tet1* et de *Tet3*, et les taux des 5-hmC étaient réduits (Quivoron et al. 2012) (Li et al. 2011) (Ku et al. 2011) (Ku et al. 2011) (Ku et al. 2012) (Moran-Crusio et al. 2011) (Shide et al. 2012) (Li et al. 2011). Les mécanismes à l'origine de ces différences ne sont pas connus.

Les différents modèles de souris mutées pour *Tet2* montrent un phénotype similaire. La perte de *Tet2* chez les souris adultes induit l'augmentation de l'autorenouvellement des CSHs et l'expansion progressive des compartiments LSK (Lineage⁻ Scal⁺ Kit⁺) et LK (Lineage⁻ Scal⁻ Kit⁺) qui sont enrichies en CSH et en progéniteurs myéloïdes, respectivement (Quivoron et al. 2011) (Ko et al. 2011) (Moran-Crusio et al. 2011) (Li et al. 2011).

Les progeniteurs obtenus après une série de cultures in vitro en milieu semi-liquide (méthylcellulose) montrent un profil d'expression génique similaire à celui du progéniteur myéloïde commun (PMyC) avec augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'autorenouvellement comme c-kit, Meis1, Evi1 et la diminution de l'expression des gènes spécifiques de la lignée myéloïde suggérant que ces cellules ont acquis les propriétés des cellules souches avec une réduction du potentiel de différenciation (Moran-Crusio et al. 2011). La perte conditionnelle de *Tet2* dans le compartiment hématopoïétique induit le développement avec l'âge d'une maladie proche de la LMMC caractérisée par une anémie, une thrombocytopénie et une augmentation monocytes et des leucocytes associée à une hématopoïèse extramédulaire, une hépatomégalie et une splénomégalie (Quivoron et al. 2011) (Moran-Crusio et al. 2011) (Li et al. 2011). La rate présentait une désorganisation de sa structure due à une infiltration massive de cellules myéloïdes ou érythroïdes. Ces souris induisent également une perturbation de l'hématopoïèse lymphoïde (Quivoron et al. 2011). D'autres modèles murins knockout de Tet2, développent une maladie proche des SMD avec une expansion des progéniteurs érythroïdes ou des maladies proches des NMP avec leucémie myéloïde (Li et al. 2011). Le fait que ces souris développent une maladie avec l'âge suggère que la délétion de Tet2 prédispose à l'apparition et au développement des pathologies malignes. La latence d'apparition des différentes maladies étant raccourcie dans des expériences de transplantations secondaires suggère que Tet2 est un facteur intrinsèque de contrôle du développement de la maladie et que la maladie pourrait dépendre de l'accumulation d'événements secondaires entraînant des maladies différentes.

Le fait que ces souris induisent une augmentation des progéniteurs et développent des maladies proches des CMML est en accord avec les résultats trouvés chez l'homme (Ko et al. 2010) (Pronier et al. 2011)

Des expériences de transplantation montrent que l'inactivation de *Tet2* dans les cellules progénitrices du foie fœtal induit également une expansion des cellules LSK avec

augmentation de l'autorenouvellement et de la capacité de repopulation (Kunimoto et al. 2012) (Shide et al. 2012) (Muto et al. 2013) suggérant que *Tet2* dans les conditions normales limite l'expansion et les fonctions des CSHs aussi bien chez le fœtus que chez l'adulte.

L'effet de l'inactivation de TET2 au cours du développement des hémopathies myéloïdes est résumé dans la figure 5 (**Figure 5**).



Figure 5 : Effet de l'inactivation de TET2 au cours du développement des hémopathies myéloïdes. L'inactivation de TET2 au niveau de la cellule souche hématopoïétique (CSH) entraine une augmentation des capacités d'autorenouvellement et une expansion du compartiment myéloïde qui acquiert l'expression des marqueurs de la pluripotence (Evi1, Meis1, et c-kit). L'acquisition de la mutation JAK2V617F ou d'une mutation secondaire de *TET2* ou d'autres altérations génétiques peuvent orienter la progression de la maladie vers les NMP ou les SMD pouvant être suivies d'une évolution en leucémies secondaires ou vers les LAM de novo.

III-6 TET2, 5-hmC et méthylation:

Comme TET2 hydroxyle les 5-mC en 5-hmC, l'hypothèse que la perte de l'activité enzymatique de TET2 induit une augmentation de la méthylation de cytosine et une réduction du taux des 5-hmC dans le génome semble tout à fait normale. Cependant, comment les mutations *TET2* modulent la méthylation de l'ADN reste controversé. Les études de la méthylation du génome de patients atteints d'hémopathies malignes associées à des mutations de *TET2* ont décrit et une hyperméthylation et une hypométhylation selon les régions. Figueroa et al, en adoptant la technique HELP ont trouvé que les progéniteurs CD34⁺ de

patients atteints de LAM de novo portant des mutations de TET2 montrent un nombre, relativement faible, de site HpaII hyperméthylés en comparaison avec les cellules CD34⁺ purifiées à partir de la moelle osseuse de sujets normaux (Figueroa et al. 2010). Néanmoins, il a été reporté que la réduction du taux de 5-hmC chez des patients avec différentes hémopathies myéloïdes malignes étaient associée principalement à une faible hypométhylation de l'ADN au niveau de la plupart des sites CpG différentiellement méthylés (Ko et al. 2010). L'utilisation de la technique « Illumina Infinium 27k methylation array » pour étudier le profil de méthylation de patients atteints de SMD et d'autres hémopathies myéloïdes malignes chroniques mutées pour TET2 suggère que la méthylation globale de l'ADN global n'est pas altérée dans les cellules de moelle osseuse de ces patients (Ko et al. 2010). L'étude du profil de méthylation de patients présentant des LMMC montre que les patients mutés pour TET2 présentent plus de régions hypométhylées au niveau des sites CpG différentiellement méthylés (Perez et al. 2012). Une étude similaire, sur des patients atteints de LMMC mutés TET2 a révélé, uniquement, deux gènes hyperméthylés, AIM2 et SP140 (Yamazaki et al. 2012). De plus, le knockdown de Tet2 est associé majoritairement à une diminution des 5-hmC dans le corps des gènes ainsi qu'à une perte des 5-hmC au niveau des régions exons/introns dans les cellules souches embryonnaires (CSE). Au niveau des promoteurs et des transcription staring site (TSS) le knock down de Tet2 résulte en une augmentation des 5-hmC probablement dûe à une compensation par Tetl (Huang et al. 2014).

Ces différences de variations du profil de méthylation en raison de l'inactivation de *TET2* pourraient être dues aux variations génétiques comme la présence de mutations additionnelles telles que les mutations d'*IDH1/2* ou les mutations de *DNMT3A*, ou bien au contexte de la maladie (SMD versus LAM) ou encore aux différences entre les approches techniques utilisées et les populations cellulaires utilisées par les différents groupes ou les régions concernées.

III-6-1 Autres mutations affectant les 5-hmC :

III-6-1-a IDH1/ IDH2 :

IDH1 et IDH2 sont deux enzymes métaboliques qui métabolisent l'isocitrate en α -KG de façon NADP⁺ dépendante, au cours du cycle de Krebs. Les mutations de *IDH1* ont été initialement détectées dans le glioblastome (Yan et al., 2009), elles ont été ensuite observées

dans 10% des LAM (Mardis et al., 2009) et dans les NMP (2-5% des cas) et les SMD (3% des cas). Ces mutations touchent principalement le codon R132 de *IDH1* et les codons R140 et R172 de *IDH2*. Les enzymes mutées ont la capacité de transformer l' α -KG en 2-HG (Ward et al., 2010), (Dang et al., 2010).

Comme l' α -KG est nécessaire pour la production des 5hmC par les protéines TET (He et al., 2011), l'accumulation du 2-HG inhibe l'activité de TET2 et conduit à une diminution des 5hmC et à une augmentation consécutive des 5mC au niveau de régions promotrices des gènes cibles. Au cours de l'hématopoïèse, ceci résulte en l'altération de la différenciation et induit une augmentation des CSH et progénitrices (Figueroa et al., 2010a), (Figueroa et al., 2010b), un phénotype similaire à celui observé dans les cas mutés pour *TET2*.

Chez la souris, le Knock-in conditionnel d'*Idh1R132H*, dans le compartiment hématopoïétique, entraine la production de 2-HG, l'expansion du pool des progéniteurs hématopoïétiques, l'altération de la différenciation. De plus, les souris présentent une anémie, une splénomégalie et une hématopoïèse extramedullaire. L'étude du profil de méthylation des progéniteurs hématopoïétiques confirme la tendance vers l'hypermethylation observée dans le génome des patients mutés *IDH1* (Sasaki et al., 2012).

Dans les hémopathies malignes, les mutations de *IDH1/2* sont associées à un pronostic défavorable (Tefferi et al., 2012).

Les 2-HG inhibent non seulement la fonction de TET2, mais aussi d'autres protéines dépendantes de l' α -KG telles que les histones déméthylases induisant ainsi une altération de la déméthylation des histones et une accumulation de la marque répressive di- et triméthylation de la lysine (Lu et al., 2012a).

III-6-1-b- Autres :

Le taux des 5-hmC ne dépend pas uniquement du statut d'activation des protéines TET. En effet, les mutations des enzymes métaboliques succinate dehydrogénase (SDH) et fumarate hydratase (FH) entrainent l'accumulation de leurs métabolites respectifs, le succinate et le fumarate, qui inhibent l'activité de TET2 et réduisent par conséquent le taux des 5-hmC dans les cancers (Xiao et al. 2012) (Letouze et al. 2013). Comme les 2-HG, ces métabolites peuvent inhiber les histones méthylases et induire une augmentation de la méthylation des

histones (Letouze et al. 2013). L'altération de la succinate dehydrogénase est répandue dans les tumeurs stromales gastrointestestinales (GIST). L'évaluation par immunohistochimie du taux de 5-hmC dans une cohorte de patients (GIST) chez qui la SDH est inactivée montre l'absence de 5-hmC dans 90% de ces tumeurs (Mason and Hornick 2013). Récemment, des mutations de la sous-unité SDHB de la SDH on été décrites à l'origine des tumeurs de paragangliomes et phéochromocytomes. Des mutations germinales de la FH et des mutations somatiques désactivant le second allèle ont été identifiées dans ces tumeurs induisant la réduction des 5-hmC (Castro-Vega et al. 2014). Il est à noter que les conséquences épigénétiques des mutations de la FH sont similaires à celles observées dans les tumeurs associées à des mutations de la sous unité SDHB suggérant que l'inhibition de TET2 et d'autres déméthylases pourraient avoir des conséquences épigénétiques qui chevauchent. Bien que ces mutations ne soient pas encore détectées dans les hémopathies malignes, il est possible que l'abondance de ces oncométabolites ou d'autres puisse affecter l'activité de TET2 et la production des 5-hmC. Toutefois, il est important d'explorer les mutations de ces enzymes et les taux relatifs de succinate et de fumarate dans les hémopathies myéloïdes malignes.

De plus, il a été reporté que les souris déficientes pour *Dnmt3a^{-/-}* présentent une réduction du taux des 5-hmC dans des régions particulières du génome au niveau des CSHs et superposables aux régions démunies de méthylation (Jeong et al. 2014). Dans les régions présentant une réduction de la méthylation et non pas son absence totale, le taux des 5-hmC était plus élevé. Ainsi, les mutations de *DNMT3A* qui entrainent une réduction de son activité et par conséquent une réduction de la méthylation, dans la LAM, pourraient affecter la production des 5-hmC en fonction du degré de la méthylation résiduelle et de sa localisation génomique.

Les différents facteurs affectant le taux de 5-hmC sont indiqués dans la figure 6 (Figure 6).

De nombreuses études suggèrent que les 5-hmC ne sont pas simplement des produits intermédiaires dans le processus de deméthylation mais peuvent aussi réguler l'expression génique dans la cellule (Wu et al. 2011) (Shen et al. 2013).



Figure 6: Les différents facteurs affectant le taux des 5-hmC. Le taux de 5-hmC dans la cellule peut être affecté directement ou indirectement par différents facteurs. Les mutations d'DH1/2 favorisent la conversion de l'isocitrate en 2-hydroxyglutarate (2-HG). Les mutations de la succinate déhydrogénase (SDH) et la fumarate hydratase (FH) entrainent l'accumulation de leurs substrats respectifs, le succinate et le fumarate. Ces deux derniers en plus du 2-HG sont des métabolites compétiteurs de l' α -KG, nécessaires pour l'activité des TETs. La déplétion ou l'inactivation de DNMT3A induit indirectement la réduction du taux de 5-hmC suite à la réduction de la méthylation. La vitamine C favorise l'activité des dioxygénases comme TET2 en permettant le recyclage du Fe II. Le miR-29a est capable de diminuer les 5-hmC en régulant l'expression de TET2.

III-6-2 Métabolisation des 5-hmC: la réparation par excision de base

Les 5-hmC sont reconnus et pris en charge par les protéines de la voie de réparation par excision de base (BER).

Le BER reconnait et répare les modifications subtiles de l'ADN en particulier les bases modifiées, les sites abasiques, les cassures simple-brin et double-brin de l'ADN. De tels dommages résultent des mécanismes de déamination, d'oxydation ou de méthylation (Krokan et Bjoras 2013) (Sancar et al. 2004). Beaucoup de ces dommages proviennent de l'altération spontanée de l'ADN (Lindahl 1993) par des stress endogènes en particulier par les espèces réactives oxygénées, les ROS. Cependant, des dommages similaires peuvent aussi résulter de

facteurs environnementaux comme l'exposition à des agents chimiques, à des radiations, ou à un traitement par des drogues cytotoxiques.

III-6-2-1 Etapes et mécanisme de la réparation par BER

D'une façon générale, la réparation par BER est un mécanisme multi-étape :

D'abord une ADN glycosylase reconnait et excise la base modifiée générant un site apurinique/apyrimidique (AP). Ensuite, l'endonucléase (APE1) incise le site (AP) et génère des groupes 3'-OH et 5'-deoxyribose phosphate (dRP). Une ADN polymérase intervient par la suite pour synthétiser la région endommagée. Finalement, une ADN ligase lie les extrémités et restaure la continuité de la liaison phosphodiester.

III-6-2-1-a Détection de la lésion par les DNA glycosylases :

La première étape est l'intervention d'une enzyme appelée ADN glycosylase, responsable de la détection des altérations prises en charge par cette voie. L'ADN glycosylase glisse le long de l'ADN à la recherche d'éventuels dommages (Dunn et al. 2011), une fois qu'elle reconnait la lésion, elle pousse la base endommagée en dehors de la double hélice et coupe la liaison N-glycosyl entre le sucre (déoxyribose) et la base endommagée (Svilar et al. 2011) permettant ainsi la libération de cette dernière et la génération d'un site abasique connu sous le nom de site apurinique/apyrimidinique (AP) (McCullough et al. 1999) (Mol et al. 1999). La réparation des sites (AP) est très importante dans le maintien de l'intégrité du génome car il s'agit de dommages très mutagènes (Lindahl 1990) (Loeb 1985). Un site (AP) peut être rapidement le siège d'une mutation ou d'une lésion plus complexe comme la cassure simple brin.

Le mécanisme de BER fait intervenir 11 ADN glycosylases différentes en fonction du type de lésion détectée (Krokan and Bjoras 2013). Dans la cellule humaine, les lésions oxydatives pyrimidines sont généralement reconnues par les enzymes hNTH1, hNEIL1, ou hNEIL2, alors que les lésions purines oxydatives sont détectées par hOGG1.

Les glycosylases sont classées en deux groupes:

-Les glycosylases monofonctionelles sont celles qui ont uniquement une activité glycosylase comme la *N*-méthylpurine-ADN glycosylase (MPG), l'uracil *N*-glycosylase (UNG), la mutY

homolog glycosylase (MUTYH), la thymine-DNA glycosylase (TDG), la methyl-CpGbinding domain protein 4 (MBD4) et la single-strand selective monofunctional uracil glycosylase (SMUG1). Il a été montré que certaines glycosylases monofonctionnelles restent liées à l'ADN au niveau du site AP pour le protéger d'une cassure spontanée du brin et/ou pour coordonner l'action de l'APE1 (Hegde et al. 2008).

-Les glycosylases bifonctionnelles : sont les enzymes qui ont à la fois une activité glycosylase et une activité AP-lyase. Ainsi, la glycosylase bifonctionnelle peut convertir la lésion de base en une cassure simple brin sans l'intervention d'une AP endonucléase. Parmi ces enzymes il y a l'endonuclease III-like protein 1 (NTH1), la 8-oxo-Guanine glycosylase (OGG1) qui reconnait les 8-oxoG appariées avec la cytosine dans l'ADN et les membres de la famille des endonucléases VIII-like protein (NEIL1, NEIL2 and NEIL3).

En fonction du nombre de nucléotides éliminés (courte ou longue excision), le mécanisme du BER procède soit en empruntant la voie de réparation short-patch soit la voie de réparation long-patch et ceci en recrutant différentes protéines pour chaque voie (Krokan et Bjoras 2013).

III-6-2-1-b *La BER Short-patch* : cette voie n'implique qu'une seule base et fait intervenir un ensemble de protéines y compris, l'endonucléase-AP (APE1), l'ADN polymérase β (Pol β), l'ADN ligase III (LIG3) et la protéine X-Ray repair cross-complementing (XRCC1).

L'APE1 incise le site pour permettre l'action de reconstruction. Le nucléotide excisé est remplacé par un nouveau nucléotide grâce à la polymérase β qui travaille en étroite collaboration avec APE1. Le scellement du nouveau segment à l'intérieur du brin de l'ADN est réalisé par un complexe de deux protéines, XRCC1 et l'ADN ligase 3 (**Figure 7A**).

III-6-2-1-c *La BER Long-patch* : cette voie mobilise les bases voisines de la lésion. Quand la partie 5' de la lésion n'est pas sensible à l'action de l'incision par APE1, l'excision est élargie à plusieurs nucléotides et génère un enlèvement de 2-10 nucléotides. Les polymérases δ/ϵ en coopérant avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen) synthétisent le nouvel oligonucléotide. Ce brin long va être découpé par une endonucléase flap (FEN1) qui le ramène à la longueur nécessaire. L'ADN ligase 1 (LIG1) va finalement sceller le nouveau brin aux deux extrémités de l'ancien brin et terminer ainsi la réparation (Dianov et al. 1998) (Kim and Wilson 2012) (Wilson and Kunkel 2000). (**Figure 7B**).



Figure 7: Les différentes étapes de la réparation par excision de base. La thymine-DNA glycosylase (TDG) reconnaît et excise la base modifiée (X) générant un site apurinique/apyrimidique (AP). L'endonucléase (APE1) incise, ensuite, le site AP. L'incision peut mobiliser une seule base (short patch (A)) ou un oligonucucléotide (long patch (B)). (A) la polymérase β remplace le nucléotide excisé par un nouveau nucléotide. L'ADN ligase 3 en coopérant avec XRCC1 scelle le nouveau segment à l'intérieur du brin de l'ADN. (B) Les polymérases δ/ϵ en coopérant avec PCNA (proliferating cell nuclear antigen) synthétisent le nouveau oligonucléotide qui est ensuite découpé par une endonucléase flap (FEN1) qui le

ramène à la longueur adéquate. L'ADN ligase 1 (LIG1) scelle le nouveau brin aux deux extrémités de l'ancien brin et termine ainsi la réparation.

L'hypothèse de l'implication du BER dans le processus de la déméthylation a stimulé les recherches d'enzymes glycosylases candidates qui pourraient exciser la cytosine modifiée. Certaines études proposaient que les deux principales ADN glycosylases pouvant initier la réparation des cytosines déaminées et des 5-mC au niveau des sites CpG soient la Methyl-Binding Domain Protein 4 (MBD4) et la Thymine DNA Glycosylase (TDG). En effet, il a été rapporté que MBD4 et TDG partageaient des activités similaires chez les mammifères (Zhu 2009) et que ces deux gènes sont retrouvés mutés dans de nombreuses tumeurs chez l'homme. Entre temps, les évidences que TDG jouait un rôle dans la déméthylation de l'ADN ont émergé. En effet, il a été montré que TDG interagit avec de nombreux facteurs de transcription, avec des enzymes modulatrices de la chromatine et avec les DNMTs (Dalton et Bellacosa 2012) suggérant ainsi la possibilité que TDG pouvait avoir un rôle dans la modulation de la transcription des gènes soit grâce à son activité glycosylase soit en tant que co-activateur de la transcription (Dalton and Bellacosa 2012).

Après la découverte des protéines TET, des études ont montré que TDG était nécessaire pour le développement embryonnaire (Cortazar et al. 2011) (Cortellino et al. 2011). Les études moléculaires montrent que les embryons *Tdg-/-* ou catalytiquement inactivés présentent des aberrations épigénétiques. Ces embryons présentent une diminution significative de l'expression des facteurs de transcription développementaux comme les membres de la famille *hox*, avec altération de la méthylation au niveau de leurs séquences (Cortazar et al. 2011) (Cortellino et al. 2011). Bien que ces découvertes augmentent la possibilité que TDG soit essentielle pour la déméthylation de l'ADN, la nature de ses cibles génomique reste mal comprise.

III-7 La thymidine DNA glycosylase (TDG) :

III-7-1 Structure de TDG

Chez l'homme, le gène *TDG* est localisé sur le chromosome 12q24.1 et s'étend sur une région de 23 kb. Sa partie codante est de 3,251 bp et comprend 10 exons. TDG est un membre des Mismatch Uracil Glycosylase (MUG), une branche de la super-famille des uracil DNA 54

glycosylase monofunctionnelles (Cortazar et al. 2007). Ce groupe de glycosylases partagent une structure en hélice α/β et possèdent tous un domaine catalytique conservé. TDG est une protéine de 410 acides aminés, son domaine catalytique (domaine glycosylase) couvre les résidus de 123 à 300. Les extrémités terminales de la protéine modulent son activité enzymatique et assurent les interactions de TDG avec les autres protéines comme les récepteurs nucléaires et d'autres régulateurs de la transcription (Missero et al. 2001) (Tini et al. 2002) (Chen et al. 2003) (Li et al. 2007). De plus, le domaine C-terminal contient un site de conjugaison avec des groupes SUMO (site Lys330) alors que le domaine N-terminal contient un domaine régulateur qui constitue une cible d'acétylation sur de nombreux résidus lysine (Smet-Nocca et al. 2008) (Hardeland et al. 2002). Toutes ces interactions sont susceptibles de modifier la fonction de TDG et certaines contribuent à assurer la spécificité vis-à-vis du substrat, l'interaction avec le substrat et la cinétique de libération de la base.

III-7-2 Fonctions et Rôle de TDG au cours de la déméthylation active :

La première évidence que TDG est impliquée dans le processus de déméthylation active a été fourni par l'équipe de Bellacosa quand ils ont généré des souris knock in avec une mutation inactivatrice de TDG (Cortellino et al. 2011). Ils ont trouvé que cette mutation entraine une létalité embryonnaire prouvant ainsi que l'activité catalytique de TDG est indispensable pour le développement. Ils ont aussi montré que TDG forme un complexe avec AID et la protéine de réponse aux dommages de l'ADN, GADD45a, suggérant un mécanisme de déméthylation à deux étapes, au cours du développement. TDG est aussi nécessaire pour protéger les CpG de l'hyperméthylation. Au total, ils ont proposé un modèle de déméthylation active, impliquant TDG dans le quel les 5-mC sont d'abord hydroxylés par les TET pour produire les 5-hmC. Les 5-hmC peuvent être déaminées par des cytidines déaminases de la famille AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide like) pour générer les 5-hydroxyméthyluraciles (5-hmU) (Cortellino et al. 2011). Alternativement, les 5-mC peuvent être directement déaminées en thymine (T). Les lésions consécutives peuvent être excisées par TDG et réparées par excision de base (BER) qui remplace la 5-mC par une cytosine (C) (Bhutani et al. 2011). Enfin, TDG est capable d'exciser également les 5-fC et 5-caC, correspondant à des produits oxydés par les TETs (He et al. 2011) (Maiti and Drohat 2011). Tous les substrats de TDG en plus de la thymine et des 5-hmU peuvent entrainer des lésions au cours du mécanisme de la déméthylation active (Bhutani et al. 2011) (Hardeland et al. 2003) (Figure 2. Article1).

Au total, la voie BER assure la détection et la réparation des bases endommagées, des sites (AP) et des cassures simple-brin. Ainsi, le BER joue un rôle dans le maintien de la stabilité génomique et dans la lutte contre le développement de certaines maladies humaines comme le vieillissement prématuré, le cancer et les maladies neurodégénératives.

III-8 BER et cancer

La BER est un processus critique pour le maintien de la stabilité génomique comme le montre le phénotype des animaux présentant des anomalies de la voie BER, et développant des cancers, un vieillissement prématuré et des anomalies métaboliques (Mostoslavsky et al. 2006) (Vartanian et al. 2006).

L'altération des voies de réparation des dommages de l'ADN entre autres la voie BER conduit à des prédispositions au cancer. En effet, des mutations somatiques de la Pol β ont été détectées dans 30% des cancers chez l'homme (Starcevic et al. 2004). Des mutations de l'ADN glycosylase *MUTYH* ont été décrites dans le cancer du colon (Al-Tassan et al. 2002) (Gryfe 2009). Des polymorphismes génétiques d'*APE1* ont été associés à un risque de carcinome rénal (Cao et al. 2011) et à une progression du cancer du sein (Kang et al. 2013). Récemment, des polymorphismes génétiques d'*OGG1* ont été trouvés associés à des risques de cancers colorectal et pancréatique (Chen et al. 2014) (Su et al. 2014). La déplétion ou l'inactivation catalytique de *TDG* est associée à la létalité embryonnaire chez la souris (Cortellino et al. 2011). Ce phénotype a été retrouvé associé à des aberrations épigénétiques affectant l'expression des gènes de développement (Cortazar et al. 2011).

III-9 TET2, BER et instabilité génétique

Les résultats préliminaires sur la fonction de TET2 dans les hémopathies suggèrent que son altération est précoce et précède la mutation *JAK2V617F* dans les NMP. L'une des hypothèses est que l'inactivation de ce gène génère un état « pré-leucémique » avec expansion clonale. Dans ce contexte, la survenue d'une mutation oncogénique secondaire ferait évoluer l'état pré-leucémique vers un NMP, un SMD ou une leucémie aiguë. TET2 pourrait donc avoir un rôle dans l'apparition de ces deuxièmes événements en jouant sur le contrôle de la

stabilité du génome. En accord avec cette hypothèse, les souris knock-out *tet2* développent des hémopathies myéloïdes ressemblant à des SMD mais avec un délai assez long. En revanche ce délai est très raccourci lors de transplantations secondaires. Ainsi, ces données suggèrent que TET2 favorise l'apparition d'événements génétiques secondaires. D'autres données viennent étayer cette hypothèse. Notamment, la fonction d'hydroxyméthylation des TET a été montrée être couplée au mécanisme du BER (Cortellino et al. 2011) (Guo et al. 2011). TET1 et TET2 ont aussi été montré comme co-régulés avec les protéines du BER comme XRCC1 et APE1 lors de la déméthylation des cellules primordiales germinales (Hajkova et al. 2010). Ainsi, la déméthylation de l'ADN étant en lien avec le mécanisme de BER, il est légitime de se poser la question du contrôle de la stabilité génétique lors de cette étape. En effet, l'élimination des 5-hmC par des ADN glycosylases et des endonucléases créée des sites abasiques et des cassures de l'ADN, respectivement pouvant engendrer des lésions génotoxiques et mutagènes. De plus, les cytosines oxydées et déaminées, et l'utilisation d'une polymérase β dite « infidèle » pour la resynthèse peuvent aussi participer à ce phénomène.

Enfin, l'absence de méthylation elle-même peut être responsable d'instabilité génomique. En effet, l'hypométhylation génomique dans les souris hypomorphes *Dnmt1* induit des lymphomes T agressifs présentant une grande instabilité chromosomique (Gaudet et al. 2003). L'ensemble de ces données suggère fortement un rôle des protéines TET et de la déméthylation dans l'instabilité génomique.

ARTICLE 1

« Propriétés et rôles biologiques des protéines TET au cours du développement et de l'hématopoïèse »



> La méthylation de l'ADN est associée à de nombreux processus biologiques et concerne la méthylation de la cytosine en position 5 (5-mC). Un mécanisme actif de déméthylation, jusqu'alors discuté, a été mis en évidence en 2009 à la suite de la découverte des protéines TET (ten-eleven-translocation). Ces protéines sont des enzymes capables d'hydroxyler la 5-mC en 5-hydroxyméthylcytosine. Simultanément, d'autres études ont montré la fréquence et le rôle des mutations acquises de TET2 dans les hémopathies et leur pathogenèse. Depuis, ces protéines ont été impliquées dans de très nombreux processus, ouvrant un nouveau domaine de recherche. Dans cette revue, nous discuterons les fonctions enzymatique et biologique de ces protéines, ainsi que leurs rôles, notamment au cours de l'hématopoïèse et du développement. <

Propriétés et rôles biologiques des protéines TET au cours du développement et de l'hématopoïèse

Emna Mahfoudhi¹⁻⁴, Lise Secardin¹⁻³, Laurianne Scourzic¹⁻³, Olivier Bernard ¹⁻³, William Vainchenker¹⁻³, Isabelle Plo¹⁻³



¹ Inserm 1170,
 Institut Gustave Roussy,
 114, rue Edouard Vaillant,
 94805 Villejuif, France;
 ² Institut Gustave Roussy,
 Villejuif, France;
 ³ Université Paris XI, Orsay,
 France;
 ⁴ Laboratoire d'hématologie
 moléculaire et cellulaire
 (S. Abbes), Institut Pasteur
 de Tunis, Belvédère, Tunisie.
 isabelle.plo@gustaveroussy.fr

Structure de la famille des protéines TET

Les protéines de la famille TET (TET1, -2 et -3) ont été découvertes à la suite de l'identification du gène TET1 en tant que partenaire de fusion du gène MLL (mixed *lineage leukemia*) dans les translocations t(10;11) (q22;q23) [1]. Les gènes TET sont conservés dans le processus évolutif, puisque des gènes orthologues existent dans les génomes de drosophile et du trypanosome. Les trois protéines partagent deux régions hautement conservées, l'une au centre de la protéine et l'autre à l'extrémité carboxy-terminale. Elles incluent deux domaines caractéristiques de la famille des dioxygénases : un domaine riche en cystéine et un domaine en double hélice de feuillets β (DSBH) permettant la fixation du fer (Fe II) et du 2-oxoglutarate (20G). De plus, TET1 et TET3 présentent un domaine à motif en doigt de zinc, CXXC, permettant une fixation à l'ADN, en particulier à des séquences CpG non méthylées (Figure 1). La structure cristallographique de TET2 a montré qu'elle se

fixe aux 5-mC grâce à trois atomes de zinc, qui sont coordonnés par les domaines riches en cystéine et le domaine DSBH [2].

Fonction enzymatique des TET

Les enzymes TET sont impliquées dans la première étape d'un processus de déméthylation actif qui se termine par le remplacement par une cytosine non méthylée. Elles sont capables d'initier ce processus en hydroxylant les 5-mC en 5-hydroxyméthylcytosines (5-hmC) (*Figure 2*) [3]. Les 5-hmC ont été principalement identifiées dans les cellules souches embryonnaires (CSE) et les neurones adultes, où elles représentent 15 à 40 % des 5-mC; elles sont aussi présentes dans tous les types cellulaires, mais n'y constituent que 1 à 5 % des 5-mC [3, 4]. Il y a ensuite deux voies de transformation des 5-hmC :

• Les 5-hmC peuvent être déaminées par des cytidine déaminases de la famille AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase / apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide like) pour générer les 5-hydroxyméthyluraciles (5-hmU). Des enzymes impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN par excision de base (BER) sont ensuite utilisées pour la resynthèse de la cytosine non méthylée. Ainsi, les 5-hmU sont reconnues par la thymidine ADN glycosylase (TDG), en association ou pas avec la methyl-binding protein 4 (MBD4),

Vignette (Photo © Inserm-Anas Fadloun et Maria Elena Torres-Padilla).



Figure 1. Représentation schématique des protéines TET. A. Les trois membres de la famille TET partagent une région carboxy-terminale hautement conservée au cours de l'évolution. Cette région comprend un domaine riche en cystéines suivi d'une séquence en double hélice avec feuillets β (DSBH) qui est le domaine catalytique de ces protéines. TET1 et TET3 présentent, à leur extrémité aminoterminale, un domaine de liaison à la chromatine (CXXC), alors que TET2 en est démuni ; mais TET2 agit en partenariat avec IDAX (CXXC4, une protéine à domaine CXXC). B. Le domaine DSBH des protéines TET comprend deux sites de fixation au Fe II et un site de liaison au 2-oxoglutarate (20G).

ynthèse 🚱 REVUES

puis une endonucléase apurinique/apyrimidique (APE1) excise le nucléotide. Enfin, la resynthèse de la cytosine se fait par l'intervention d'un complexe constitué de la polynucléotide kinase/phosphatase (PNKP), de la polymérase β , de la ligase 3 et de XRCC1 (*CX repair cross* complementing protein 1) [5, 6].

· Les protéines TET sont aussi capables de poursuivre l'oxydation des 5-hmC en générant successivement la 5-formylcytosine (5-fC), puis la 5-carboxycytosine (5-caC). Ces composés sont moins abondants que les 5-hmC puisqu'ils sont produits moins activement et, d'autre part, très rapidement oxydés et probablement pris en charge par des enzymes spécifiques, notamment par la TDG [7] ou, potentiellement, par des décarboxylases ou des déformylases.

• Des travaux récents indiquent que les protéines TET seraient également capables d'hydroxyler les thymines en 5-hmU, qui pourrait stimuler la réparation de l'ADN ou moduler la liaison de facteurs de transcription [8].

Ainsi, la famille TET, via l'hydroxylation des 5-mC, est impliquée dans le contrôle de la méthylation de l'ADN. Toutefois, une guestion se pose encore concernant le contrôle de la stabilité génomique au cours de ce processus : en effet, l'élimination des 5-hmC par des ADN glycosylases et des endonucléases crée des sites abasiques et des cassures de l'ADN respectivement, pouvant engendrer des lésions génotoxiques et mutagènes. De plus, les cytosines oxydées (qui peuvent être considérées comme un dommage oxydatif) et déaminées, et l'utilisation d'une polymérase β dite « infidèle » pour la resynthèse, peuvent aussi participer à ce processus d'instabilité.

Rôle des TET dans le contrôle de l'expression génique

Un certain nombre d'études montrent aujourd'hui que les protéines TET pourraient réguler la transcription génique, que ce soit, ou non, par le biais de leur activité catalytique (Figure 3).

Rôle activateur de la transcription via les 5-hydroxyméthylcytosines

Plusieurs laboratoires ont réalisé une cartographie des sites de liaison des protéines TET1 et TET2 sur le génome, essentiellement dans les cellules souches embryonnaires (CSE). TET1 se fixe au niveau des régions d'initiation de la transcription (TSS) enrichies en CpG et, à un degré moindre, dans le corps des gènes [7, 9]. La fixation de TET2, malgré un certain chevauchement avec les sites de fixation de TET1, prédomine dans le corps des gènes qui sont activement transcrits [10]. Ces sites de fixation se trouvent dans des régions où



Figure 2. Les protéines TET et la déméthylation de l'ADN. Les protéines de la famille TET oxydent les 5-mC en 5-hmC, 5-fC et 5-caC. Les 5-fC et 5-caC sont reconnues et excisées par la TDG. Les 5-hmC sont déaminées en 5-hmU par les protéines AID/APOBEC, puis excisées par la TDG en association ou pas avec MBD4 et SMUG1 (single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1). Les sites abasiques (AP), qui résultent de l'excision des bases modifiées, sont enfin réparés et remplacés par une cytosine non modifiée via un mécanisme qui fait intervenir la voie du BER.

les 5-hmC sont particulièrement enrichies : les promoteurs, les exons des gènes fortement transcrits, mais aussi au niveau des frontières introns-exons dans certains types cellulaires, comme les cellules du cerveau et les cellules primordiales germinales. La différence de localisation des sites de fixation de TET1 et TET2 pourrait être attribuée au domaine CXXC de TET1, qui se lie aux séquences non méthylées comme le sont généralement les îlots CpG et les séquences CG dans les promoteurs. Il a aussi été montré que TET1 et TET2 se fixent à des séquences super-régulatrices liées, entre autres, au locus Nanog,

pour permettre la transcription de longs ARN non codants [11, 33] (→). Un certain nombre d'études dans les cellules souches embryonnaires ou chez les patients porteurs de mutations de

(→) Voir la Synthèse de T. Pedrazzini, page 261 de ce numéro

TET2, ont montré que l'absence ou l'altération de l'activité enzymatique des protéines TET induisaient une diminution significative des 5-hmC, sans que le niveau de 5-mC global ne soit sensiblement affecté [12]. Cependant, les 5-hmC ne représentant qu'une faible proportion des 5-mC, la méthylation a ensuite été analysée au niveau de certains locus précis. Ainsi, les protéines TET permettent la déméthylation de certains promoteurs de gènes impliqués dans le contrôle et le maintien de la pluripotence, comme *Nanog* dans les cellules souches embryonnaires. La génération des 5-hmC par les TET pourrait aussi être importante pour l'expression génique, car ces dernières fixent des protéines spécifiques ou empêchent la fixation de protéines spécifiques des 5-mC comme l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) [7], des *methyl-binding protein* (MBD1/2 ou MeCP2 [*methyl CpG binding protein* 2]) [13] ou de facteurs de transcription, comme le répresseur *zinc finger and* *BTB domain containing* 2 (ZBTB2) [14]. Tous ces mécanismes pourraient donc contribuer au rôle des protéines TET dans la régulation de la transcription des gènes.

Rôle répresseur indépendant de l'activité catalytique De façon surprenante, le défaut de TET1 induit, non seulement une diminution de l'expression de certains gènes, mais aussi l'augmentation de l'expression d'autres gènes. Les protéines TET1 se fixent aux mêmes régions géniques que le complexe multiprotéique de répression appelé polycomb repressing complex 2 (PRC2) (EED/SUZ12/EZH2 [enhancer of zeste homolog 2]), et pourraient être impliquées de facon indirecte dans son recrutement sur la chromatine [7, 9]. La fonction de PRC2 est de participer à la compaction de l'ADN en catalysant la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3), généralement sur des promoteurs dits bivalents, capables de s'activer ou de se réprimer rapidement. De fait, les profils d'expression génique des cellules déficientes en EED ou en TET1 sont très similaires, suggérant un rôle répresseur de TET1 via PRC2. De plus, TET1 interagit avec Sin3A, un corépresseur associé à une activité déacétylase [9], et induit son recrutement et, en conséquence, la répression de la transcription [9].

Au contraire, TET2 ne semble pas avoir les mêmes fonctions sur ces complexes répresseurs : elle agirait plutôt comme un activateur de la transcription via le recrutement de la β -D-N-acétylglucosamine (O-GlcNac) transférase (OGT) sur la chromatine. L'interaction de TET2 avec OGT facilite la O-GlcNacylation de l'histone 2B sur la sérine 112 (H2B Ser112 O-GlcNAc), indépendamment de l'activité catalytique de TET2. Cette fonction de TET2 est partagée par TET1 et TET3, puisque l'interaction se fait par le domaine catalytique, commun aux trois protéines. De plus, TET2 interagit aussi avec le groupement O-GlcNAc du host cell factor 1 (HCF1), qui est un composant du complexe de la H3K4 méthyltransférase Set1/compass, induisant son activation [15].

Régulation des TET

Régulation post-transcriptionnelle

L'expression des gènes *Tet1/2/3* est contrôlée par le miARN miR-22, qui engendre une instabilité des transcrits, notamment au cours du processus d'hématopoïèse ou du développement de la glande mammaire [16]. Ainsi, chez les souris transgéniques exprimant miR-22 de façon conditionnelle dans le lignage hématopoïétique, on observe une diminution du taux de 5-hmC; le phénotype des souris est proche de celui des souris déficientes pour *Tet2*, avec une amplification des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et l'apparition d'hémopathies.



Figure 3. Les protéines TET et le contrôle de l'expression génique via l'hydroxyméthylation. A. Sur l'ADN : les DNMT se fixent, notamment, au niveau des séquences riches en CG non méthylées des promoteurs, et méthylent les cytosines qui sont alors reconnues par des protéines comme la protéine répressive MeCP2. B. Les protéines TET se lient à la chromatine et oxydent les 5-mC en 5-hmC. L'hydroxylation des 5-mC inhibe la liaison des protéines spécifiques des 5-mC, telles que les DNMT ou MBD1/2, ainsi que des répresseurs de la transcription comme ZBTB2. C. Au niveau des histones : TET1 interagit directement avec la protéine corépressive Sin3a et, indirectement, avec le complexe PRC2 (EZH2/EED/SUZ12). Sin3a est membre d'un complexe porteur d'une activité déacétylase et EZH2 catalyse la triméthylation la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), participant ainsi à la répression de la transcription. D. TET1/2/3 interagissent avec OGT et recrutent la protéine sur la chromatine au niveau des promoteurs. OGT stabilise le complexe SET1/Compass via le facteur HCF1 (host cell factor 1) GlcNacétylé, ce qui favorise la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) de l'histone H3, induisant ainsi une activation transcriptionnelle.

La protéine TET2 peut être également protéolysée via la protéine IDAX (inhibition of the Dvl and axin complex), appelée aussi CXXC4. Le gène *CXXC4* se situe à coté du gène *TET*2, mais il est transcrit en sens inverse. Ces deux gènes pourraient résulter de la scission d'un gène unique au cours de l'évolution, séparant les séquences codant pour le domaine de fixation à l'ADN (CXXC4) et le domaine catalytique (TET2) ; ce n'est pas le cas des protéines TET1 et TET3. Ainsi, IDAX se fixe par son domaine CXXC sur des séquences riches en CpG non méthylées de l'ADN au niveau des promoteurs, et permet de recruter TET2. Il en résulte une activation des caspases, un clivage et une dégradation de TET2 [17]. La protéine TET3 serait régulée de la même façon par son domaine CXXC.

Localisation cellulaire

Les protéines TET1 et -2 sont généralement localisées dans le noyau, alors que TET3 est nucléo-cytoplasmique. Une étude a montré que la surexpression de la protéine AID induit un changement de localisation des protéines TET, qui migrent vers le cytoplasme, et une relocalisation d'AID dans le noyau, suggérant que l'activation de cette dernière régule la localisation subcellulaire des TET [18].

Régulation de la fonction enzymatique

L'activité catalytique des protéines TET est également régulée. En effet, elle est dépendante du fer, du 20G et de l'oxygène. Ainsi, tout facteur capable de faire varier ces trois composés peut moduler l'activité de ces protéines. Le 20G peut provenir de différentes sources, incluant soit la transamination, soit la désamination de l'acide glutamique, soit la déshydrogénation de l'isocitrate via le cycle de Krebs. Cette dernière étape fait intervenir des enzymes appelées isocitrate déshydrogénases, cytosolique pour IDH1 (*isocitrate dehydrogenase 1*), mitochondriale pour IDH2. Des mutations dans les gènes codant pour ces deux protéines ont été identifiées dans les hémopathies [19]. Les protéines mutées ont la capacité de synthétiser l'énantiomère R du 2-hydroxyglutarate, capable d'inhiber l'activité des dioxygénases, dont les membres de la famille TET, par compétition avec le 20G. Enfin, certains cofacteurs, comme la vitamine C, favorisent l'activité de ces dioxygénases en permettant le repliement du domaine catalytique et le recyclage du Fe II [20].

ynthèse S REVUES

Fonctions biologiques dans l'embryogenèse et la reprogrammation

Souris invalidées génétiquement (knock-out [K0]) pour Tet1 ou Tet2 Les souris invalidées pour les gènes Tetl ou Tet2 sont viables et ne présentent pas de trouble du développement, même si les souris Tet1-/sont de plus petite taille que les souris sauvages [21, 22]. Les souris Tet3-/- meurent en période périnatale. Chez ces souris, la reprogrammation épigénétique du génome paternel est altérée. Les femelles dont l'allèle maternel est déficient pour Tet3 (Tet3^{mat-}/pat⁺) ont une fécondité réduite, et leurs descendants décèdent avec des anomalies dans de multiples organes [23]. Il en est de même pour les souris double KO *Tet1^{-/-} Tet2^{-/-}* dont plus de la moitié meurent en période périnatale de troubles développementaux sévères. Les souris viables sont celles qui compensent par une augmentation de l'expression de Tet3, suggérant un rôle redondant des trois gènes durant le développement [24]. De fait, les souris triple KO ne sont pas viables, et la 5-hmC est totalement absente des cellules souches embryonnaires, soulignant le rôle primordial des 5-hmC dans le développement (Figure 4) [25].

Cellules souches embryonnaires

Tet1 et Tet2 sont tous deux exprimés dans les cellules souches embryonnaires de souris, contrairement aux cellules souches embryonnaires humaines, où TET1 prédomine [4, 26]. Les CSE murines Tet1^{-/-} de souris sont pluripotentes, mais présentent un défaut de différenciation (biais vers moins de neuroectoderme et plus d'endoderme). Quant à l'inactivation de Tet2, elle n'abolit pas la pluripotence, mais induit un biais de différenciation vers le neuroectoderme aux dépens des autres feuillets embryonnaires (mésoderme/endoderme) et entraîne, dans les cellules souches embryonnaires humaines, une diminution de la génération de cellules hématopoïétiques. Les cellules souches embryonnaires Tet1^{-/-} Tet2^{-/-} sont pluripotentes, mais expriment un biais de différenciation en faveur du lignage trophoblastique [24]. En revanche, la pluripotence est considérablement réduite dans les CSE murines triple K0 [25].

Ces données montrent que les protéines TET sont impliquées dans la pluripotence et le développement. Leurs rôles dans le contrôle de l'expression des facteurs de pluripotence, tels que Nanog, et la répression des facteurs de différenciation *via* le complexe PRC2 sont connus, mais ils ne représentent probablement qu'une partie du mécanisme en jeu (*Figure 4*) [7].

Au cours de la reprogrammation

Ces protéines sont également impliquées dans la reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules souches pluripotentes iPSC (*induced pluripotent stem cells*), puisque le défaut de *Tet1* ou de *Tet2* diminue l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes murins ou humains en iPSC [27, 28]. Ce mécanisme fait intervenir soit la régulation des gènes de pluripotence par les protéines Tet en partenariat avec Nanog et/ou Oct4 (*octamer-binding transcription factor* 4), soit la régulation directe du promoteur de *Nanog* par les Tet. Tet1 peut aussi remplacer Oct4 dans le processus de reprogrammation à partir des fibroblastes, *via* la déméthylation du promoteur *Oct4* [29]. Enfin, Tet2 facilite la dérépression

Fonctions dans le système hématopoïétique

Hémopathies humaines

Les transcrits de fusion MLL-TET1 ont tout d'abord été décrits dans des leucémies aiguës. Puis, en 2009, avec des approches de cytogénétique et de génomique, deux groupes - dont le nôtre - ont identifié des mutations acquises de TET2 chez 15 à 20 % des patients atteints de syndromes myélodysplasiques (SMD) et de néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) [31]. Il s'agit de mutations faux-sens, non-sens et de sauts du cadre de lecture, qui inactivent le gène. Des pertes d'hétérozygotie ont été détectées dans 10 à 20 % des cas. Par la suite, des mutations de TET2 ont été découvertes dans beaucoup d'autres hémopathies myéloïdes, notamment les leucémies myélomonocytaires (LMMC) (environ 50 %), les mastocytoses (20 %), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) (10-20%) et lymphoïdes (lymphomes B [2%], les lymphomes du manteau [4 %], lymphomes B diffus à grandes cellules [12 %], lymphomes T [12 %], et surtout les AITL [angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 33 %]) [32]. Les mutations peuvent apparaître tôt ou tardivement au cours du développement des maladies. Toutefois, la valeur pronostique de TET2 reste encore très controversée, surtout dans les LAM et les NMP.

Fonction de TET2 dans l'hématopoïèse

TET2 et TET3 sont exprimées dans le tissu hématopoïétique, avec toutefois des différences entre les types cellulaires (faible expression dans les érythroblastes, forte expression dans les lymphocytes B matures). Nos études in vitro de la fonction de TET2 chez l'homme ont montré que sa déplétion conduit à une altération de l'hématopoïèse en augmentant la capacité d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ainsi que la différenciation monocytaire, aux dépens des différenciations granuleuse et érythrocytaire [12]. Les différents modèles de souris knock-out ou hétérozygotes pour Tet2 que nous avons analysés présentent des anomalies similaires de l'hématopoïèse : expansion des CSH, puis développement avec une pénétrance élevée, mais après un délai assez long, d'hémopathies myéloïdes ressemblant à des LMMC, des SMD et des érythroleucémies [22]. Les mutations de TET2 sont retrouvées dans les CSH multipotentes. Elles surviennent précocement dans le développement des hémopathies, entraînant une dominance clonale précédant souvent l'évènement oncogénique responsable du phénotype de la pathologie, comme par



Figure 4. Effet de la déplétion en TET au cours de l'embryogenèse et de la reprogrammation chez l'homme et la souris. Le knock-down ou knock-out des différents membres de la famille TET diminue la capacité de reprogrammation des cellules somatiques adultes, et biaise ou altère la pluripo-tence et le développement embryonnaire chez l'homme et la souris.

exemple la mutation V617F de JAK2 (Janus kinase 2) dans les NMP. Enfin, il faut aussi souligner la présence de mutations de TET2 chez 5 à 6 % des personnes âgées ayant une hématopoïèse clonale, mais sans hémopathie maligne. Ainsi, toutes ces données suggèrent que l'inactivation de TET2 entraîne une expansion clonale des CSH sans hémopathie avérée, état dit « pré-leucémique ». Dans ce contexte, la survenue d'une mutation oncogénique secondaire ferait évoluer l'état pré-leucémique vers un NMP, un SMD ou une LAM. La proportion de ces états pré-leucémiques qui peuvent évoluer vers une hémopathie maligne chronique ou aiguë reste indéterminée. Dans certains cas, les mutations de TET2 peuvent aussi apparaître tardivement au cours de l'évolution de la maladie, y compris au moment de leur transformation, comme dans certains NMP.

Conclusion

L'élucidation de la fonction enzymatique des protéines de la famille TET2 et leurs mutations dans les hémopathies malignes ont permis d'ouvrir un nouveau domaine de recherche. L'implication de ces enzymes dans la déméthylation active du génome a constitué une avancée importante dans la compréhension de la régulation de l'expression génique. Par la suite, ces protéines ont été impliquées dans le contrôle de la pluripotence, le développement, la reprogrammation et la régulation des tissus hématopoïétique et neuronal. Un certain nombre de questions restent en suspens. Quels sont leurs partenaires protéiques ? Comment la déméthylation se déroule-t-elle sans affecter l'intégrité du génome ? Par quels mécanismes la perte de *TET2* engendre-t-elle le développement des hémopathies ? Est-ce simplement en entraînant une hématopoïèse clonale, ou une instabilité génétique et des dérégulations géniques sont-elles également provoquées par la perte de TET ? ♦

SUMMARY

Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis

DNA methylation is associated with a large number of biological processes and mainly concerns the cytosine

Key Revues

SYNTHÈSE

methylation at position 5 (5-mC). An active demethylation mechanism was highlighted in 2009 following the discovery that TET proteins were enzymes implicated in the hydroxylation of 5-mC to 5-hydroxymethyl-cytosine. Simultaneously, other studies showed frequent acquired *TET2* mutations in hematological malignancies and have depicted their role in their pathogenesis. An entire field of research has developed rapidly showing that these proteins are involved in many biological processes.

REMERCIEMENTS

Ce travail est financé par l'Inserm, l'ANR blanc (Épigenome) et l'ANR JCJC (GERMPN)), et l'Association pour la recherche contre le cancer (ARC). L. Scourzic est soutenue par le cancéropôle puis l'ARC, L. Secardin par le DIM Stem pôle, et Emna Mahfoudhi a été financée en partie par une bourse Inserm-direction générale de la recherche scientifique (Tunis).

LIENS D'INTÉRÉT

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

RÉFÉRENCES

- Ono R, Taki T, Taketani T, et al. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). Cancer Res 2002; 62: 4075-80.
- Hu L, Li Z, Cheng J, et al. Crystal structure of TET2-DNA complex: insight into TET-mediated 5mC oxidation. Cell 2013; 155: 1545-55.
- 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.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. Cell 2011; 145: 423-34.
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. Cell 2011; 146: 67-79.
- Morera S, Grin I, Vigouroux A, et al. Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyuracil-containing DNA. Nucleic Acids Res 2012; 40:9917-26.
- Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 2014; 156: 45-68.
- Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. Nat Chem Biol 2014; 10: 574-81.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. Nature 2011; 473: 343-8.
- Huang Y, Chavez L, Chang X, et al. Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tetl and Tet2 in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111: 1361-6.
- Pulakanti K, Pinello L, Stelloh C, et al. Enhancer transcribed RNAs arise from hypomethylated, Tetoccupied genomic regions. Epigenetics 2013; 8: 1303-20.
- 12. Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulo-monocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. Blood 2011; 118: 2551-5.
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. Nat Rev Mol Cell Biol 2013; 14: 341-56.
- Lafaye C, Barbier E, Miscioscia A, et al. DNA binding of the p21 repressor ZBTB2 is inhibited by cytosine hydroxymethylation. Biochem Biophys Res Commun 2014; 446: 341-6.

- Delatte B. L'interaction TET-OGT facilite la transcription en régulant la méthylation de l'histone H. Med Sci (Paris) 2014; 30: 619-21.
- 16. Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. Cell Stem Cell 2013; 13:87-101.
- Ko M, An J, Bandukwala HS, et al. Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. Nature 2013; 497:122-6.
- Arioka Y, Watanabe A, Saito K, et al. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. PLoS One 2012; 7: e45031.
- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell 2010; 18: 553-67.
- Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. Nature 2013; 500: 222-6.
- Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, et al. Tetl is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. Cell Stem Cell 2011; 9:166-75.
- 22. 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.
- 23. Gu TP, Guo F, Yang H, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. Nature 2011; 477: 606-10.
- 24. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Combined deficiency of tetl and tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. Dev Cell 2013; 24: 310-23.
- Dawlaty MM, Breiling A, Le T, et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. Dev Cell 2014; 29: 102-11.
- 26. Langlois T, da Costa Reis Monte Mor B, Lenglet G, et al. TET2 deficiency inhibits mesoderm and hematopoietic differentiation in human embryonic stem cells. Stem Cells 2014; 32: 2084-97.
- Jackson SA, Sridharan R. The nexus of Tet1 and the pluripotency network. Cell Stem Cell 2013; 12: 387-8.
- Wang T, Wu H, Li Y, et al. Subtelomeric hotspots of aberrant 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic modifications during reprogramming to pluripotency. Nat Cell Biol 2013; 15:700-11.
- 29. Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 453-69.
- 30. Kallin EM, Rodriguez-Ubreva J, Christensen J, et al. Tet2 facilitates the derepression of myeloid target genes during CEBPalpha-induced transdifferentiation of pre-B cells. Mol Cell 2012; 48: 266-76.
- Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med 2009; 360: 2289-301.
- Cimmino L, Abdel-Wahab O, Levine RL, et al. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. Cell Stem Cell 2011; 9:193-204.
- Pedrazzini T. Le cœur des ARN non codants : un long chemin à découvrir. Med Sci (Paris) 2015 ; 31 : 261-7.

TIRÉS À PART



Tarifs d'abonnement *m/s* - 2015
Abonnez-vous

 > Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

a médecine/sciences bulletin d'abonnement page 260 dans ce numéro de *m/s*



IV-P53

IV-1- Structure de p53

Le gène *TP53* a été découvert en 1979 (Lane and Crawford 1979) (Linzer and Levine 1979) (DeLeo et al. 1979) et dix ans après il a été identifié comme suppresseur de tumeur (Baker et al. 1989) (Finlay et al. 1989). *TP53* est localisé au niveau du chromosome 17p13.1, s'étend sur 20kb et comprend 11 exons et 10 introns. Chez l'homme, *TP53* code pour une protéine de 393 acides aminés, P53.

P53 est un homotétramère, chaque monomère est constitué de 4 domaines structurels et fonctionnels différents, tous nécessaires pour assurer les différentes fonctions de P53. Le domaine N-terminal, appelé domaine de transactivation (résidus 1-60), un domaine riche en proline (résidus 61-94), un domaine central : le domaine de liaison à l'ADN (résidus 102-292) et un domaine C-terminal (résidus 301-393) qui contient le domaine de tétramérisation (résidus 324-355) et le domaine de régulation (résidus 363-393) (Saha et al. 2015) (Meek 2015) (**Figure 8**).

Le domaine N-terminal : est nécessaire pour assurer la liaison avec les coactivateurs et les corépresseurs de la transcription. Ce domaine est structuré en double hélice de feuillet β et comprend deux domaines adjacents de transactivation, TAD1 et TAD2. Cette région est cruciale pour la liaison à MDM2, une E3 ubiquitine ligase. Ce sont les résidus Phe19, Leu22, Trp23 et Leu26 qui sont les acides aminés clé dans l'interaction de p53 avec MDM2 (Kaar et al. 2010). L'interaction avec MDM2 permet l'ubiquitination de p53 et sa dégradation. Ainsi, de nombreuses études s'intéressent à cette région et développent de petites molécules et des peptides pour inhiber la formation du complexe MDM2-p53.

<u>Le domaine riche en proline</u>: (PRD) comprend 5 motifs de type PXXP (où P=proline et X=n'importe quel acide aminé). Cette région ne semble pas être directement impliquée dans l'activité de transactivation de p53 mais participerait plutôt à la régulation de sa stabilisation (Dornan et al. 2003) et aux mécanismes de répression, d'apoptose et de réponse aux irradiations ionisantes (Campbell et al. 2013).

<u>Le domaine central de P53</u>: (DBD) cette région englobe le domaine de liaison à l'ADN. La formation stable du complexe ADN-P53 est un processus Zn^{2+} -dépendant. Le Zn^{2+} est

coordonné par les résidus Cys176, His179, Cys238 et la Cys242 (Joerger et al. 2004). L'absence de Zn^{2+} entraine l'agrégation de P53 et l'altération de sa structure affectant ainsi la spécificité de la liaison à l'ADN (Duan and Nilsson 2006). Le domaine central est caractérisé par une faible stabilité thermodynamique et cinétique (Canadillas et al. 2006) (Khoo et al. 2009). Selon les données de base des mutations de *TP53* établie par l'International Agency for research of cancer, 95% des mutations de *TP53* sont localisées dans ce domaine (Olivier et al. 2002).

La région C-terminale : renferme des séquences nécessaires pour la localisation nucléaire, et pour la liaison non spécifique à l'ADN, un domaine de tétramérisation et un domaine de régulation. La région régulatrice est soumise à différentes modifications post traductionnelles qui jouent un rôle clé dans le contrôle du renouvellement de p53 et la régulation fine de ses activités (Appella et Anderson 2001) (Carr et al. 2012) (Dai and Gu 2010).



Figure 8: Structure d'un monomère de la protéine P53. P53 est un homotétramère. Chaque monomère est constitué de 4 domaines : le domaine N-terminal comprend deux domaines de transactivation (TAD1 et TAD2), un domaine riche en proline (poly P), un domaine central : le domaine de liaison à l'ADN et un domaine C- terminal qui contient le domaine de tétramérisation (TET) et le domaine de régulation (REG). Adapté de (Meek 2015).

IV-2- Fonctions de P53 :

IV-2-1 Générales :

P53 a été nommé « le gardien du génome » (Lane 1992), ou le « cellular gatekeeper » (Levine 1997) en raison du rôle central qu'il assure dans la coordination des réponses cellulaires aux multiples facteurs de stress cellulaires. P53 est un facteur de transcription qui assure à la fois une activité de transactivation et de transrépression (Beckerman et Prives 2010). P53 module l'expression de centaines de gènes impliqués dans la régulation de processus cellulaire physiologiques comme la prolifération, la division, la survie et la mort cellulaire programmée.
Dans les conditions normales, P53 a une durée de vie courte en raison de son interaction de type rétrocontrôle avec MDM2 et MDM4 qui la dégradent (Hu et al. 2012) (Figure 9A). Cependant, en réponse à un stress induit par de nombreux stimuli comme les dommages de l'ADN ou l'activation des oncogènes, P53 est stabilisée essentiellement par inhibition de sa dégradation ce qui entraine l'augmentation de son niveau d'expression protéique dans la cellule. Une fois stabilisée, p53 induit selon le type et le degré de stimulation l'arrêt du cycle cellulaire, ou la sénescence, ou l'apoptose, ou la réparation de l'ADN, ou le métabolisme cellulaire ou l'autophagie (Figure 9B). Ceci afin d'arrêter la prolifération incontrôlée des cellules et permettre de réparer leur ADN éventuellement endommagé ou bien de les éliminer. P53 joue aussi un rôle dans la régulation du métabolisme cellulaire. Grace à sa capacité à réguler les gènes impliqués dans la respiration cellulaire et le métabolisme intermédiaire, p53 peut réduire le flux à travers les voies de glycolyse et des pentoses phosphates et stimuler la fonction mitochondriale (Vousden and Ryan 2009). Ainsi p53, stimule la phosphorylation oxydative mitochondriale induisant la production de l'ATP et la réduction de synthèse de substrats nécessaires à la prolifération et la division cellulaire. De plus, p53 régule la voie IGF-1/mTOR (Feng and Levine 2010) et donc régule les voies par lesquelles sont contrôlées la prolifération, la survie et le métabolisme de l'énergie.

La protéine suppresseur de tumeur p53 joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité cellulaire en conditions de stress et ceci en contrôlant ses gènes cibles qui régulent l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence, la réparation des dommages de l'ADN et les changements de métabolismes (**Figure 9B**).





Figure 9: Régulation de P53 par MDM2 au repos et en réponse à un stress. (A) Au repos, MDM2 lie P53, l'ubiquitine et induit sa dégradation réprimant ainsi son activité transcriptionnelle. **(B)** En réponse à un stress P53 est stabilisée essentiellement par inhibition de sa dégradation. Une fois transloqué dans le noyau, P53 lie l'ADN et active la transcription de MDM2, son régulateur négatif, et de gènes impliqués dans divers processus comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence et la réparation de l'ADN.

IV-2-2 Rôle de p53 dans l'hématopoïèse :

Dans le système hématopoïétique chez la souris, p53 est préférentiellement exprimée dans les CSH en comparaison avec les progéniteurs myéloïdes y compris le progéniteur (PMyC), le progéniteur (PGM) et le progéniteur (PME) (Liu et al. 2009). Les différents modèles de souris p53 développés comprennent soit des souris knockout ou hétérozygotes pour p53 ou bien knock-in pour un certain nombre de mutants de p53. Toutes ces souris sont viables mais sont très enclines à développer des maladies malignes parfois hématopoïétiques surtout des lymphopathies (Donehower et al. 1992) (Pant et al. 2012). Sur le plan hématologique, les souris p53-/- présentent aussi un défaut lymphoïde au niveau des cellules B matures et une augmentation modérée des granuleux et des macrophages (TeKippe et al. 2003). P53 régule la quiescence et l'autorenouvellement des CSH. L'absence de p53 chez les souris entraîne une augmentation de 2 à 3 fois du nombre de CSH. Toutefois, les CSHs p53-/- perdent leurs propriétés fonctionnelles et leur capacité de reconstitution (Chen et al. 2008) (Liu et al. 2009). Ceci montre que p53 joue un rôle dans le contrôle des CSHs en quiescence et que ces dernières tendent à entrer en prolifération en absence de p53, ce qui explique probablement leur perte de fonction. Ceci a été confirmé avec l'utilisation d'un inhibiteur chimique de p53 : la pifithrin β qui induit la prolifération des CSHs in vivo et in vitro (Leonova et al. 2010). En revanche, des expériences de greffes compétitives ont montré que la moelle de souris p53-/induisait un avantage prolifératif sur la moelle normale, montrant que des progéniteurs ou des facteurs externes pouvait induire ce phénomène (TeKippe et al. 2003). Il a été aussi montré que la suppression de l'activité de p53 facilite la reconstitution hématopoïétique après un traitement cytotoxique (Wlodarski et al. 1998). L'augmentation de la prolifération des CSHs due à l'absence de p53 les prédispose alors à l'accumulation des mutations (Kemp et al. 1994), ce qui explique que les souris p53-/- ou les souris receveuses de cellules hématopoïétiques p53-/- meurent généralement beaucoup plus tôt en raison de tumeurs hématologiques.

En plus de son rôle sur la quiescence et l'autorenouvellement, dans les conditions normales, p53 se comporte comme un anti-oxydant et réduit le taux des espèces réactives oxygénées dans la cellule au repos, induisant ainsi la protection de la CSH contre les mutations, les dommages de l'ADN (Sablina et al. 2005) et le vieillissement (Ito et al. 2006) (**Figure 10**). Ceci expliquerait aussi l'augmentation de l'incidence des hémopathies malignes dans les souris $p53^{+/-}$ et $p53^{-/-}$.



Figure 10: Rôle de P53 au cours de l'hématopoïèse. Dans le système hématopoïétique, p53 est préférentiellement exprimée dans les CSH en comparaison avec les progéniteurs myéloïdes y compris le progéniteur (PMyC), le progéniteur (PGM) et le progéniteur (PME). Il régule la quiescence et l'autorenouvellement des CSH mais joue aussi un rôle de cytoprotecteur et réduit le taux des espèces réactives oxygénées (ROS) dans la cellule au repos, induisant ainsi sa protection contre les dommages de l'ADN, le vieillissement et la mutagenèse. Le niveau d'expression de p53 diminue au cours de l'hématopoïèse afin de permettre la prolifération des progéniteurs et leur différenciation vers les cellules matures.

IV-3 Régulation de p53

Aussi bien en condition normale qu'en condition de stress, p53 est soumis à un contrôle strict par une large gamme de modifications post traductionnelles (MPT). Ces modifications incluent : l'ubiquitination, l'acétylation, la Ser/Thr phosphorylation, la sumoylation et d'autres modifications en fonction du contexte cellulaire. Plus de 36 acides aminés de p53 ont été observés modifiés (Kruse and Gu 2008). Par ailleurs, une publication récente, dans laquelle des modifications de p53 dans une lignée cellulaire standard ont été analysés par spectrométrie de masse, a identifié pas moins de 150 MPT différentes de la protéine, ceci suggèrant que ces modifications sont beaucoup plus étendues et plus complexe que ce qui avait été précédemment publié (DeHart et al. 2014). Ces modifications jouent un rôle important dans la régulation du taux de p53, de son activité, des interactions protéine-protéine, de sa localisation subcellulaire et dans l'activation d'autres voies de signalisation.

IV-3-1 Régulation négative par MDM2 et MDM4

En condition normale, le taux de P53, dans la cellule, est maintenu faible en raison de son ubiquitination et de sa dégradation protéasomale par l'intermédiaire de l'ubiquitine ligase E3, MDM2 (Murine Double Minute2) ou HDM2 pour (Human Double Minute2) (Brooks et Gu 2006) (Ringshausen et al. 2006) (**Figure 9A**). Les résidus lysine localisés au niveau de la région C-terminale de p53 (Lys³⁷⁰, Lys³⁷², Lys³⁷³, Lys³⁸¹, Lys³⁸² and Lys³⁸⁶) constituent les cibles majeures du processus d'ubiquitination (Rodriguez et al. 2000). Néanmoins, il a été reporté que MDM2 est capable d'ubiquitiner aussi d'autres résidus lysine de la protéine P53 (Krummel et al. 2005). L'augmentation du taux de MDM2 dans la cellule induit la polyubiquitination de P53 et entraine sa dégradation alors qu'une faible quantité de MDM2, induit la mono-ubiquitination de P53 ce qui facilite son export nucléaire (Li et al. 2003). MDM2 et P53 agissent dans un boucle de rétrocontrôle dans lequel P53 transactive l'expression du gène *MDM2* et donc maintient ou augmente la quantité de son propre régulateur négatif (Wu et al. 1993) (**Figure 9B**). L'augmentation de l'expression de MDM2 suite à l'activation de P53 est essentielle pour restaurer le taux homéostatique de P53 après la disparition du signal inducteur.

MDM4 (ou MDMX), est un homologue structurel de MDM2. Bien que MDM4 soit dépourvu d'activité ubiquitine ligase intrinsèque, il est capable de former un dimère avec MDM2 pour activer l'ubiquitination et la dégradation de P53 (Linares et al. 2003) et (Gu et al. 2002). Comme MDM2, MDM4 peut se lier au domaine de transactivation de P53 et réprimer son activité transcriptionnelle (Shvarts et al. 1996). Le recyclage de MDM4 et MDM2 se fait par l'intermédiaire de MDM2 (Chen et al. 2005) (Pereg et al. 2005), mais aussi par d'autres protéines comme PCAF [p300/CBP (cAMP-response-element-binding protein-binding protein)-associated factor] (Linares et al. 2007).

Une fois que P53 a effectué son activité transcriptionnelle, MDM2 et MDM4 dissocient les molécules de P53 liés à la chromatine et recrutent une histone déacétylase qui déacétyle P53

et les histones proches (Kruse and Gu 2009). MDM2 peut aussi affecter la structure du domaine central de P53 inhibant ainsi son interaction spécifique avec l'ADN (Cross et al. 2011). De plus, en favorisant la monoubiquitination de P53, MDM2 peut démasquer un signal d'export nucléaire sur P53 et provoquer sa translocation vers le cytoplasme (Carter et al. 2007). D'autres études montrent que MDM2 est capable d'inhiber la traduction de l'ARNm de *P53* indirectement en induisant la dégradation de la protéine ribosomale L26, un activateur de la traduction de *TP53* (Ofir-Rosenfeld et al. 2008) (Biderman et al. 2012). Toutes ces activités agissent en coordination et en complémentarité afin de maintenir un taux homéostatique de P53. Ainsi, l'ubiquitination joue un rôle majeur pour contrôler la stabilité de P53, de sa localisation cellulaire et de son activité transcriptionnelle *vs* non transcriptionnelle.

IV-3-2 Rôle de MDM2 et MDM4 dans l'hématopoïèse :

Mdm2 et Mdm4 sont 2 gènes essentiels dans le développement car les souris knock out de l'un ou de l'autre sont létales au stade embryonnaire, indiquant qu'il n'y a pas de redondance entre ces 2 gènes. De plus cette létalité est complètement abrogée par la délétion de p53. Les souris KO de Mdm2 meurent avant l'implantation à cause d'une apoptose massive (Montes de Oca Luna et al. 1995) (Jones et al. 1995). Les souris KO de Mdm4 meurent également en cours de gestation à cause de défaut de prolifération. Elles présentent des anomalies du développement neuronal et de l'érythropoïèse fœtale (Parant et al. 2001). En ce qui concerne les souris doublement hétérozygotes pour Mdm2 et Mdm4, elles présentent également une létalité embryonnaire avec des troubles neuronaux ainsi que de l'hématopoïèse en particulier une hypoplasie de la moelle et une atrophie de la rate et du thymus ainsi qu'une diminution de toutes les cellules sanguines (Terzian et al. 2007). Enfin, les knock out conditionnels de Mdm2 ou Mdm4 dans la lignée érythroblastiques montrent que Mdm2 est essentiel pour l'érythopoïèse primitive avec aucune naissance alors que Mdm4 est plutôt impliqué dans la différenciation érythroblastique définitive (Maetens et al. 2007). A l'inverse les souris transgéniques Mdm2 ou Mdm4 prédisposent à un certains nombre de cancers en particulier des sarcomes (Jones et al. 1998) (Xiong et al. 2010).

IV-4 Les mutations de P53 ou les amplifications de MDM2 ou MDM4 dans les cancers

L'altération de p53 est le dénominateur commun de nombreux cancers. En effet, plus de 50%

des tumeurs humaines présentent des mutations du gène TP53. Plus de 80% des mutations somatiques et germinales de TP53 sont des mutations faux sens qui conduisent à la synthèse d'une protéine mutée stable qui s'accumule dans le noyau des cellules tumorales (Soussi et Wiman 2015). Plus de 90% des mutations de TP53 sont localisées au niveau du domaine central de la protéine (100 à 300) avec des zones de hot spot. Dans cette région, chaque résidu a été trouvé muté au moins 5 fois dans différentes tumeurs et plus de 2000 fois pour les mutants dans les régions de « hot spot » (Leroy et al. 2014) (Soussi 2011). Une étude récente à montré que 6 mutations « hot spot » sur les résidus (R175, G245, R248, R249, R273 et R282) de p53 sont classées parmi les 15 mutations les plus observées dans les cancers humains (Soussi et Wiman 2015). De façon plus générale, les mutants P53 sont toujours parmi les 10 variants les plus fréquents sauf pour le cancer des reins et les LAM. La stabilisation et l'accumulation de la protéine P53 dans les cellules tumorales est une caractéristique des mutants de P53. Ces mutations sont de 2 types : soit des mutations affectant l'assemblage de P53, soit des mutations dans les régions de liaison à l'ADN. De nombreuses études sur des lignées cellulaires tumorales ont montré la présence de mutations *p53* dont la protéine était stabilisée due à une absence totale d'ubiquitination (Li et al. 2011) (Soussi et Wiman 2015).

Des mutations hétérozygotes et germinales de *TP53* ont aussi été identifiées dans le syndrome de Li-Fraumeni. Ce syndrome prédispose à une très grande variété de cancers notamment des sarcomes musculaires, osseux, des tissus mous, des tumeurs cérébrales, des mélanomes, des cancers du sein et de façon moins fréquente des leucémies et des lymphomes.

L'amplification des gènes *MDM2* et *MDM4* ou la surexpresssion de *MDM4* a été observée dans un certain nombre de cancers y compris le cancer colorectal *P53*-wild type et dans le cancer de l'œsophage (Shibagaki et al. 1995) (Forslund et al. 2008). MDM2 est particulièrement surexprimé dans le cancer du sein, les mélanomes et certains sarcomes, alors que MDM4 est fréquemment surexprimé dans le cancer du sein, les mélanomes et le cancer colorectal (Li et Lozano 2013) et (Wade et al. 2013). De plus, la quantité de MDM4 semble avoir un effet sur la sensibilisation aux effets de la chimiothérapie dans les réponses apoptotiques dépendantes de P53 (Wade et al. 2013) (Yu et al. 2014). La surexpression des protéines MDM2 et de MDM4 avec ou sans l'augmentation de nombre de copies est observée dans les cancers sévères et plus fréquemment dans les tumeurs *P53* non mutées (Wade et al. 2013). En plus de l'amplification, les mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels

ont été aussi proposés comme pouvant être à l'origine de la surexpression des protéines MDM2 et MDM4 (Fahraeus et Olivares-Illana 2014). Les mutations de *TP53* et les amplifications de *MDM2* sont mutuellement exclusives et ont un intérêt particulier dans la sélection des patient pour le traitement visant à réactiver la P53 (Ito et al. 2011).

IV-5 Les mutations de TP53 dans les hémopathies malignes

Contrairement aux tumeurs solides, les hémopathies malignes présentent une faible incidence des altérations du gène *TP53* (10%-20%). Les mutations de *TP53* y compris les délétions ont été observées dans la leucémie lymphocytaire chronique (LLC), le lymphome de la zone marginale, le lymphome folliculaire et le lymphome diffus large des cellules B. *TP53* est muté dans 10-20% des cas de LLC, 3-8% des cas de LAM, moins de 3% de LAL et 10-12% des cas de myélome multiple (MM). Dans les hémopathies malignes, les aberrations du gène *TP53* (mutation ou délétion) sont à un haut risque, associées à un mauvais pronostic et la résistance au traitement (Pekova et al. 2011) (Nahi et al. 2008) (Agirre et al. 2003) (Avet-Loiseau et al. 1999) (Chng et al. 2007) (Chang et al. 2005) (Reece et al. 2009) (Xu-Monette et al. 2012) (Preudhomme et Fenaux 1997) (Krug et al. 2002). En effet, la perte de *P53* constitue un marqueur prognostic de la LAM (Oscier et al. 2010).

Dans les NMP, les mutations du gène *TP53* sont rares en phase chronique, toutefois cette voie est très dérégulée (Nakatake et al. 2012) suggérant qu'elle est importante pour le développmeent de la maladie. Les mutations de *TP53* sont généralement associées à la progression vers la myelofibrose et la leucémie aiguë secondaire. Il a été montré que certains patients en phase chronique portent des mutations somatiques de *TP53* durant plusieurs années représentées avec une faible charge allélique qui augmente rapidement au cours de la transformation leucémique suite à une perte d'hétérozygotie et un envahissement de l'hématopoïèse par le clone (Lundberg et al. 2014). En revanche, les anomalies de l'axe MDM4/P53 sont particulièrement fréquentes dans les leucémies post-NMP. En effet il a été trouvé des mutations de *TP53* dans 28% des cas avec 20% de mutations bialléliques (Harutyunyan et al. 2011). Bien que ces mutations aient pour conséquence des changements d'acides aminés situés dans le domaine central de P53, elles ne correspondent pas aux 6 résidus retrouvés dans les cancers solides (Harutyunyan et al. 2011) (Rampal et al. 2014). Enfin, récemment la perte de *TP53* a été montré comme accélérant les NMP dans un modèle rétroviral de souris surexprimant JAK2V617F et entraîne avec une pénétrance élevée une maladie proche de la leucémie (Rampal et al. 2014).

En présence de TP53 wild-type, d'autres mécanismes peuvent altérer l'expression et l'activation de P53. Ces mécanismes impliquent l'augmentation de l'expression des régulateurs négatifs de P53 comme MDM2 et MDM4. Chez l'homme la surexpression de MDM2 a été observée dans la leucémie lymphocytaire chronique (LLC), le lymphome de la zone marginale, le lymphome folliculaire et le lymphome diffus large des cellules B, le lymphome de Burkitt, la LAM, la leucémie aiguë lymphoblastique et le myélome multiple (Xu-Monette et al. 2012) (Preudhomme and Fenaux 1997) (Krug et al. 2002) (Oscier et al. 2010) (Post et al. 2010). Nakatake et al ont montré que la mutation JAK2V617F altère la réponse de P53 aux dommages de l'ADN via la surexpression de l'antigène La qui induit la surexpression de MDM2 (Nakatake et al. 2012). Il a été aussi reporté que le taux de MDM2 est augmenté dans les cellules primaires CD34⁺ de patients PV et que le taux de P53 est réduit dans les cellules CD34⁺ de patients PV et ceux MFP (Nakatake et al. 2012) (Lu and Hoffman 2012). L'amplification du gène MDM4, conséquence de l'amplification du chromosome 1q, a été décrite dans 20% des patients atteints de leucémies secondaires à des NMP (Harutyunyan et al. 2011). Ainsi, l'amplification de MDM4 est mutuellement exclusive des mutations TP53, ce phénomène est aussi observé dans les tumeurs solides (Veerakumarasivam et al. 2008). Au total, ceci montre que les anomalies de l'axe P53/MDM4 dans les LAM post-NMP sont très fréquentes (50%) et contrastent avec les données sur les LAM de novo dans lesquelles les mutations de TP53 sont peu fréquentes. Ceci montre que cet axe est important pour la transformation des NMP. La surexpression de MDM4 a été aussi reportée dans la LLC, qui ne répond pas ou peu à la Nutline (inhibiteur de MDM2), suggérant ainsi le rôle important que joue MDM4 dans l'inhibition de P53 et par conséquent dans la transformation dans les systèmes hématopoïétiques (Bo et al. 2010).

IV-6 Implication de P53 dans les maladies hématologiques comme les ribosomapathies

Le stress ribosomique résulte d'un défaut de biogenèse des ribosomes ou bien d'un défaut de fonction des ribosomes. Ceci est la cause de nombreuses maladies hématologiques comme l'anémie de Blackfan-Diamond (ABD) ou le syndrome 5q- ou d'autres syndromes avec des atteintes médullaires. Dans toutes ces pathologies, il a été montré que l'activation de P53 est en partie responsable des phénotypes. Par exemple dans l'ABD, un certains nombre de gènes

codant pour des protéines ribosomiques sont mutés comme *RPL19* puis *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *RPS26*, *RPS7*, *RPL5*, *RPL11*, et *RPL35*. *RPS14* fait partie de la région minima délétée dans le syndrome 5q-. Des anémies ont été identifiées dans ces deux types de maladies. Le défaut de *RPL19* ou *RPS14* par une stratégie shARN a pour conséquence une élévation de P53 spécifiquement dans le lignage érythroblastique et induit un défaut de différenciation (Dutt et al. 2011). Ceci est probablement dû à une interaction forte de MDM2 avec des protéines ribosomales comme par exemple RPL11 qui empêche la dégradation de p53 (Dutt et al. 2011). Ainsi la suractivation de P53 dans ce contexte semble être délétère pour l'érythropoïèse et mime les phénotypes des souris KO *Mdm2* ou/*Mdm4*.

IV-7 Implication de p53 en clinique dans les hémopathies myéloides malignes

Chez l'homme, bien que la moitié des cancers présente une protéine P53 wild-type, l'expression et les fonctions de celle-ci sont réduites ou abolies par d'autres mécanismes comme l'augmentation de l'expression de l'oncogène MDM2 qui est un régulateur négatif de P53. MDM2 se lie à la région N-terminale de p53 inhibant son interaction avec la machinerie transcriptionnelle et induisant sa dégradation protéosomale. Ainsi, l'interaction p53-MDM2 constitue une cible thérapeutique et ces dernières années, des efforts importants ont été faits pour évaluer l'efficacité de l'inhibition de MDM2 dans le traitement des cancers. Différentes stratégies ont été identifiées comme les oligonucléotides anti-sens, les ARN interférants, ou les composés naturels comme le Ginsenoside et le curcumin, capables d'entrainer la dérégulation négative de MDM2 (Nag et al. 2014). Actuellement, un grand nombre d'antagonistes de la liaison MDM2/P53 a été développé.

IV-7-1 Les petites molécules inhibitrices de l'interaction p53-MDM2

Les antagonistes de MDM2 utilisés dans les essais cliniques sont des inhibiteurs de l'interaction MDM2-P53 (**Figure 11**). Le premier produit développé a été la Nutline, une molécule cis-imidazoline capable de lier et de masquer la poche de liaison de P53 à la protéine MDM2 induisant ainsi la stabilisation de P53. La découverte de la Nutline a stimulé de très nombreux intérêts pour le développement d'autres petites molécules inhibitrices de l'interaction P53-MDM2. Jusqu'ici, les études menées sur l'efficacité de ces drogues dans le traitement des cancers restent encore à des niveaux précliniques ou en essais cliniques. Les

petites molécules antagonistes de MDM2, dont l'efficacité a été testée sur des modèles d'hémopathies malignes, sont la Nutline-3, le MI-219, le RG7112 et le SAR405838.

a. La Nutline

C'est l'une des molécules activatrices de P53 les plus prometteuses (la forme active de la Nutline est la Nutline-3 et en particulier l'énantiomère Nutline-3A, alors que l'énantiomère Nutline-3B est inactif), antagoniste très spécifique et non génotoxique de MDM2 qui fonctionne comme un compétiteur de l'interaction P53-MDM2. La Nutline-3 est un analogue cis-imidazoline qui se lie à MDM2 au niveau de la poche de liaison de P53 inhibant sa dégradation (Vassilev et al. 2004). Dans des études précliniques, la Nutline-3 montre un grand potentiel dans le traitement des cancers humains avec une P53 normale (Tovar et al. 2006) (Xia et al. 2008) (Shangary and Wang 2008). L'efficacité anti-tumorale des Nutlines a été montrée in vitro, par l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, dans différentes tumeurs solides ainsi que dans des lignées cellulaire leucémiques exprimant une protéine P53 normale (Tovar et al. 2006) et (Kojima et al. 2005). Les résultats des effets de la Nutline-3 sur la LLC diffèrent selon les études, alors que Bixby et al confirment avec des études in vitro une meilleure réponse des patients atteints de LLC portant un P53 normal (Bixby et al. 2008), un autre groupe montre dans une étude similaire que l'effet de la Nutline-3 seule était plutôt modeste mais plus efficace en combinaison avec d'autres agents cytotoxiques (Coll-Mulet et al. 2006). Dans des cellules isolées de patients LAM, la Nutline induit l'apoptose via l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 et via la perméabilisation mitochondriale indépendante de la transcription (Kojima et al. 2005). Dans les NMP, il a été montré que la Nutline-3 d'une part abroge la pousse spontanée de lignées cellulaires exprimant JAK2V617F (Nakatake et al. 2012) et d'autre part active P53 et déclenche l'apoptose dans les cellules primaires CD34⁺ de patients atteints de PV (Lu et al. 2012). La même équipe a reporté que la combinaison d'une faible dose d'interferon Pegylé IFNa 2a avec la Nutline-3 induit l'apoptose des cellules PV CD34⁺ et inhibe significativement (à 50%) la formation de colonies d'érythroblastes mutées pour JAK2V617F dans les PV (Lu et al. 2012).

b. *Le MI-219*

Le MI-219 est un antagoniste de MDM2 qui appartient à la famille des spiro-oxindoles qui a été développé par Sanofi-Aventis. Il se lie à MDM2 avec une affinité 7 fois plus élevée que

celle de la Nutline-3. En effet, contrairement à la Nutline qui imite 3 résidus clé de P53 impliqué dans la liaison à MDM2 (Phe19, Trp23 and Leu26), le MI-219 imite 4 résidus (Phe 19, Leu22, Trp23 and Leu26) (Shangary, PNAS, 2008). Ces résidus forment une liaison hydrogène et des interactions hydrophobes plus optimales avec MDM2 ce qui explique la plus grande affinité pour MDM2. Le MI-219 et la Nutline-3 ont chacun des potentiels de liaison à MDM2 500 fois plus important que celui du peptide naturel correspondant à P53 (Mohammad et al. 2009).

MI-219 active les voies P53 et inhibe sélectivement la prolifération cellulaire dans des lignées cellulaires avec une P53 normale. L'activité anti-tumorale de MI-219 a été décrite *in vitro* pour des cellules provenant de LAM (Long et al. 2010), de LMC (Peterson et al. 2011) et de lymphome de type B (Sosin et al. 2012). Dans une étude menée sur l'activité anti-tumorale du MI-219 sur des cellules de patients ou de lignées cellulaires de lymphome, il a été montré que le MI-219 agit en altérant la fonction de MDM2 et ceci en augmentant son auto-ubiquitination et sa dégradation. Ceci suggère que les divers inhibiteurs de MDM2 suscitent d'autres évènements moléculaires qui dépassent la dissociation p53-MDM2 et qui pourraient être d'une importance thérapeutique (Sosin et al. 2012).

Bien que le MI-219 montre une efficacité anti tumorale *in vivo* et *in vitro* et est bien toléré comme l'a montré l'évaluation de la toxicité chez les animaux, cette drogue n'est pas adaptée pour le développement clinique. En effet, une activité anti-tumorale complète de MI-219 nécessite une forte dose (300 mg/kg 2 fois par jour).

c. Le RG1172

RG7112 est une molécule développée par Roche oralement biactive, résistante à l'oxydation. C'est le premier membre de la famille des Nutlines qui a été évalué cliniquement dans différentes étapes d'une phase I. L'activation de P53 en réponse à l'administration de RG7112 a été reportée dans trois études cliniques différentes.

Des études précliniques chez la souris ont montré que l'administration orale de RG7112 à des souris nudes portant des xénogreffes de tumeurs humaines entraîne une inhibition et une régression de la tumeur de façon dose-dépendante à des concentrations non toxiques (Tovar et al. 2013). En revanche, il a été montré que l'administration de RG7112 à des rats et des singes abouti à une thrombocytopénie sévère avec une diminution du nombre des globules blancs et dans une moindre mesure du taux d'hémoglobine (Iancu-Rubin et al. 2014). L'activité anti-

tumorale de RG7112 a été évaluée dans différents essais cliniques de type phase 1 sur des tumeurs solides et des d'hémopathies malignes (Andreeff et al. 2015), (Patnaik et al. 2015), (Ray-Coquard et al. 2012). Cependant, les patients traités avec RG7112 montrent une toxicité majeure hématologique, particulièrement, il induit des thrombocytopénies, une toxicité qui limite l'augmentation de la dose (Ray-Coquard et al. 2012).

Dans des études *in vitro*, RG7112 réduit la formation des colonies de progéniteurs CFU-GM et BFU-E des patients atteints de PV de façon dose dépendante. De plus, comme en association avec la Nutline-3, la combinaison de faibles doses de RG7112 avec le Peg-IFN α 2a potentialise significativement le ciblage des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules souches particulièrement ceux porteurs de la mutation JAK2V617F dans les patients atteints de PV et de MF (Lu et al. 2014). Ceci se faisant à la fois par une induction de la transcription de *P53* et par la stabilisation de la protéine. Ainsi, le RG7112 pourrait être intéressant à utiliser en clinique en combinaison avec Peg-IFN α 2a pour mettre en rémission un plus grand nombre de patients (actuellement d'environ 30%) ou pour accélérer la rémission.

d. Le SAR405838

L'optimisation du MI-219 par Sanofi-Aventis a abouti au développement du SAR405838 (MI-77301), qui est plus de 10 fois plus puissant que le MI-219 pour la liaison à MDM2 et donc pour l'activation de P53 (plus forte et plus soutenue) dans les cellules tumorales qui expriment une protéine P53 normale (Wang et al. 2014). L'étude de la structure cristallographique de l'interaction de cette molécule avec MDM2 montre que, comme la Nutline, le SAR405838 imite les trois acides aminés essentiels de P53 responsable de l'interaction à MDM2 (Phe19, Trp23, and Leu26) mais assure en plus d'autres interactions. En effet, la région N-terminale de MDM2 (résidus 10-18) se replie, ce qui a pour conséquence d'induire des interactions fortes avec le SAR405838 via les acides aminés Val14 et Thr16 qui stabilisent le complexe, et qui ne sont pas normalement impliqués dans l'interaction physiologique P53-MDM2 (Kussie et al. 1996) et dans l'interaction Nutline-MDM2.

Le SAR405838 a une bonne stabilité chimique en solution, évitant ainsi le problème d'isomérisation associé à certains inhibiteurs de MDM2 de la famille des spiro-oxindoles comme le MI-888 (Zhao et al. 2013) mais aussi une bonne pharmacocinétique orale chez les souris, les rats et les chiens (Wang et al. 2014).

Les résultats préliminaires ont montré que le SAR405838 induit l'apoptose et/ ou l'arrêt du cycle cellulaire de façon dépendante de P53 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses wild-type pour p53 : RS4;11 (modèle de leucémie aiguë), LNCaP (modèle de cancer de prostate), HCT-116 (modèle de cancer du colon) mais aussi dans la lignée SJSA-1 (modèle d'ostéosarcome) qui est caractérisée par une protéine p53 normale mais par une amplification du gène *MDM2* (Wang et al. 2014). Cependant, le SAR405838 n'induit aucun effet sur le l'expression des protéines p21, MDM2 et PUMA dans les lignées cellulaires avec mutation ou délétion de *TP53*.

En ce qui concerne son efficacité anti-tumorale, les études préliminaires ont rapporté que le SAR405838 montre une forte activité antitumorale dans des modèles murins de xénogreffe de différents types de tumeurs avec une P53 normale et sans amplification du gène MDM2. En effet, cette drogue induit de façon dose dépendante : une régression tumorale complète dans le modèle de xénogreffe de leucémie aiguë (RS4;11), une régression tumorale partielle (80%) dans le modèle de xénogreffe de cancer de prostate (LNCaP) et une inhibition complète de la prolifération tumorale dans le modèle de cancer du colon (HCT-116). La régression tumorale observée corrèle avec la capacité du SAR405838 à induire une forte apoptose dans les tumeurs. Ceci a suggéré que SAR405838 pouvait avoir un potentiel thérapeutique dans le traitement des cancers humains portant une P53 normale et sans amplification du gène MDM2. En revanche, le SAR405838 a aussi entrainé la régression complète et durable des tumeurs dans le modèle de xénogreffe avec la lignée SJSA-1. Sachant que celle ci présente une amplification du gène MDM2, le SAR405838 pourrait également contrecarrer de grandes quantités de MDM2 probablement du à la puissance de la molécule. Il est à noter qu'à la fois le MI-219, la Nutline-3a et le RG-7112, ont échoué à induire une régression tumorale complète dans ce modèle.

Grace à ces résultats, le SAR405838 a été sélectionné pour le développement clinique et est actuellement en essais clinique de phase I. Comme pour le RG7112, le SAR405838 montre une toxicité hématopoïétique avec thrombocytopénie réversible (Wang et al. 2014).

Cependant, récemment, une étude a montré que les lignées cellulaires de leucémie aiguë (RS4;11 et MV4;11), traitées par le SAR405838 *in vivo* ou *in vitro* sont devenues résistantes au traitement en raison d'acquisitions de mutations de *TP53* (Hoffman-Luca et al. 2015). Ce phénomène a été déjà observé avec la Nutline-3. En effet, des lignées cellulaires cancéreuses

traitées longtemps avec la Nutline-3 ont acquis des mutations inactivatrices de *TP53* qui ont rendu la P53 non fonctionnelle et ont par conséquent induit une forte résistance à la drogue (Aziz et al. 2011) (Michaelis et al. 2011). L'étude de cette résistance *in vivo* (xénogreffe) et in *vitro* (culture cellulaire) en utilisant la lignée cellulaire SJSA-1 comme modèle suggère que les mécanismes d'acquisition de la résistance pour une même drogue peuvent être très différents entre *in vivo* et *in vitro* (Hoffman-Luca et al. 2015).



Figure 11: Régulation de P53 par les antagonistes de MDM2. En présence d'un antagoniste de MDM2 celui-ci mime la liaison de P53 à sa poche au niveau de MDM2 via des résidus clé et inhibe l'interaction P53-MDM2 induisant ainsi la stabilisation de P53 et son activité transcriptionnelle.

OBJECTIFS DU TRAVAIL:

Le laboratoire au sein duquel j'ai effectué ma thèse travaille sur l'hématopoïèse normale et pathologique en particulier des néoplasmes myéloprolifératifs. Ainsi, je me suis centré sur la fonction de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et TP53 dans le contexte des cellules hématopoïétiques.

Les objectifs principaux de ma thèse ont été de deux ordres :

Le premier objectif a consisté à étudier l'impact de la génération des 5hydroxymethylcytosine (5-hmC) sur l'instabilité génétique.

TET2 est une déméthylase qui convertit consécutivement les 5-methylcytosine (5-mC) en 5hydroxymethylcytosine (5-hmC), 5-formylcytosine (5-fC), et 5-carboxylcytosine (5-caC). TET2 induit, ainsi, la déméthylation active et la substitution des 5-fC et 5-caC par une cytosine non modifiée via la voie d'excision de bases (BER) initiée par la thymidine ADN glycosylase (TDG). La réparation des bases modifiées *via* la voie BER induit la génération d'intermédiaires de réparation comme les sites apuriniques/apyrimidiques (AP) et les cassures simple brin qui sont mutagènes et génotoxiques pour la cellule. Ainsi, nous avons étudié l'effet des 5-hmC sur la progression du cycle cellulaire, l'instabilité chromosomique et des centromères ainsi que sur la mutagenèse en présence de Tdg ou non.

Le second objectif a consisté à étudier le rôle de la stabilisation de P53 par des antagonistes de MDM2 dans l'hématopoïèse.

P53 est un suppresseur de tumeur strictement régulé *in vivo*. Dans la cellule au repos, p53 est peu exprimé à cause de son ubiquitination par MDM2 et de sa dégradation par la machinerie proteosomale 26s. En revanche, en réponse à des stress cellulaires, P53 est stabilisé et activé suite à la dégradation de MDM2. Chez l'homme, *TP53* est muté dans la moitié des tumeurs. Dans l'autre moitié, son activité est altérée, entre autre, par la surexpression de son régulateur négatif MDM2. Ainsi, la réactivation de p53, par altération de l'interaction p53-MDM2 dans les tumeurs qui expriment une protéine p53 normale constitue une approche thérapeutique. Cependant, l'évaluation clinique des drogues utilisées à cette fin a révélé une cytotoxicité hématopoïétique caractérisée surtout par une thrombocytopénie sévère. Dans ce contexte, nous avons étudié, en utilisant différents antagonistes de MDM2, en particulier le SAR405838, l'effet de la stabilisation de p53 sur la survie et la différenciation cellulaire au

cours de l'hématopoïèse y compris sur les stades précoces et tardifs de la différenciation mégacaryocytaire.

RESULTATS

RESULTATS 1 :

La surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5hmC induit une instabilité génétique et augmente la mutagenèse en absence de Tdg

Contexte et objectifs du travail :

TET2 est un suppresseur de tumeur qui est impliqué dans la déméthylation active de la cytosine méthylée. Le gène TET2 comprend 11 exons sur 150kb et est exprimé de façon ubiquitaire. La protéine TET2 appartient à une famille de trois membres dont TET1 et TET3. Les protéines de la famille TET (TET1, 2 and 3) partagent deux régions très conservées, une au centre de la protéine et l'autre à l'extrémité C-terminale. Cette dernière région présente la structure en double chaîne d'hélice β (DSBH) des oxygénases dépendante du Fe(II) et de l'oxoglutarate (2OG) qui catalyse la conversion de la 5-methylcytosine (5-mC) dans l'ADN en 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) (Ko et al. 2010) (Tahiliani et al. 2009). Les 5-hmC ont été principalement identifiées dans les cellules souches embryonnaires et le cerveau (Tahiliani et al. 2009) (Kriaucionis and Heintz 2009), mais elles sont présentes dans tous les types cellulaires. Les 5-hmC peuvent être déaminées par les cytidines déaminases de la famille AID/APOBEC pour générer les 5-hydroxymethyluracil (5-hmU) qui sont à leur tour excisées par la thymidine DNA glycosylase (TDG) mais aussi par les protéines methylbinding protein 4 (MBD4) et single-strand specific monofunctional uracil-DNA glycosylase 1 (SMUG1) (Cortellino et al. 2011) (Morera et al. 2012) et ensuite substituée par une cytosine non modifiée via la voie de réparation par excision de base (BER) (Krokan et Bjoras 2013). Les protéines TET oxydent itérativement les résidus 5-hmC en 5-formylcytosine (5-fC) and 5carboxycytosine (5-caC) (He et al. 2011) (Ito et al. 2011). Ces métabolites sont moins abondants que les 5-hmC dans le génome. Ceci est du au fait qu'elles sont générées de façon moins actives et sont pris en charge par des enzymes spécifiques comme TDG et d'éventuelles décarboxylases et déformylases (Wu and Zhang 2014). Récemment, il a été reporté que les protéines TET hydroxylent la thymine en 5-hmU (Pfaffeneder et al. 2014). Chez l'homme, TDG excise avec haute efficacité les résidus 5-fC, 5-caC et 5-hmU dans le contexte CpG, ce qui montre l'implication directe du BER dans le mécanisme de déméthylation active de l'ADN et qui fait intervenir les protéines TET/ AID ou APOBEC (He et al. 2011) (Maiti et Drohat 2011).

Dans ce contexte, la question qui se pose est de savoir si les processus de l'élimination active des 5-mC et leur substitution par des cytosines non modifiées et qui impliquent les protéines TET et les protéines de la voie BER ne pourraient pas avoir un impact sur la stabilité génomique de la cellule. En effet, cette déméthylation active est accompagnée de la génération d'intermédiaires de la réparation de l'ADN qui peuvent être mutagènes et génotoxiques comme les bases oxydées et déaminées, les sites abasiques, les cassures simple brin et l'implication d'une ADN polymérase β dite « infidèle ». Ainsi, l'objectif de ce projet est d'étudier le rôle des 5-hmC générées par TET2 sur l'instabilité génétique et la mutagénèse (**Figure 12**).



Figure 12 : Hypothèse du projet. TET2 induit la conversion des 5-mC en 5-hmC puis en 5-fC et 5-caC. Les 5-hmC sont ensuite déaminées par les déaminasse de la famille des AID/APOBEC en 5-hmU. Les 5-hmU, 5-fC, 5-caC sont des métabolites reconnus et excisés par TDG. La surexpression de TET2 pourrait induire l'augmentation de ces bases modifiées, des sites apurinique/apyrimidique (AP) et des cassures de l'ADN conduisant à une instabilité génétique. L'absence de TDG pourrait induire l'accumulation des bases modifiées (5-hmU, 5-fC et 5-caC) et être à l'origine d'une augmentation de la mutagenèse.

Résultats :

Pour répondre à cette question, nous avons construit des lignées cellulaires de souris (Ba/F3-EPOR) et humaine (UT-7) exprimant des vecteurs inductibles par la doxycycline codant pour TET2 sauvage (TET2 WT), ou un mutant catalytique tronqué au niveau du résidu 1514 (TET2*) ou bien un deuxième mutant catalytique avec deux mutations ponctuelles H1382Y et D1384A (TET2HxD). L'expression au niveau transcriptionnel (ARNm) et protéique de TET2 a été vérifié pour chacune des lignées. Nous avons ensuite confirmé

l'élévation des 5-hmC par dot blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre les 5-hmC, en présence de la surexpression de TET2 WT. En revanche les mutants catalytiques ne présentent pas d'effet sur le niveau des 5-hmC.

Nous avons ensuite étudié l'effet de TET2 et de l'augmentation des 5-hmC sur la progression du cycle cellulaire. Il apparaît après marquage au Hoechst que la surexpression de TET2 induit un ralentissement du cycle cellulaire avec une augmentation des cellules en phase G1 et début de la phase S. Ceci a été observé uniquement en présence de la surexpression de TET2 WT à la fois dans les cellules UT7 et Ba/F3 mais pas avec les mutants. Ces résultats ont été confirmés dans les cellules Ba/F3 par une technique d'incorporation au BrdU qui mesure précisément les cellules qui rentrent en phase S. Ainsi nous avons pu préciser que la surexpression de TET2 WT induit deux points de contrôles : un en G1/S et un autre à l'intérieur de la phase S qui peuvent refléter un ralentissement du cycle cellulaire. Cette dérégulation de la progression du cycle cellulaire n'était pas associée avec diminution de la prolifération cellulaire ou avec l'apoptose.

Suite à ces résultats, nous avons étudié l'impact de l'augmentation des 5-hmC induite par TET2 sur l'instabilité des chromosomes dans les cellules Ba/F3. Nous avons trouvé une aneuploïdie accrue significative en présence de la surexpression de TET2 WT en comparaison avec les cellules contrôles ou les mutants catalytiques de TET2. Cette aneuploïdie n'était pas associée à une augmentation des échanges de chromatides sœurs qui est le résultat du mécanisme de recombinaison homologue. Nous avons aussi vérifié le nombre de centrosomes en métaphase dans ces lignées, par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti- γ tubuline, et nous avons observé que l'instabilité chromosomique détectée dans la lignée TET2 WT est corrélée à une instabilité du nombre de centrosomes. Aucune aberration centrosomique n'a été observée dans les cellules contrôles ou les mutants TET2HxD.

Afin de rechercher d'éventuels dommages de type cassure des brins de l'ADN et qui pourraient expliquer le phénomène observé, nous avons regardé le niveau de la protéine γ -H2AX phosphorylé (γ -H2AX) par western blot ainsi que la présence des foyers γ -H2AX dans les cellules par immunoflorescence, en utilisant un anticorps spécifique. Aucune différence n'a été observée dans les cellules TET2 WT par rapport aux cellules contrôles.

Comme les 5-hmC sont réparées et substituées par une cytosine non modifiée *via* le mécanisme de BER initié par la DNA glycosylase TDG (Figure 12), nous avons étudié

l'impact de la surexpression de TET2 WT et de l'augmentation des 5-hmC dans la cellule en absence de TDG en utilisant des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) invalidés pour *Tdg* (tdg-/-). Nous avons, étudié la mutagenèse spontanée au niveau du locus NA⁺/K⁺ATPase dans les MEF Tdg KO en présence de TET2 WT. Les colonies mutantes ont été sélectionnées par l'ouabaïne au bout de six générations, amplifiées et l'ADNc du gène NA⁺/K⁺ ATPase a été séquencé. Nous avons trouvé que la surexpression de TET2 WT n'induit aucun effet sur la mutagenèse spontanée dans les MEF. Par contre, la fréquence de mutagenèse spontanée augmente de 3 fois dans les MEF *Tdg* KO en absence de TET2 WT et de 5 fois en présence de la surexpression de TET2 WT. Le spectre de mutagénèse montre surtout des transitions C>T, particulièrement au niveau des sites CpG. La technique de hMedip réalisée dans les cellules MEF en absence ou en présence de TET2 WT, montre un enrichissement en 5-hmC au niveau des sites des mutations ou juste à proximité.

Discussion et perspectives:

Cette première partie, visait à étudier l'effet des 5-hmC sur l'instabilité génétique. Nous avons trouvé que la surexpression de TET2 WT induisait l'altération de la progression du cycle cellulaire qui était associée à une aneuploïdie et à une instabilité centrosomique. Ce phénomène est observé uniquement dans les lignées cellulaires qui surexprimaient TET2 WT et pas des mutants catalytiques TET2* et TET2HxD. Ceci montre que ce phénomène dépend de l'activité catalytique de TET2 et est la conséquence de l'augmentation du taux des 5-hmC dans la cellule. Nous pensons que le ralentissement du cycle cellulaire est dû à l'accumulation des 5-hmC qui au cours de la réplication pourraient induire l'arrêt transitoire de la machinerie transcriptionnelle afin de permettre la réparation de ces métabolites considérés comme des bases modifiés. Nous n'avons pas détecté d'apoptose ou de sénescence ce qui suggère que la phase G2/M a été accélérée. Il serait important de synchroniser les cellules en phase G0 et d'étudier les effets de la surexpression de TET2 sur l'entrée en phase S. D'autre part, l'augmentation des 5-hmC pourrait aussi affecter l'expression des gènes responsables de la régulation du cycle cellulaire. Le ralentissement du cycle cellulaire pourrait aussi être du à la présence de TDG au niveau des sites abasiques générés après l'excision des thymines et de l'uracile, puisqu'il a déjà été montré que la surexpression de TDG induit un ralentissement de la phase S du cycle cellulaire (Hardeland et al. 2007). Ainsi, la surexpression de TET2 WT pourrait stabiliser TDG et prévenir sa dégradation. De plus, l'instabilité chromosomique/centrosomique que nous avons observée en présence de TET2 WT n'était pas

associée avec une augmentation des échanges de chromatides sœurs (ECS). Les ECS sont le résultat du mécanisme de recombinaison homologue induit par les cassures double brins de l'ADN. En plus, l'absence de modification de γ -H2AX dans les cellules en présence de TET2 WT montre que ce mécanisme de réparation n'est probablement pas dérégulé. Pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine des aberrations chromosomiques et centrosomiques observées, il serait intéressant d'étudier les niveaux des protéines kinases qui régulent le cycle des centrosomes comme les kinases Aurora A/B. L'absence d'apoptose et de sénescence suggère que dans les cellules qui surexpriment TET2 WT, les 5-hmC et ses dérivés (5-fC, 5-caC et 5-hmU) générés par TET2 et AID (Cortellino et al. 2011) ; (He et al. 2011) ; (Ito et al. 2011) et pris en charge par TDG ne sont pas cytotoxiques et induisent un phénotype transitoire probablement du fait de la dégradation rapide de TET2 dans ces cellules.

Ces résultats ont été confirmés dans la deuxième partie de ce travail. En effet, en absence de TDG, la surexpression de TET2 induit l'augmentation de 5 fois de la mutagenèse spontanée au niveau du locus Na⁺/K⁺ ATPase. L'analyse du spectre de mutations montre surtout une augmentation de la transition C->T dans un contexte CpG. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les 5-hmC sont déaminées en 5-hmU qui sont substituées par une Thymine en absence d'une réparation efficace dans les MEF TDG KO (**Figure 13**). Pour confirmer cette hypothèse, nous avons montré, par hMedip, l'accumulation des 5-hmC au niveau des séquences mutées. Ces résultats suggèrent que les 5-hmU, 5-fC et 5-caC, générées par la surexpression de TET2 induisent un phénotype mutateur en absence de TDG. La différence de phénotype mutateur obtenu dans les cellules des souris KO TDG portant le locus reporter « Big Blue » peut être expliquée par le fait que TDG est impliqué dans la réparation des aberrations de méthylation *de novo* de l'ADN (Cortazar et al. 2011). Le gène Na⁺/K⁺ ATPase étant un gène fortement exprimé de façon ubiquitaire pourrait être plus soumis à cette régulation.



Figure 13: Mécanismes aboutissant à la transition C->T après méthylation des cytosines.

Les DNMTs méthylent les cytosines au niveau du carbone en position 5 pour générer les 5mC. Au cours du processus de la déméthylation active, les 5-mC sont hydroxylées par les protéines TETs en 5-hmC. Les 5-hmC sont ensuite déaminées et donnent des 5-hmU. En absence de TDG les 5-hmU non réparées s'apparient en face des adénines (A) Au cours de la réplication. Finalement les 5-hmU mésappariées sont remplacées par des thymine (T) aboutissant à une transition A:T.

ARTICLE 2

« TET2-mediated 5-hydroxymethylcytosine induces genetic instability and mutagenesis »

TET2-mediated 5-hydroxymethylcytosine induces genetic instability and mutagenesis

Emna Mahfoudhi ^{1,2,3,4,5}, Ibtissam Talhaoui ⁶, Xenia Cabagnols^{1,2,3,4}, Véronique Della Valle^{1,2,3,4}, Lise Secardin^{1,2,3,4}, Olivier A. Bernard^{1,2,3,4}, Alexander A. Ishchenko^{2,3,6}, Salem Abbes⁵, William Vainchenker^{1,2,3,4}, Murat Saparbaev^{2,3,6}, Isabelle Plo^{1,2,3,4}.

- 1- INSERM, UMR 1170, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France
- 2- Université Paris XI, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France
- 3- Gustave Roussy, Villejuif, France
- 4- Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif
- 5- Laboratoire d'hématologie moléculaire et cellulaire, Institut Pasteur de Tunis, Université de Tunis El Manar, Belvédère, Tunisie
- 6- CNRS UMR8200, Groupe «Réparation de l'ADN», Université Paris-Sud, Gustave Roussy Cancer Campus, F-94805 Villejuif Cedex, France.

Running title: TET2 induces genetic instability

Corresponding authors: Isabelle Plo

UMR U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, isabelle.plo@gustaveroussy.fr,

Total word count: 2521 words

Keywords: TET2, 5-hmC, TDG, genetic instability, cell cycle

ABSTRACT (207 words)

The family of Ten-Eleven Translocation (TET) proteins is implicated in the process of active DNA demethylation and thus in epigenetic regulation. TET1, 2 and 3 proteins are oxygenases that can hydroxylate 5-methylcytosine (5-mC) into 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and further oxidize 5-hmC into 5-formylcytosine (5-fC) and 5-carboxylcytosine (5-caC). Moreover, TET proteins can also oxidize thymine into 5-hydromethyluracil (5-hmU). Alternatively, 5-hmC residues could be further converted into 5-hmU by the activationinduced deaminase (AID). Resulting 5-hmU, 5-fC and 5-caC residues opposite to guanine are removed and replaced by regular cytosine in the base excision repair (BER) pathway. The question arises whether active modification of 5mC residues and their subsequent elimination could affect the genomic DNA stability. Here, we generated two inducible cell lines (Ba/F3-EPOR, and UT7) overexpressing wild-type and/or catalytically inactive human TET2 proteins. TET2 induction resulted in an increased level of 5-hmC and a cell cycle defect associated with chromosomal and centrosomal abnormalities. Furthermore, the TET2-mediated increase of 5-hmC induces mutagenesis characterized by GC->AT transitions in a CpG context in a thymine-DNA glycosylase (Tdg) deficient context, suggesting a mutagenic potential of 5hmU, 5fC and/or 5-caC. Altogether, these data suggest that tight control of TET2 protein as well as 5-hmC residue and its derivatives is required to avoid genetic and chromosomal instabilities.

Introduction

The family of TET proteins (TET1, 2 and 3) was first discovered as a result of the identification of the *TET1* gene as an MLL fusion partner in the translocation t(10;11)(q22;q23) in a leukemia (1). Later, TET2 mutations were identified in both myeloid and lymphoid hematological malignancies (1). More recently, it was shown that TET1 expression was downregulated in non-Hodgkin B cell lymphoma (2). All three TET proteins share a conserved region at the C-terminus of the proteins corresponding to double sheet β -helix (DSBH) domain. Through this catalytic domain, TET proteins belong to 2-oxoglutarate-(2OG) and Fe(II)-dependent oxygenases that can convert 5-methylcytosine (5-mC) into 5hydroxymethylcytosine (5-hmC), and subsequently convert 5-hmC into 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5-caC), which are less abundant than 5-hmC in the genome (3,4). Moreover, TET proteins can also oxidize thymine into 5-hydroxymethyluracil (5-hmU) (5). Even if it is still a matter of debate, 5-hmC could be deaminated by cytidine deaminases (AID/APOBEC family) to generate 5-hmU, which in turn is excised mainly by the thymine-DNA glycosylase (TDG), the methyl-binding protein 4 (MBD4) and the single-strand specific monofunctional uracil-DNA glycosylase 1 (SMUG1) and then replaced by regular cytosine in the base excision repair (BER) pathway (6,7). Altogether, this pathway leads to active DNA demethylation.

The TET proteins are critical enzymes involved in the differential gene expression (10,11). They are implicated in the development and pluripotency of embryonic stem (ES) cells (8). Notably, the Tet proteins are differentially expressed among different tissues. The 5-hmC are abundant in embryonic stem (ES) cells and adult neurons reaching 15-40% of 5-mC, but they are present in all cell types at lower rates (1-5% of 5-mC) (3,9).

TDG can excise with high efficiency 5-fC, 5-caC and 5-hmU residues in a CpG context, suggesting direct involvement of BER in active DNA demethylation (4,6). It has been shown

that *Tdg* knockout mice are embryonic lethal due to aberrant *de novo* DNA methylation of CpG islands in the promoters of developmental genes, which results in failure to establish and/or maintain cell type-specific gene expression programs during embryonic development (6,12). The nuclear fraction of TDG associates tightly with euchromatin and binds to the CpG rich promoters of transcribed genes including the pluripotency and developmental genes (12). It was suggested that TDG scans the CpG sites for mismatches and regulates gene expression, either by protecting CpG from *de novo* DNA methylation, or *via* interaction with chromatin and transcription factors.

In light of these observations, the question arises concerning the control of genome stability during the process of active erasure of 5-mC residues *via* TET2-mediated cytosine modifications and TDG-mediated BER, since the generation of highly genotoxic and mutagenic DNA repair intermediates such as AP (apurinic/apyrimidinic), DNA strand breaks, oxidized and deaminated cytosine residues and the involvement of an "unfaithful" DNA polymerase β for DNA re-synthesis. Therefore, the aim of this work was to study the possible role of TET2-mediated increase of 5-hmC level in the genetic instability and mutagenesis.

Material and methods

Cell lines

The murine, pro B Ba/F3-EPOR cell lines were cultured in DMEM medium (Invitrogen, Thermo Fisher, Illkirch, France) complemented with 10% FBS (Stem Cell Technologies) and 1 U/mL EPO. The human UT-7 megakaryoblastic cell lines were cultured in MEM medium (Invitrogen), complemented with 10% FBS and 10ng/mL GM-CSF (gift from Amgen, Thousand Oaks). Mouse embryonic fibroblasts (MEF) *WT* and MEF *tdg*^{-/-} cell lines were obtained from Dr. P. Schar (12) and cultured in DMEM with 10% FBS.

Quantification of 5-hmC

5-hmC was quantified using dot blot assays with an anti-5-hmC antibody (Active Motif).

Gene expression analysis

Specific primers were used as described in Table S1. All genes were expressed relatively to *PPIA* or *HPRT or B2microglobulin*.

Cell cycle analysis

S phase analysis was performed by using an "APC BrdU flow kit" from BD (Beckton Dickinson). Cells (10^6) were induced for 24 h with doxycycline then incubated for 30 min in the presence of bromodeoxyuridine (BrdU) (10 μ M). Cells were washed, fixed, permeabilized for 30 min. Cells were then treated with DNase (300 μ g/ml) for 1h at 37°C, washed and stained with an anti-BrdU antibody and 7-AAD. Analysis were performed with a BD FACSCanto II (BD)

Chromosomes and Sister chromatid exchange assay

A total of 3.5×10^5 cells were seeded in a 24-well plate containing 4 µg/mL BrdU. After 2 cell divisions in the presence of BrdU (30 hours), colcemid (Sigma-Aldrich) (0.5 µg/mL) was added for 2 hours. Cells were washed, trypsinized, collected, and centrifuged. Cells were resuspended in 10 mL of 0.075M of KCl and incubated for 15 minutes at 37°C. Before centrifugation, 100 µL of methanol-acetic acid (3:1) was added. The pellet was then fixed and incubated overnight at 4°C. Cells were then centrifuged, washed with fresh fixative solution, and dropped onto wet slides. The slides were covered for 20 minutes with 10 µg/mL of Hoechst nucleic acid stain 33258 (Sigma-Aldrich) and subsequently incubated in a solution of (2X) sodium saline citrate twice, pH 6.3, for 2 hours under ultraviolet light. The slides were plunged into sodium saline citrate twice, pH 6.3, at 60°C for 15 minutes, and stained with 1.5% Giemsa.

Mutagenesis measurements

At least 5 to 6 independent cultures were plated and cultured to confluence. Cells were counted. One part was used for plating efficiency. The remaining cells were plated and the mutant colonies were selected with 2 mM ouabain. The number of ouabain-resistant clones was used to calculate the mutagenesis frequency. The rate of mutagenesis per cell per generation and the rate of mutagenesis per locus per generation were calculated using the fluctuation analysis of Luria and Delbrück and Capizzi and Jameson.

Constructs and viral particles production

The cDNA coding for GFP-fused full-length TET2 was cloned into doxycycline inducible lentiviral vectors pSIN_TRE_hPGKRTTA2S_M2. Site-directed mutagenesis was done to generate GFP-fused TET2HxD ([H1382Y][D1384A]) or TET2* ([L1514*]) lentivirus

particles were produced. Cells were transduced and sorted for GFP in the presence of doxycycline ($2\mu g/mL$), on BD influx sorter.

hMeDIP experiment

hMeDIP reactions were performed using hMedip kit according to the manufactor's protocol (Active Motif). hMeDIP samples and input were analyzed by qPCR, with specific primers (Table S1) using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen). Fold enrichments were calculated by comparing ChIP samples to genomic DNA control and IgG.

Results and Discussion

Generation of doxycyclin inducible TET2-overexpressing cell lines

We generated two growth factor-dependent cell lines the human megakaryoblastic UT-7 and the murine B cell Ba/F3-EPOR cell lines that overexpress doxycycline-inducible TET2 with N-terminal fusion GFP constructs using different lentiviral vectors encoding either TET2 WT, TET2* (truncated form of the protein at the aminoacid residue L1514) or TET2HxD (mutations leading to change in the 1382 and the 1384 aminoacid residues) (3) (Figure 1A). The expression of TET2 constructs was verified at both mRNA using qRT-PCR and protein levels by western-blotting with anti-TET2 or anti-GFP antibodies (Figure 1B and C). We checked the enzymatic activity of TET2 constructs in the different cellular models by analyzing 5-hmC by dot-blot. As shown in Figure 1D, overexpression of TET2 WT induced by doxycycline resulted in a strong increase in 5-hmC content of the cells, whereas no increase was observed after overexpression of TET2* and TET2HxD mutants. These results are consistent with previous findings (3).

Impact of TET2-induced 5-hmC on cell cycle

Next, we examined the cell cycle distribution in cells overexpressing TET2 by Hoechst staining. As shown in Figure 2, we observed a significant difference in the cell cycle distribution with an increase in number of cells accumulating between G1 and early S phase in both UT7 and Ba/F3-EPOR cells overexpressing TET2 WT while TET2* or TET2HxD overexpression did not alter cell cycle (Figure 2A and B). Since G1 and S were difficult to differentiate in these experiments, we further investigate the S phase with a more sensitive technique by performing a 30 min pulse BrdU/7-AAD staining in TET2 overexpressing Ba/F3-EPOR cells. In fact, we found that TET2 WT overexpression induced a strong inhibition of cells in S phase and especially in late S phase, whereas no effect was found in

TET2* or TET2HxD Ba/F3-EPOR cell lines (Figure 2C). These results indicate that overexpression of TET2 induces an accumulation of cells in G1 and not in S as found with Hoechst labeling alone. Unexpectedly, this deregulation of the cell cycle was not associated with decreased cell proliferation or apoptosis (not shown), suggesting that G2/M phase could be accelerated or that the effects of the TET2 induction was transient due to a subsequent degradation of TET2.

Altogether, these results suggest that TET2-induced 5-hmC may be involved in the delay of both the S phase entry and the S phase progression leading to accumulation of cells in late G1 or early S phase. This cell cycle delay could be linked to the generation of 5-hmC residues which: (i) might perturb DNA replication; or (ii) may activate G1-S and intra-S checkpoints; or (iii) could be further converted into 5-hmU, 5-fC, 5-caC residues and then into genotoxic DNA repair intermediates such as AP sites and DNA strand breaks generated by TDG-BER, and oxidized and deaminated cytosine residues generated by TETs and AID (6,13,14). Increased level of 5-hmC residues might also indirectly affect cell cycle by affecting expression of genes responsible for DNA replication or elongation or damage responses.

Impact of TET2-induced 5-hmC on chromosomal instability

Since TET2 overexpression affects cell cycle, we tested if increased TET2 level could induce chromosomal and centrosomal abnormalities. As shown in Figure 3A, a significant increased number of aneuploid cells was observed in Ba/F3-EPOR-TET2 WT as compared to control cell lines and TET2* cell line. However, we did not observe a significant impact of TET2 overexpression on sister chromatid exchange (SCE), which occurs as a result of homologous recombination during DNA replication induced by strand breaks and DNA damage (Figure 3B). We checked the number of centrosomes in mitosis of the different cell lines by immunofluorescence using an anti– γ -tubulin antibody (Figure 3C and D) and found abnormal

centrosome numbers in TET2 WT overexpressing cells (10%) but not in TET2 HxD (5%) as compared to control cells lines (2%).

These results show that TET2-mediated formation of 5-hmC in DNA induces genomic instability with impairment in the numbers of centrosomes associated with great aneuploidy without augmentation in SCE. This phenomenon could be related to a DNA replication defect caused by increased level of the TET2 protein and 5-hmC residues, which in turn could initiate TDG-mediated removal of modified cytosines. It was shown that overexpression of TDG leads to a delay in S phase possibly due to the inability of TDG to dissociate from AP sites generated after excision of mismatched T and uracil residues which would cause DNA replication block (15). Based on these observations, we may speculate that TET2 overexpression and increased 5-hmC levels stabilize the TDG protein in S phase, thus counteracting cell cycle controlled ubiquitylation and proteasome degradation of TDG. In agreement with our data, recent work of Nakatani et al. reported an impaired DNA replication and abnormal chromosome segregation of maternal chromosomes in Stella-'- embryos in a Tet3-dependent manner (16). Activation of CHK2 and P53 and subsequent y-H2AX have been also shown to be increased with Tet1 catalytic domain (17). Alternatively, changes in methylation may be by itself responsible for genomic instability as genomic hypomethylation in *Dnmt1* hypomorphic mice induces aggressive T-cell lymphomas with a high chromosomal instability (18).

Impact of TET2-induced 5-hmC on mutagenesis

To further substantiate the role of TET2 in genome stability, we examined the spontaneous mutagenesis at the Na⁺/K⁺-ATPase (*Atp1a1*) locus in the MEFs $Tdg^{+/+}$ and $Tdg^{-/-}$ overexpressing or not TET2 WT protein allowing monitoring point mutations (Figure 4A and B). Spontaneous mutagenesis was calculated by fluctuation analysis with 10⁸ cells per test.
We found that in $Tdg^{+/+}$ MEF, the TET2-catalyzed activity had no effect on the spontaneous mutation rate suggesting that 5-hmC residues are not mutagenic per se. However, 5-hmC can be converted into 5-hmU, 5-caC or 5-fCa, which are then processed by Tdg in the BER pathway. We observed a 3-fold increase in the frequency of spontaneous mutagenesis in the *Atp1a1* locus of $Tdg^{-/-}$ MEF cells (without TET2 overexpression) (Figure 4C) with respect to WT MEF. However, a previous work that compared the phenotypes of Tdg and Mbd4 knockout MEFs demonstrated that TDG did not impact mutation frequencies in a Big Blue transgenic $Tdg^{-/-}$ MEF whereas $Mbd4^{-/-}$ MEF exhibited higher spontaneous mutation rate as compared to WT MEFs (12). The phenotypic differences could be explained by the fact that Atp1a1 is a housekeeping gene involved in homeostasis of Na⁺ and K⁺, which is constitutively expressed. Given the association of Tdg with transcribed genes (19), we may propose that the gene coding for the Atp1a1 interacts with Tdg to counteract aberrant *de novo* DNA methylation.

A further 5-fold increase in mutation frequency was observed when $Tdg^{-/-}$ MEF overexpressed TET2 WT (Figure 4C). The mutagenesis spectrum was analyzed after sequencing the *Atp1a1* cDNA in the mutant clones. We observed an increase in GC->AT transition in $Tdg^{-/-}$ MEF overexpressing TET2 WT cells as compared to control $Tdg^{-/-}$ MEF at the expense of GC->CG transversion (Figure 4D), particularly at CpG sites (9/21 clones, 43%) (Figure 4E). This result may indicate an increased conversion of 5-hmC to 5-hmU via deamination with following 5-hmU to T base substitution in absence of TDG or inefficient repair of 5-hmU. Nevertheless, it is unlikely that TET2-mediated oxidize thymine into 5-hmU would be mutagenic unless 5-hmU might initiate the involvement of long-patch BER or translesion synthesis in which the mutagenesis outcome may depend on the polymerase involved.

In order to examine the presence of 5-hmC residues at mutated loci, we performed hMedip on

DNA from MEF overexpressing or not the TET2 WT protein in 2 regions of *Atp1a1* (exon 4 and 17). As expected, we observed a great enrichment of 5-hmC residues in TET2 overexpressing cells in the above regions, further confirming the presence of 5-hmC at the mutation sites or in close proximity to them (Figure 4F).

These results suggest that 5-hmU, 5-caC and 5-fC generated by overexpression of TET2 in $Tdg^{-/-}$ cells may be responsible for mutagenic phenotype of $Tdg^{-/-}$ MEF. Altogether, we observed the involvement of TDG-BER in the removal of TET2-generated genotoxic intermediates in locus specific manner. In agreement, it has been demonstrated that loss of TDG in tumor cells of mismatch repair deficient patient resulted in high number of base substitution mutations providing the first *in vivo* evidence for the role of TDG in mutation prevention (20). Therefore, we may hypothesized that the C->T mutagenesis occur either during aging and in cancers when BER is less efficient or following oxidative stress that may saturate the repair enzymes involved in removal of oxidized bases. For example ionizing radiation and chemotherapeutic agents could overwhelm the repair systems of the cell. Therefore, during development that involves genome-wide epigenetic reprogramming, in order to maintain genome stability, the equilibrium of all enzymes involved in the active DNA demethylation should be kept in balance.

In conclusion, the intracellular level of the TET proteins, 5-hmC residue and its derivatives and BER enzymes should be tightly regulated to avoid increase of chromosomal and genetic instabilities, which are a hallmark of cancers initiation and progression.

Acknowledgments

We thank the cytometry platform of Gustave Roussy (P. Rameau and Y. Lecluse).

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR-Blanc 2013 GERMPN) to IP and [ANR Blanc 2010 Project ANR-10-BLAN-1617] to IP and MS, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (ARC libre 2012) to IP, Electricité de (http://www.edf.fr) RB 2014-26 to M.S. and Fondation de France France (http://www.fondationdefrance.org) [#2012 00029161] to A.A.I. Labex GR-Ex (IP, WV) is funded by the program "Investissements d'avenir". EM was funded by INSERM/DGRST then a grant from Institut Pasteur from Tunis, Tunisia. LS were supported by Ph.D grants from the Region Ile de France (Cancéropôle and DIM cellule souche). XC was supported by Ph.D MENRT grant. IT was supported by postdoctoral fellowship from the Fondation ARC (http://www.arc-cancer.net) PDF20110603195.

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

REFERENCES

- 1. Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. Leukemia 2014;28(3):485-96.
- 2. Cimmino L, Dawlaty MM, Ndiaye-Lobry D, Yap YS, Bakogianni S, Yu Y, et al. TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. Nat Immunol 2015.
- 3. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science 2009;324(5929):930-5.
- 4. Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. Cell 2014;156(1-2):45-68.
- 5. Pfaffeneder T, Spada F, Wagner M, Brandmayr C, Laube SK, Eisen D, et al. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. Nat Chem Biol 2014;10(7):574-81.
- 6. Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. Cell 2011;146(1):67-79.
- 7. Morera S, Grin I, Vigouroux A, Couve S, Henriot V, Saparbaev M, et al. Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyuracil-containing DNA. Nucleic Acids Res 2012;40(19):9917-26.
- 8. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Barrasa MI, Raddatz G, Gao Q, et al. Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. Dev Cell 2014;29(1):102-11.
- 9. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science 2009;324(5929):929-30.
- 10. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. Nat Rev Mol Cell Biol 2013;14(6):341-56.
- 11. Williams K, Christensen J, Helin K. DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? EMBO Rep 2012;13(1):28-35.
- 12. Cortazar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E, et al. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. Nature 2011;470(7334):419-23.
- 13. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. Science 2011;333(6047):1303-7.
- 14. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. Science 2011;333(6047):1300-3.
- 15. Hardeland U, Kunz C, Focke F, Szadkowski M, Schar P. Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2. Nucleic Acids Res 2007;35(11):3859-67.
- 16. Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, et al. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced gammaH2AX accumulation. EMBO Rep 2015.
- 17. Jin C, Qin T, Barton MC, Jelinek J, Issa JJ. Minimal Role of Base Excision Repair in TET-Induced Global DNA Demethylation in HEK293T Cells. Epigenetics 2015:0.

- 18. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science 2003;300(5618):489-92.
- 19. Tini M, Benecke A, Um SJ, Torchia J, Evans RM, Chambon P. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. Mol Cell 2002;9(2):265-77.
- 20. Vasovcak P, Krepelova A, Menigatti M, Puchmajerova A, Skapa P, Augustinakova A, et al. Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency. DNA Repair (Amst) 2012;11(7):616-23.

Figure legends

Figure 1: Doxycycline inducible TET2-overexpressing cell lines. (a) Scheme of TET2 constructs. Ba/F3-EPOR or UT7 cells were cultured in the presence of EPO (1 U/mL) or GM-CSF (10ng/mL), respectively. Wild-type (WT) or mutants TET2 were induced with doxycycline (2µg/mL) at various times (0 to 24 hours) (b) TET2 expression was analyzed by qRT-PCR. (c) TET2 expression was analyzed by Western-blot using anti-TET2 (mouse antiserum) or anti-GFP antibodies (Roche, Mannheim, Germany). HSC70 was used as loading control. (d) 5-hmC levels were analyzed by dot-blot using an anti-5-hmC antibody (Active Motif, Carlsbad, CA) (1:10,000).

Figure 2: TET2-induced 5-hmC mediated cell cycle defect. (a, b) Cell cycle distributions were analyzed by flow cytometry after Hoechst staining in Ba/F3-EPOR and UT7 cell lines. (a) UT7 cells were induced with doxycycline for 12 hours and the percentages of cells in each cell cycle phase are indicated for GFP⁺ and GFP⁻ fractions. (b) Ba/F3-EPOR cells were induced or not for TET2 WT or mutants with doxycycline for 12 hours. Results are mean \pm SEM of at least 3 independent experiments (* p<0.05, ** p<0.01 by student *t*-test) (c) Ba/F3-EPOR cells were induced or not for TET2 WT or for TET2 WT or mutants with doxycycline for 30 min in the presence of BrdU (10µM) by using an "APC BrdU flow kit" from BD (le Pont de Claix, France).

Figure 3: TET2-induced 5-hmC favors chromosomal instability.

(A) The ploidy of the Ba/F3-EPOR different cell lines was investigated by cytogenetic analysis. More than 70 metaphasic cells per cell line were analyzed, and a non-parametric analysis of variance was used for statistical significance of the distribution. Significant difference was found in Ba/F3-EPOR overexpressing TET2 WT compared to EV (P<0.001).

(B) Ba/F3-EPOR cells were cultured in the presence of BrdU (4 µg/mL, 30 hours, 2 cell cycle divisions), colcemid (Sigma-Aldrich) was added. The sister chromatid exchange (SCE) of the different Ba/F3-EPOR cell lines was counted after cytogenetic and Hoechst 33258 staining (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallaviers, France). 50 metaphases were counted and no difference was detected. (C) Ba/F3-EPOR cell lines were analyzed with an anti– γ -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) by immunofluorescence. More than 200 metaphases were analyzed and the percentage of cells with abnormal number of centrosomes was calculated. χ^2 test was done (***p<0.001 compared to EV+). (D) Examples of centrosome abnormalities observed in Ba/F3-EPOR cell lines overexpressing TET2 WT anti– γ -tubulin (red) immunostainning. Nuclei are labeled by Hoechst (blue).

Figure 4: TET2-induced 5-hmC impacts on mutagenesis.

(a, b) *TET2* and *Tdg* gene expressions were analyzed by qRT-PCR and specific primers (Table S1) in MEF and *Tdg*^{-/-} MEF (12) overexpressing TET2 WT or not. Results are the mean \pm SEM of 3 independent experiments. * represents significant results using student t test (*P<0.05) (c) Spontaneous mutagenesis was calculated in MEF and *Tdg*^{-/-} MEF by fluctuation analysis (Luria and Delbruck, Capizzi and Jameson) with 5-6 independent cultures at the *Atp1a1* locus using ouabaïn (2 mM) (*P<0.05). (d) Total RNA of each mutant (7 clones in *Tdg*^{-/-} context and 21 clones in *Tdg*^{-/-} overexpressing TET2 WT) was amplified and the *Atp1a1* cDNA was sequenced after retrotranscription to determine the mutational pattern in *Tdg*^{-/-} and *Tdg*^{-/-} + TET2 WT MEF. (e) Examples of mutations in CG context in *Tdg*^{-/-} + TET2 WT. (f) DNA was purified from MEF overexpressing TET2 WT (12-hour doxycycline) or not and fold enrichments on 5-hmC in the *Atp1a1* gene (exon 4 and 17) were measured by hMeDip kit (Active Motif, Carlsbad, CA) followed by quantitative PCR. Results are the mean

 \pm SEM of 3 and 4 independent experiments for exon 4 and exon 17, respectively. * represents significant results using student Mann and Whitney test (*P<0.05).



Mahfoudhi et al., Figure 1

Mahfoudhi et al., Figure 2





Α



Supplemental Table 1

Specific primers used

Primer name	Sequence (5'->3')	Experiment
mAtp1a1_F_exon4	CGGTCTGGGAGGCAACAGCGCTACC	
mAtp1a1_R_exon4	GTTTCCTGGCTTATGGCATCCGAAG	hMeDIP
mAtp1a1_F_exon17	CCAGTAACATTCCGGAAATCACCCCCTTCTTGATA	
mAtp1a1_R_exon17	CTCACGTACCATGTCAGTGCCCAAGTCAATGC	
mAtp1a1_1F	GGTTGGACGAGACAAGTATGAG	
mAtp1a1_1R	GCACGTTGGCTACGATGATA	
mAtp1a1_2F	TGATCCTTGAGTACACCTGGC	Sequencing
mAtp1a1_2R	CCCTCCACAATGATGAGCTT	mAtp1a1 cDNA
mAtp1a1_2F	GCCGCCTGATAATGAGCTT	
mAtp1a1_2R	TACCACAGAGATCGTCTTTGC	
hTET2_F	ACGCAAGCCAGGCTAAACA	
hTET2_R	GCTGGGACTGCTGCATGA	
mtdg_F	ATGTCGGGGCTGAGTGAGGT	
mtdg_R	GGTGTTGCGTTCAATGCCTTTC	
hPPIA_F	GTCAACCCCACCGTGTTCTT	
hPPIA_R	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT	
hHPRT_F	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	
hHPRT_R	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA	
mβ2microglobuline _F	TATATCCTGGCTCACACTGAATTC	
mβ2microglobuline _R	TCGATCCCAGTAGACGGTCTT]

RESULTATS 2:

Effet de l'activation de P53 par les antagonistes de MDM2 sur les progéniteurs hématopoïètiques et la mégacaryopoïèse

Contexte et objectifs du travail :

P53 est un facteur de transcription qui joue le rôle d'un suppresseur de tumeur et qui est exprimé de façon ubiquitaire. Dans la cellule au repos, P53 est peu exprimé à cause de son ubiquitination par MDM2 (Brooks et Gu 2006) (Ringshausen et al. 2006) et sa dégradation par la machinerie proteosomale 26s. En revanche, en réponse à des stress cellulaires suite à des stimuli intra ou extracellulaire comprenant l'action d'oncogènes, l'hypoxie, les agents génotoxiques et conduisant à des dommages cellulaires ou de l'ADN, P53 est stabilisé et activé suite à la dégradation de MDM2. Ainsi, elle active un programme transcriptionnel multifacette qui en fonction du type cellulaire et du stimulus initie l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, les voies apoptotiques ou la réparation de l'ADN. Comme P53 détermine le destin cellulaire, il est strictement régulé in vivo. Chez l'homme, P53 est muté dans 50% des tumeurs solides et dans 5% des hémopathies malignes. Dans le reste des cancers, la fonction de P53 est altérée par d'autres mécanismes comme l'augmentation de l'expression de ses régulateurs négatifs, MDM2 et MDM4 (Wade et al. 2013). Ainsi, la réactivation de P53 dans les tumeurs qui expriment une protéine P53 wild-type constitue une approche thérapeutique. De nouvelles stratégies visent également à réactiver des formes mutantes de P53 comme PRIMA-1. Durant la dernière décennie, de nombreuses molécules inhibitrices de l'interaction P53-MDM2 ont été développées. L'évaluation clinique et préclinique de certaines de ces drogues a montré que le RG7112, actuellement en essais cliniques de phase I, induit chez les rats et les singes une thrombocytopénie sévère avec une neutropénie et une anémie modérée (Ramsahoye et al. 2000) (Iancu-Rubin et al. 2014). Les études in vitro ont montré que le RG7112, comme la Nutlin, affecte la mégacaryocytopoïèse au niveau des progéniteurs mais aussi au stade de mégacaryocytes matures et de la production de plaquettes (Iancu-Rubin et al. 2014). Le SAR405838, en évaluation clinique depuis 2012, induit chez les patients une thrombocytopénie mais qui est réversible (Wang et al. 2014). Cette toxicité induite par les antagonistes de MDM2 semble limiter la dose du traitement. Il est donc intéressant de tester si cette toxicité peut être restaurée par de fortes doses de cytokines.

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet du SAR405838, antagoniste de MDM2 de la famille de spiro-oxindole, au cours de l'hématopoïèse. En particulier, nous nous sommes centrés sur les stades précoces et tardifs de la différenciation mégacaryocytaire. Nous avons aussi testé si de fortes doses de TPO étaient capables de reverser la toxicité induite par le

SAR405838. Nous avons aussi comparé nos résultats avec le MI-219 et la Nutlin décrits comme moins puissants que le SAR405838.

Résultats :

Dans ce projet, nous avons commencé par vérifier la fonctionnalité de P53 dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Le traitement des cellules primaires CD34⁺ avec différentes doses de SAR405838 induit de façon dose dépendante l'augmentation de l'expression des cibles transcriptionnelles de P53 : *MDM2*, *BBC3* et *CDK1A*. De fait, dans ces cellules, P53 est fonctionnelle et son activation induit l'activation de ses cibles.

Ensuite, nous avons testé l'effet du SAR405838 sur les progéniteurs hématopoïétiques. Il induit de façon dose dépendante une réduction importante (50% à $0.5-1\mu$ M) de la formation de colonies BFU-E, CFU-GM et CFU-MK après un traitement continue de 12-14 jours en culture semi-solide. Le MI-219 induit également une diminution du nombre de progéniteurs mais avec un effet moindre. Cet effet du SAR405838 est aussi temps-dépendant et n'est pas réversible. En effet, le traitement de cellules CD34⁺ par le SAR405838 ou par le MI-219 pendant 3 ou 5 jours en culture liquide suivi d'un lavage avant l'ensemencement en culture semi-solide induit aussi la réduction du nombre de colonies dérivées de tous les types de progéniteurs (BFU-E, CFU-GM and CFU-MK). La cytotoxicité induite par un traitement de 5 jours est plus importante que celle observée après 3 jours de traitement uniquement (IC50=0.5-1 μ M versus 2 μ M, respectivement).

De plus, nous avons montré que les progéniteurs immatures CD34⁺CD38⁻ sont plus sensibles à l'effet du SAR405838 que les progéniteurs plus matures CD34⁺CD38⁺. Ainsi l'activation de P53 induit un effet cytotoxique sur tous les progéniteurs hématopoïétiques y compris les progéniteurs immatures.

Nous avons investigué l'impact de la stabilisation de P53 sur la différenciation érythroblastique. Le traitement des érythroblastes à J8 de culture avec le SAR405838 pendant 48h induit l'augmentation de l'expression de la protéine P53 en comparaison avec les cellules contrôles non traitées. De plus, la stabilisation de P53 est associée non seulement à une diminution de la prolifération cellulaire (IC50= 1.4μ M) mais aussi à une augmentation de l'apoptose. L'effet de l'activation de P53 sur la différenciation érythroïde est dose dépendant. Ainsi, l'activation de P53 a un effet cytotoxique aussi bien sur les progéniteurs érythroblastiques que sur les cellules les plus différenciées de la lignée érythroblastique (IC50 environ 2.5 μ M au bout de 48 h de traitement).

Afin d'étudier l'impact de l'activation de P53 sur la mégacaryopoïèse, nous avons suivi l'effet du SAR405838 sur la survie et la prolifération cellulaire au cours des stades précoces mais aussi sur les mécanismes tardifs de la différenciation mégacaryocytaire. Le traitement des cellules primaires CD34⁺ avec le SAR405838 induit la diminution des cellules viables et l'augmentation de l'apoptose de façon dose- et temps-dépendante (IC50=2.8 µM pour 48h versus 1.9 µM pour 72h). De même, le traitement des mégacaryoblastes à J6 de culture liquide avec le SAR405838 ou le MI-219 pendant 48 ou 72h montre également la diminution de la prolifération cellulaire et l'augmentation de l'apoptose par rapport aux cellules contrôles non traitées. A ce stade, les cellules sont plus sensibles, et leur nombre est diminué de moitié à une dose de 0.5 µM. Par contre, l'effet de la stabilisation de P53 sur l'expression du marqueur mégacaryocytaire CD41 à ce stade n'était pas significative. L'étude de la ploïdie des mégacaryocytes par cytométrie de flux après 6 à 9 jours de culture liquide, montre que la stabilisation de P53 par le SAR405838 induit une diminution de la ploïdie moyenne (N=3,3 versus N= 4.4 dans les cellules contrôles). De plus, le nombre de proplaquettes (PPT) produites par des mégacaryocytes traitées par le SAR405838 à J10 diminue considérablement à une dose de 0.5 µM et est complètement abolie à 1 µM de SAR405838. L'inhibition de p53 par un sh dirigé contre P53 permet de restaurer la formation des PPT. Ainsi, la réduction de formation de PPT induite par le SAR405838 est bien dépendante de la stabilisation de P53. Celle-ci est également fonctionnelle dans les mégacaryocytes à J11 de la différenciation mégacaryocytaire puisqu'elle est associée à l'activation de p21, Bax, et PUMA.

Comme le problème majeur des antagonistes de MDM2 comme le RG7112 et le SAR405838 est la toxicité hématopoéïtique et en particulier la thrombocytopénie, nous avons testé si l'effet cytotoxique du SAR405838 pouvait être réversible par l'addition de forte dose de thrombopoïétine (TPO). Les mégacaryoblastes en culture liquide en présence de SCF et de faibles doses de TPO (1ng/ml) ont été traités à J6 pendant 48h avec du SAR405838 en présence ou pas de différentes doses de TPO. Nous montrons que l'augmentation de la dose de TPO ne restaure pas la toxicité induite par la stabilisation de TP53.

Les résultats sur la mégacaryopoïèse montrent que l'activation de P53 est plus cytotoxique durant les stades tardifs avec une IC50 =0.5 μ M versus 2.5 μ M sur les progéniteurs mégacaryopoïétiques.

Discussion :

Dans ce travail, nous montrons que l'axe MDM2-P53 est fonctionnel dans les progéniteurs

hématopoïétiques et au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire. De plus, la stabilisation de P53 par les antagonistes de MDM2 comme le SAR405838, mais aussi le MI-219 et la Nutlin qui sont moins puissants que le SAR405838 montre un effet délétère sur l'hématopoïèse. Tous les phénotypes observés avec le SAR405838 sont plus prononcés que ceux avec la Nutlin et le MI-219 qui ont une plus faible affinité pour MDM2.

Nos résultats montrent que SAR405838 induit un effet cytotoxique sur tous les progéniteurs hématopoïétiques (érythroïde, granuleux et mégacaryocytaires) y compris les progéniteurs immatures. La cytotoxicité induite par le SAR405838 sur les progéniteurs est non seulement dose dépendante mais aussi temps dépendante, ceci suggère que la réponse à SAR405838 est dépendante de la prolifération et du nombre de divisions cellulaires. Ces résultats sont similaires aux effets délétères de RG7112 sur les progéniteurs mégacaryocytaires (Iancu-Rubin et al. 2014). De plus, nous avons montré que l'effet sur les progéniteurs était irréversible puisque: i) même après lavage, l'effet cytotoxique de SAR405838 a persisté et ii) l'addition de TPO à haute dose n'a pas réussi à inverser cette toxicité. Ces résultats montrent que l'utilisation de TPO pour restaurer la thrombocytopénie induite par les antagonistes de MDM2, comme a été suggéré pour le RG7112 (Iancu-Rubin et al. 2014) serait inutile. Nous avons également montré que l'activation de p53 induite par le SAR405838, le MI-219 ou la Nutlin affecte aussi bien les stades précoces que tardifs de la mégacaryopoïèse mais avec une plus grande sensibilité sur les mégacaryocytes que sur les progéniteurs mégacaryocytaire. Cette sensibilité est due à l'augmentation de l'apoptose dépendante de P53 et à la diminution de la prolifération cellulaire. Le SAR405838 a aussi un impact négatif sur la polyploïdisation des mégacaryocytes. Ces effets des antagonistes de MDM2 sur la mégacaryopoïèse ont également été observés avec les inhibiteurs d'HDAC qui eux aussi impliquent des mécanismes dépendants de P53 (Ali et al. 2013). Enfin, le SAR405838 réduit considérablement la formation de proplaquettes l'abolissant à une concentration de 1µM. Les effets du SAR405838 sur la différenciation des mégacaryocytes sont en parfaite concordance avec ceux observés pour RG7112 sur les progéniteurs, la maturation et la formation de PPT (Iancu-Rubin et al. 2014).

De plus, nous avons observé que la réactivation de P53 par SAR405838 a aussi un impact sur la différenciation érythroïde et induit la diminution des cellules viables par induction d'apoptose. Les singes traités avec RG7112 montraient, d'ailleurs, une anémie modérée (Iancu-Rubin et al. 2014). Cependant, en clinique, 2 patients sur 20 présentaient une anémie modérée. Ceci corrèle avec le rôle de MDM2-P53 dans la régulation de l'érythropoïèse

comme le montre l'altération de l'érythropoïèse précoce et tardive observés dans les souris knock-out conditionnel pour MDM2 (Maetens et al. 2007). Il est aussi important de noter que l'anémie observée dans les syndromes 5q et de Blackfan-Diamond pourrait être liée à l'induction de p53 par un stress ribosomal (Dutt et al. 2011) (Komrokji et al. 2013) (Sieff et al. 2010).

Le fait que le SAR405838 affiche une toxicité générale sur tous les progéniteurs hématopoïétiques et pas spécifiquement sur les progéniteurs MK, semble en partie contradictoire à ce qui a été observé en clinique, puisque les patients présentent surtout une forte thrombocytopénie qui pourrait être expliquée par la sensibilité plus importante de la différenciation mégacaryocytaire à ces différents de MDM2.

Perspectives :

Il serait donc important de mesurer et d'analyser les paramètres sanguins des patients traités par le SAR405838, ceci permettra de comprendre d'éventuelles différences entre les phénotypes observés *in vivo* et *in vitro*. Les prélèvements de la moelle osseuse de patients thrombopéniques pourraient être instructifs pour savoir si le SAR405838 affecte uniquement la production des mégacaryocytes ou d'autres lignées. Le dosage plasmatique de la TPO pourrait également être utile, car dans ce cas, il reflèterait la masse mégacaryocytaire puisque en clinique, la thrombocytopénie observée semble être réversible en quelques semaines. Dans l'ensemble, nous suggérons que l'origine de la thrombocytopénie est liée à deux mécanismes différents: le premier sur les derniers stades tardifs de la différenciation des mégacaryocytes, plus particulièrement sur la formation des proplaquettes et le deuxième sur les progéniteurs immatures.

ARTICLE 3

«Impaired hematopoietic progenitors and megakaryopoiesis by

p53 activation»

Impaired hematopoietic progenitors and megakaryopoiesis by p53 activation

Emna Mahfoudhi ^{1,2,3,4,5}, Larissa Lordier ^{1,2,3}, Caroline Marty ^{1,2,3}, Jaijai Pan ^{1,2,3}, Anita Roy ^{1,2,3}, Lydia Roy ⁶, Philippe Rameau ⁷, Salem Abbes ⁵, Najet Debili ^{1,2,3}, Hana Raslova ^{1,2,3}, Yunhua Chang ^{1,2,3}, Laurent Debussche ⁸, William Vainchenker^{1, 2, 3, 4}, Isabelle Plo ^{1, 2, 3, 4}

- 1- INSERM, UMR 1170, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France
- 2- Université Paris-Saclay, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France
- 3- Gustave Roussy, Villejuif, France
- 4- Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif
- 5- Laboratoire d'hématologie moléculaire et cellulaire, Institut Pasteur de Tunis, Université de Tunis El Manar, Belvédère, Tunisie
- 6- Hôpital Henri-Mondor, Département of Clinical Hematology, Créteil.
- 7- Gustave Roussy, flow cytometry platform, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif,
 France
- 8- Sanofi Oncology, Vitry-sur-Seine, France

Corresponding authors: Isabelle Plo

UMR INSERM U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, isabelle.plo@gustaveroussy.fr,

Total word count: 2202 words

Number of figures: 7

Keywords: p53, progenitors, MDM2 inhibitors, megakaryopoiesis, apoptosis

Abstract (181 words)

TP53 also known as p53 is a tumor suppressor gene mutated in a variety of cancers. P53 is involved in cell cycle, apoptosis and DNA repair mechanisms and is thus tightly controlled by many regulators. Recently, strategies to treat cancer have focused on the development of MDM2 antagonists to induce p53 stabilization and restore cell death in p53 non-mutated cancers. However, some of these molecules display adverse effects in patients including thrombocytopenia. In the present study, we have explored the effect of SAR405838 not only on human megakaryopoiesis but also more generally on hematopoiesis. We compared its effect to MI-219 and Nutlin, which are less potent MDM2 antagonists than SAR405838. We found that all these compounds induce a deleterious effect on all types of hematopoietic progenitors, as well as on erythroid and megakaryopoiesis including ploidization and proplatelet formation. In conclusion, MDM2 antagonists induced a major hematopoietic defect *in vitro* as well as an inhibition of all stages of megakaryopoiesis that may account for *in vivo* thrombocytopenia observed in treated patients.

INTRODUCTION

TP53 is a tumor suppressor gene mutated in numerous cancers, including more than 50% of solid tumors and less than 5% of hematological malignancies. P53 mutations are loss-offunction affecting the DNA binding or the transactivation domain. P53 plays a key role in cell death regulation, cell cycle checkpoint and DNA repair control by regulating the expression of many genes such as P21, GADD45 and pro-apoptotic genes including PUMA, NOXA and the pro-apoptotic Bcl-2 family member called BAX[1, 2]. P53 protein levels are maintained at low levels due to a tight regulation by the ubiquitin ligase MDM2. In response to a cellular stress, the level and activity of p53 rise due to its stabilization following MDM2 degradation. Recently, strategies of treatment based on the stabilization of p53 have been considered in p53 non-mutated cancers and aim at disrupting the interaction between MDM2 and p53[3]. Thus, many MDM2 antagonists with various activities have been designed for solid tumors as well as hematological cancers [4-7]. Clinical and preclinical data in rats and monkeys have shown that some MDM2 antagonists such as Nutlin or the RG7112 compound led to a major thrombocytopenia associated with a neutropenia or less frequently with a mild anemia in monkeys[6, 8]. Similar adverse effects were found with the SAR405838 compound, which showed a hematopoietic toxicity with a reversible thrombocytopenia [9]. In vitro studies have also demonstrated that these molecules impair megakaryopoiesis mainly at the progenitor level, but also directly decrease mature megakaryocytes (MKs) and platelet production[8]. All these observations suggest that MDM2 antagonists profoundly affect megakaryopoiesis.

Megakaryopoiesis is a unique model of differentiation that combines two specific features: a physiological polyploidization of the bone marrow precursors known as MKs, and their cytoplasmic fragmentation at the end of their differentiation to produce mature circulating blood platelets.[10, 11] Ploidization is related to a process called endomitosis, which is a consequence of defective cytokinesis and karyokinesis.[12-14] The modal MK

ploidy in the marrow is 16N and the ploidy level can reach 64N or more, indicating that the MK cell cycle is not blocked at 4N [15, 16]. By increasing the size of the genome and the size of the cell at each round of DNA duplication[17, 18], polyploidization increases platelet production.[16] BAX has been found to play a major role in the p53-induced death by apoptosis of the MK,[19] proplatelet (PPT) formation and platelet shedding.[19, 20]

In the present study, we have explored the effect of SAR405838 not only on human megakaryopoiesis but also more generally on hematopoiesis. Moreover, we have compared its effect to the MI-219 compound, which is a less potent MDM2 antagonist than SAR405838[21]. Specifically, we have studied their effect on hematopoietic progenitors, on MK differentiation, ploidization and proplatelet formation.

RESULTS

Effect of p53 stabilization on CD34⁺ progenitors.

To investigate the impact of p53 stabilization on hematopoietic progenitors, CD34⁺ cells were cultured for one day in serum-free medium with TPO and SCF in the presence of the MDM2 antagonist SAR405838 before quantifying the p53 target genes by qRT-PCR. As shown in Figure 1A, SAR405838 induced a dose-dependent effect on *MDM2*, *PUMA* and *P21* expression confirming a functional p53 in these cells.

The effect of increasing concentrations of SAR405838 was tested on the number of progenitors by colony assays and compared to MI-219, a less potent MDM2 antagonist. SAR405838 induced a strong dose-dependent reduction of all the progenitors including the BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid), the CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage) and the CFU-MK (Colony Forming Unit-Megakaryocyte) compared to untreated control cells. SAR405838 induced a 50% reduction of BFU-E, CFU-GM and CFU-MK numbers around the dose of 0.5-1 μ M while MI-219 has a significant less potent activity compared to SAR405838 (Figure 1B/C/D).

To study the time-response effect of SAR405838 and its reversibility, CD34⁺ cells were seeded in serum-free medium supplemented with cytokines and exposed for 3 or 5 days to either SAR405838 or MI-219 at different concentration. The treated cells were washed and plated in colony assay to assess the number of progenitors. A 3-day SAR405838 treatment induced a strong reduction of all progenitors (BFU-E, CFU-GM and CFU-MK) decreasing even further after 5 days of treatment. IC50 were around 2 μ M after 3 days of treatment (Figure 2A/B/C) and 0.5 to 1 μ M after 5 days (Figure 2D/E/F). These results strongly suggest that the deleterious effect of MDM2 antagonist is related to the number of cell division and is not reversible.

Then, we tested the dose-effect of SAR405838 on immature CD34⁺CD38⁻ progenitors (a

population enriched in hematopoietic stem cells) in comparison to the more mature CD34⁺CD38⁺ progenitors. The CD34⁺CD38⁻ progenitors were slightly more sensitive to SAR405838 than the CD34⁺CD38⁺ progenitors, especially the BFU-E (Figure 3A/B/C). Altogether, p53 activation induced an irreversible deleterious effect of all hematopoietic progenitors including immature progenitors.

Effects of p53 activation during erythroid differentiation.

The effect of p53 stabilization was explored during erythroid differentiation. For that purpose, CD34⁺ progenitors were cultured in serum-free medium with SCF and EPO for 8 days. SAR405838- or MI-219-treated erythroblasts were analyzed for p53 expression by westernblot. As shown in Figure 4A, SAR405838 induced an increase in p53 expression compared to untreated cells and at higher levels than MI-219 as expected for this less potent MDM2 antagonist. Day 8-erythroblasts were treated with various doses of SAR405838 or MI-219 for 48 hours. The viable cells were counted by trypan blue exclusion and the apoptotic cells were quantified by flow cytometry analysis using annexin V/ propidium iodide labeling. As shown in the Figure 4B/C, SAR405838 induced a great decrease in viable cells compared to MI-219 and the IC50 was 0.5 μ M for SAR405838. Concomitantly, apoptotic cells increased in a dosedependent manner with a 48 hour SAR405838 treatment as low as 0.5 μ M.

Altogether these results showed that SAR405838 by p53 stabilization has a cytotoxic effect on the erythroid lineage, which is as sensitive as progenitors.

Effects of p53 stabilization on the viability of CD34⁺ progenitors at early stages of megakaryocytic differentiation.

We explored the effect of p53 stabilization on the viability of CD34⁺ progenitors at early stage of megakaryocytic differentiation. CD34⁺ progenitors were cultured for one day in

serum-free medium supplemented with SCF and TPO and treated with SAR405838 or MI-219. After a 48 or 72 hour incubation, cells were counted by trypan blue exclusion and apoptotic cells were quantified by flow cytometry using Annexin V / Propidium iodide labeling. SAR405838 induced a great decrease in the number of viable cells compared to MI-219 or control and the IC50 was found to be around 1.5 μ M at 48 hours and 72 hours of SAR405838 treatment (Figure 5A). Concomitantly, apoptotic cells increased in a dosedependent manner for 48 hours of SAR405838 treatment as low as 1 μ M.

Altogether these results confirmed previous finding showing that p53 stabilization has a cytotoxic effect on progenitor cells harboring early stages of MK differentiation at a similar range of concentration than found for the inhibition of their cloning efficiency.

Effects of p53 stabilization during megakaryocytic differentiation.

We also explored the effects of p53 stabilization at later stage of megakaryocytic differentiation. CD34⁺ progenitors were cultured in serum-free medium with SCF and TPO. Day 7-MKs were treated with 5 μ M Nutlin 3a for 24 or 48 hours, which led to an increase levels of p53, p21, BAX, BCL2 and BCL-XL confirming a functional p53 activity (Figure 6A). Similar results were obtained with SAR405838 (1 μ M, 24 hours) in day 11-MKs with a significant increase in *P21, BAX, PUMA* and *BCL2L1* transcripts compared to 1 μ M MI-219 or untreated control (Figure 6B). Consequently, we observed an increase in apoptotic cells in day 8-MKs exposed after 24 hours treatment with 5 μ M Nutlin 3a but not with Nutlin 3b (an inactive compound) or control (Figure 6C). Similar results were found with day 6-megakaryoblasts treated with two doses of SAR405838 for 72 hours (Figure 6D/E) without any major effect on the megakaryocytic differentiation monitored by the percentage of CD41⁺ cells (Figure 6F). As shown in Figure 6D/E, the SAR405838 at the dose of 0.5 μ M induced a 50% decreased in the number of viable cells while the apoptotic cells reached 50% of the total

cells. We checked if the effect of SAR405838 on MKs could be reverted by the addition of high TPO doses. $CD34^+$ progenitors were cultured in serum-free medium supplemented with SCF and low dose of TPO (1 ng/mL) for 6 days. Day 6-megakaryoblasts were then treated with 1.5 μ M of SAR405838 for 48 hours and various doses of TPO. As shown in the Figure 6G, increasing doses of TPO were unable to revert the effect of SAR405838-mediated MK apoptosis demonstrating an irreversible effect of SAR405838.

Altogether these results showed that p53 reactivation has a stronger cytotoxic effect during late stages of megakaryocytic differentiation with a lower IC50 (0.5 μ M) than on MK progenitors (2.5 μ M).

Effects of p53 stabilization on late stages of megakaryocyte differentiation

First, we investigated if MDM2 inhibitors affect MK ploidization. SAR405838 induced a significant reduction in the mean ploidy (3.0 N at the dose of 1μ M versus 4.4 N for untreated control or for MI-219 treatment) (Figure S1).

Then, we explored the effects of p53 stabilization on proplatelet formation (the step before platelet release). On day 10-MKs, proplatelet formation was inhibited with 0.5 μ M SAR405838 and completely abrogated at 1 μ M (Figure 7A). To confirm that this was due to p53 stabilization, we knocked down *p53* with 2 shRNA showing a decrease in P53 RNA and protein level (Figure 7B/C) and reduced expression of p53 targets (Figure 7D). Both shRNA against p53 significantly reverted the effect of SAR405838 on PPF (Figure 7E). This result clearly demonstrates that the drastic effect of SAR405838 on terminal MK differentiation is directly linked to p53 activation and not to an off-target effect.

Discussion

In this study, we showed that the MDM2/p53 axis is functional in hematopoietic progenitors, and during erythroid and megakaryocytic differentiation. Moreover, p53 stabilization by MDM2 antagonists such as Nutlin, MI-219 [21] or a more potent one SAR40583, has a major impact on hematopoiesis. All the phenotypes observed in presence of SAR405838 were more pronounced than those with MI-219 or Nutlin that display lower binding affinities to MDM2[9, 21].

Our results mainly show that SAR405838 induces a cytotoxic effect in all hematopoietic progenitors (erythroid, granulocytic, monocytic and megakaryocytic) including immature progenitors. SAR405838 induced not only a dose-response but also a time-response cytotoxicity on progenitors suggesting that it is related to the proliferation and cell division. These results agree with those showing the deleterious effect of RG7112 on megakaryocytic progenitors[8]. Moreover, the effect on progenitors was irreversible since: i) the cytotoxic effect persisted even after the compound was washed and ii) high doses of TPO failed to revert the toxicity. These results demonstrate that the use of TPO or TPO mimetics to rescue MDM2 antagonist-mediated thrombocytopenia would be useless.

We have also shown that p53 reactivation induced by SAR405838, MI-219 or Nutlin affects early and late stages of megakaryopoiesis with a greater sensitivity on mature MKs than on MK progenitors. The sensitivity was clearly due to an increased apoptosis and a decrease in viable cells. Moreover, SAR405838 negatively impacts on the ploidization of MKs leading to hypoploid MKs. These effects of MDM2 antagonists on megakaryopoiesis are quite similar to those of HDAC inhibitors, which also involve p53-dependent mechanism [22]. Finally, 0.5µM SAR405838 drastically decreased while 1µM completely abolished the PPT formation. Moreover, the effect of MI-219 was less potent than SAR405838. These effects on the MK differentiation completely matched with the results found for RG7212 on progenitors, maturation, ploidization and proplatelet formation [8].

We also observed that p53 reactivation induced by SAR405838 impacts other lineages such as the erythroid differentiation with a decrease in viable cells due to apoptosis. Mild anemia was observed in monkeys treated with RG7112 [8]. This finding correlates well with the role of MDM2/p53 in the regulation of erythropoiesis, which has been suggested by the defects in early and late erythropoiesis observed in mice with a conditional *Mdm2* knockout[23]. Noteworthy, the pathogenesis of the anemia in 5q- and Diamond–Blackfan syndromes could be related to p53 induction by a ribosomal stress[24-26].

The fact that SAR405838 displays a general toxicity on all hematopoietic progenitors and not specifically on MK progenitors seems in part contradictory to what was found in clinics since the patients harbor a strong thrombocytopenia associated or not with other cytopenia. Dissecting the blood parameters of the treated patients would be crucial to understand if they are real difference between *in vivo* and *in vitro* effects.

In clinics, the effect on thrombocytopenia seems reversible in a few weeks. Overall, the major hypothesis to explain the thrombocytopenia may be related to two different non exclusive mechanisms: one on late stages of MK differentiation, particularly the PPT formation and another one on immature progenitors. However, a depletion in immature progenitors would lead to a prolonged thrombocytopenia with a mild neutropenia and anemia. However, as this toxic effect requires several mitosis and early progenitors are mostly quiescent, this may explain that MDM2 inhibitors mostly target mature progenitors. Therefore, one can speculate that the major effect of p53 reactivation *in vivo* is related to late stages of MK differentiation and platelet formation.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

SAR405838 and MI-219 were provided by Dr Laurent Debussche (Sanofi R&D Vitry-sur-Seine France). Nutlin3 a and b were a gift from Dr. Vassilev (Roche, Nutley, USA). Nutlin-3 was purchased from Calbiochem (Merck, Nottingham, UK).

CD34⁺cell isolation

CD34⁺cells were obtained from leukapheresis samples after mobilization of donors after informed consent in agreement with our Institute Ethic Committee (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) and in accordance with the Declaration of Helsinki. CD34⁺cells were isolated by a positive selection using an immunomagnetic cell sorting system (AutoMacs; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

Hematopoietic progenitor cell assays

500 to 1000 normal CD34⁺cells were plated either in 1% methylcellulose assay (StemCells technologies, Vancouver, Canada) to quantify erythroid (BFU-E) and granulocytic (CFU-GM) progenitors or in serum-free fibrin clot assay for quantification of MK progenitors (CFU-MK) in the absence or presence of various concentration of SAR405838 or MI-219. Cultures in methylcellulose were stimulated by addition of human recombinant growth factors: G-CSF (20 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL) SCF (25 ng/mL, Biovitrum AB, Stockholm, Sweden), IL-6 (10 ng/mL), FLT3 (10 ng/mL) and human EPO (1 U/mL). Cultures in fibrin clot were stimulated with 10 ng/mL TPO (Kirin Brewery, Tokyo, Japan) and 25 ng/mL SCF. BFU-E and CFU-GM colonies were enumerated at day 14 day of culture. CFU-MK colonies were enumerated at day 12 after labeling by an indirect immuno-alkaline phosphatase staining technique using an anti-CD41a monoclonal antibody (MoAb; Becton Dickinson, le Pont de

Claix, France; clone HIP8), as previously described. [27]

Cell culture conditions

Normal CD34⁺ cells were cultured in serum-free medium supplemented with SCF (25 ng/mL), EPO (1 U/mL) and 15% of fetal calf serum for erythroblasts to induce erythroid differentiation. CD34⁺ cells were cultured in serum-free medium in the presence of TPO (10 ng/mL) and SCF (25 ng/mL) to induce megakaryocyte differentiation.

Lentivirus production

Lentiviruses encoding GFP and three different short hairpin RNA (shRNA) targeting p53 (0, 2 and 4) shRNA-0: *gactccagtggtaatctac* shRNA-2: *gagggatgtttgggagatg;* shRNA-4: *cggcgcacagaggaagaga* or a shRNA control were prepared and stored as previously described. [28]

Real Time quantitative RT-PCR

PCRs were carried out in the ABI Prism GeneAmp 5700 (Perkin-Elmer) using the Power SYBR-Green PCR Master Mix (ABI) containing the specific primers. The expression levels of all genes were calculated relatively to HPRT or to PPIA housekeeping gene.

Western blot analysis

Expression levels were performed by western-blot analysis using mouse anti-p53 and anti-βactin (Sigma-Aldrich), anti-BAX (Oncogene), anti-p21 (Beckton Dickenson), anti-MDM2 (BD Pharmingen), anti-BCL-XL, and rat anti-HSC70 (Stressgen). Proteins were quantified by Image J software.

Apoptosis assay

Apoptosis was measured by Annexin V-FITC detection kit (BD Pharmigen, San Diego, CA) and analyzed by flow cytometry on a LSRII (Becton Dickinson Mountain View, CA).

Proplatelet formation assay

 $CD41^+GFP^+$ MKs were sorted at day 8 of culture and plated in 96-well plates at a concentration of 2,000 cells/well in serum-free medium containing TPO, and quantification of PPT MK was performed as previously described[29]. The percentage of PPT MKs was estimated by counting MKs exhibiting one or more cytoplasmic processes with areas of constriction. A total of 200 cells per well were counted during 4 days. Images were obtained using an inverted microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) at a magnification of 40× using the Axio Vision 4.6 software.

Acknowledgments

We thank Kirin Brewery (Tokyo, Japan) and Amgen (Thousand Oaks, California) for their generous gift of recombinant TPO and SCF.

Conflict of interest disclosure

This work was supported in part by funds provided by Sanofi (Sanofi R&D Vitry-sur-Seine France)

Grant support

This work was supported by grants from ANR (ANR-blanc thrombocytosis and ANR-13-JSV1-0007-02)(IP, VW) and from the Ligue Nationale contre le Cancer (WV, HR équipe labellisée 2012, 2016). Labex GR-Ex (IP, WV) is funded by the program "Investissements d'avenir". EM was supported by grants from Sanofi.

REFERENCES

1. Toledo F and Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. Nat Rev Cancer. 2006; 6(12):909-923.

2. Vousden KH and Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. Cell. 2009; 137(3):413-431.

3. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N and Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science. 2004; 303(5659):844-848.

4. Ding Q, Zhang Z, Liu JJ, Jiang N, Zhang J, Ross TM, Chu XJ, Bartkovitz D, Podlaski F, Janson C, Tovar C, Filipovic ZM, Higgins B, Glenn K, Packman K, Vassilev LT, et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. J Med Chem. 2013; 56(14):5979-5983.

5. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Shikami M, Cabreira-Hansen M, McQueen T, Ruvolo V, Tsao T, Zeng Z, Vassilev LT and Andreeff M. MDM2 antagonists induce p53dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. Blood. 2005; 106(9):3150-3159.

6. Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, Heil F, Rueger R, Graves B, Ding M, Geho D, Middleton SA, Vassilev LT, Nichols GL and Bui BN. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. Lancet Oncol. 2012; 13(11):1133-1140.

7. Tovar C, Graves B, Packman K, Filipovic Z, Higgins B, Xia M, Tardell C, Garrido R, Lee E, Kolinsky K, To KH, Linn M, Podlaski F, Wovkulich P, Vu B and Vassilev LT. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. Cancer Res. 2013; 73(8):2587-2597.

8. Iancu-Rubin C, Mosoyan G, Glenn K, Gordon RE, Nichols GL and Hoffman R. Activation of p53 by the MDM2 inhibitor RG7112 impairs thrombopoiesis. Exp Hematol. 2014; 42(2):137-145 e135.

9. Wang S, Sun W, Zhao Y, McEachern D, Meaux I, Barriere C, Stuckey JA, Meagher JL, Bai L, Liu L, Hoffman-Luca CG, Lu J, Shangary S, Yu S, Bernard D, Aguilar A, et al. SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. Cancer Res. 2014; 74(20):5855-5865.

10. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N and Vainchenker W. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. J Thromb Haemost. 2009; 7 Suppl 1:227-234.

11. Deutsch VR and Tomer A. Advances in megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis: from bench to bedside. Br J Haematol. 2013.

12. Geddis AE and Kaushansky K. Endomitotic megakaryocytes form a midzone in anaphase but have a deficiency in cleavage furrow formation. Cell Cycle. 2006; 5(5):538-545.

13. Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, Vainchenker W and Chang Y. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. Blood. 2008; 112(8):3164-3174.

14. Lordier L, Pan J, Naim V, Jalil A, Badirou I, Rameau P, Larghero J, Debili N, Rosselli F, Vainchenker W and Chang Y. Presence of a defect in karyokinesis during megakaryocyte endomitosis. Cell Cycle. 2012; 11(23):4385-4389.

15. Zimmet J and Ravid K. Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. Exp Hematol. 2000; 28(1):3-16.

16. Ravid K, Lu J, Zimmet JM and Jones MR. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. J Cell Physiol. 2002; 190(1):7-20.

17. Sher N, Von Stetina JR, Bell GW, Matsuura S, Ravid K and Orr-Weaver TL. Fundamental differences in endoreplication in mammals and Drosophila revealed by analysis of endocycling and endomitotic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013.

18. Raslova H, Roy L, Vourc'h C, Le Couedic JP, Brison O, Metivier D, Feunteun J, Kroemer G, Debili N and Vainchenker W. Megakaryocyte polyploidization is associated with a functional gene amplification. Blood. 2003; 101(2):541-544.

19. Josefsson EC, James C, Henley KJ, Debrincat MA, Rogers KL, Dowling MR, White MJ, Kruse EA, Lane RM, Ellis S, Nurden P, Mason KD, O'Reilly LA, Roberts AW, Metcalf D, Huang DC, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. The Journal of experimental medicine. 2011; 208(10):2017-2031.

20. Zauli G, Vitale M, Falcieri E, Gibellini D, Bassini A, Celeghini C, Columbaro M and Capitani S. In vitro senescence and apoptotic cell death of human megakaryocytes. Blood. 1997; 90(6):2234-2243.

21. Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, Nikolovska-Coleska Z, Ding K, Wang G, Chen J, Bernard D, Zhang J, Lu Y, Gu Q, Shah RB, Pienta KJ, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(10):3933-3938.

22. Ali A, Bluteau O, Messaoudi K, Palazzo A, Boukour S, Lordier L, Lecluse Y, Rameau P, Kraus-Berthier L, Jacquet-Bescond A, Lelievre H, Depil S, Dessen P, Solary E, Raslova H, Vainchenker W, et al. Thrombocytopenia induced by the histone deacetylase inhibitor abexinostat involves p53-dependent and -independent mechanisms. Cell Death Dis. 2013; 4:e738.

23. Maetens M, Doumont G, Clercq SD, Francoz S, Froment P, Bellefroid E, Klingmuller U, Lozano G and Marine JC. Distinct roles of Mdm2 and Mdm4 in red cell production. Blood. 2007; 109(6):2630-2633.

24. Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, Wilson FH, Currie T, Khanna-Gupta A, Berliner N, Kutok JL and Ebert BL. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. Blood. 2011; 117(9):2567-2576.

25. Komrokji RS, Padron E, Ebert BL and List AF. Deletion 5q MDS: molecular and therapeutic implications. Best Pract Res Clin Haematol. 2013; 26(4):365-375.

26. Sieff CA, Yang J, Merida-Long LB and Lodish HF. Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia. Br J Haematol. 2010; 148(4):611-622.

27. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J and Vainchenker W. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. Blood. 1996; 88(4):1284-1296.

28. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR and Fearon ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. Curr Biol. 2007; 17(15):1298-1307.

29. Chang Y, Aurade F, Larbret F, Zhang Y, Le Couedic JP, Momeux L, Larghero J, Bertoglio J, Louache F, Cramer E, Vainchenker W and Debili N. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. Blood. 2007; 109(10):4229-4236.
Figures legend

Figure 1: Effects of SAR405838 on CD34⁺ progenitors. A) Dose-effect of SAR405838 on p53 target genes by qRT-PCR. CD34⁺ cells were treated with SAR405838 at various doses (0, 0.75M, 1.5 μ M, 2.5 μ M and 5 μ M). The expression of *P53* and its targets (*MDM2*, *PUMA*, *P21*) were quantified by qRT-PCR related to *PPIA*. Results are the mean \pm SEM of 2 independent experiments in duplicate. B, C, D) Cells were seeded in methylcellulose (B, C) or in fibrin clot (D) in the presence of MI-219 or SAR405838 to assay the number of BFU-E, CFU-GM and CFU-MK progenitors. Results are presented as percentage compared to control. Results represent the mean of 3 experiments for BFU-E and CFU-GM and 3 experiments for CFU-MK made in triplicate. * represents statistical significance using student *t* test (* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Figure 2: Irreversibility of SAR405838 on CD34⁺ progenitors. A, B, C, D, E, F) Cells were treated with various doses of MI-219 or SAR405838 for 3 days (A, B, C) or 5 days (D, E, F), washed and seeded in methylcellulose (A, B, D, E) or in fibrin clot (C, F) to assay the number of BFU-E, CFU-GM and CFU-MK progenitors. Results are presented as percentages compared to control. The results represent the mean of 2 experiments made in triplicate. * represents statistical significance (* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

Figure 3: Effect of SAR405838 on immature and committed progenitors. A, B, C,) Cells were sorted either as CD34⁺CD38⁻ immature cells or as CD34⁺CD38⁺ committed cells. They were seeded in methylcellulose (A, B) or in fibrin clot (C) in the presence of various doses of MI-219 or SAR405838 to assay the number of BFU-E, CFU-GM and CFU-MK progenitors. Results are presented as percentages compared to control. The results represent the mean of 2

experiments made in triplicate * represents statistical significance between CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells (* P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)

Figure 4: Effect of SAR405838 on erythroid differentiation. A) Day 8-erythroblasts treated with MI-219 or SAR405838 were analyzed for p53 expression by western-blot. β-actin was used as loading control. B) Day 8-erythroblasts were treated with various doses of MI-219 or SAR405838 for 48 hours and counted by trypan blue exclusion. C) Day 8-erythroblasts were treated with various doses of MI-219 or SAR405838 for 48 hours and counted by trypan blue exclusion. C) Day 8-erythroblasts were treated with various doses of MI-219 or SAR405838 for 48 hours and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using Annexin V⁺ assay. The results represent the mean of 3 independent experiments. * represents statistical significance (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)

Figure 5: Effect of SAR405838 on early stage of megakaryocytic differentiation. $CD34^+$ cells were cultured for one day and then treated with various doses of MI-219 or SAR405838 for 48h or 72h. A) Cells were counted by trypan blue exclusion. B) Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using Annexin V⁺ assay. The results represent the mean of 3 independent experiments. * represents statistical significance (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001)

Figure 6: Effect of p53 reactivation on late stage of megakaryocytic differentiation. A) Day 10-MK treated with Nutlin 3a (5 μ M for 24h or 48h) were analyzed for p53, p21, Bax, Bcl-2, Bcl-xL expression by western-blot. β-actin was used as loading control. B) Day 11-MKs treated with MI-219 or SAR405838 (5 μ M for 24h) were analyzed for p53 expression by western-blot. β-actin was used as loading control. In parallel, the expression of *P53, BAK,*

BCL2L1, NOXA, PUMA, BAX, P21 and P53 were quantified by qRT-PCR related to *HPRT*. C) Day 7-megakaryoblasts were exposed to 5 μ M Nutlin 3a or Nutlin 3b for 24 hours and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using Annexin V assay. (n=3). D, E, F) Day 6-megakaryoblasts were exposed to MI-219 or SAR405838 (0.5 or 1 μ M for 72h) and cell viability (D), apoptosis (E) or CD41 expression (F) were investigated. The results represent the mean of 2 experiments. * represents statistical significance (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001). G) Day 6-megakaryoblasts were exposed to SAR405838 (1.5 μ M for 48h) in the presence of various doses of TPO and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry using annexin V assay. One representative experiment (n= 2).

Figure 7: Effects of p53 stabilization on PPF formation. A) Percentage of proplatelet-forming day 10-MKs after incubation with 0.5 or 1 µM of SAR405838 or MI-219. The percentage of proplatelet-forming MKs was estimated by counting MKs exhibiting one or more cytoplasmic processes with areas of constriction. A total of 200 cells per well were counted during 4 days. Error bars in histograms represent the SD of one representative experiment performed in triplicate wells. Similar results were obtained in 3 repeated experiments. * represents statistical significance (**P<0.01). B) Cells were transduced at day 4 of culture with a control lentivirus (shCnt) or a lentivirus encoding either shRNA p53 (shp53 0) or (shp53 2/4) and p53 protein level in GFP⁺/CD41⁺ sorted cells was analyzed at day 9 of culture by western-blot. β -actin was used as internal loading control. C) Real-time PCR was used to quantify p53-dependent genes in p53 knockdown day 9-MKs and related to HPRT (n=5). D) p53, MDM2, BCL-XL, BAX and p21 protein levels were analyzed in GFP⁺/CD41⁺ sorted cells by Western blot (at days 10 and 13 of culture). β-actin was used as loading control. (n=3) * represents statistical significance (**P<0.01). E) Percentage of shCnt and shp53transduced proplatelet-forming MKs exposed to 0.25 or 1 µM SAR405838 or MI-219. Day 8-MKs were sorted on the expression of GFP and CD41. Day 10-MKs were seeded with or without SAR405838 at 2x10³ cells/well in 96-well plate. A total of 200 cells per well were counted during 4 days (from day 11 to day 14). The histogram represents the percentage of proplatelet-forming MKs at day 12 of culture. (n=3) * represents statistical significance (**P<0.01).





Mahfoudhi et al., Figure 1















F

D

Е







Mahfoudhi et al., Figure 3





Α





Mahfoudhi et al., Figure 4



Mahfoudhi et al., Figure 5











D







Mahfoudhi et al., Figure 7

Impaired hematopoietic progenitors and megakaryopoiesis by p53 activation

Emna Mahfoudhi ^{1,2,3,4,5}, Larissa Lordier ^{1,2,3}, Caroline Marty ^{1,2,3}, Jaijai Pan ^{1,2,3}, Anita Roy ^{1,2,3}, Lydia Roy ⁶, Philippe Rameau ⁷, Salem Abbes ⁵, Najet Debili ^{1,2,3}, Hana Raslova ^{1,2,3}, Yunhua Chang ^{1,2,3}, Laurent Debussche ⁸, William Vainchenker^{1, 2, 3, 4}, Isabelle Plo ^{1, 2, 3, 4}

Supplemental Figure legends:

Figure S1 : Effect of SAR405838 on polyploidization. Day 6 megakaryoblasts were treated for 72 hours with various doses of MI-219 or SAR405838. At day 9, ploidy was analyzed by flow cytometry using a CD41/CD42/vital Hoechst staining. N represents the mean ploidy. As shown, SAR405838 induced a significant reduction in the mean ploidy (3.0N at the dose of 1 μ M versus 4.4N for control or for MI-219 treatment)

The Figure illustrates a representative experiment in triplicate. Two other experiments in triplicate gave similar results



Mahfoudhi et al., Figure S1

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Partie I : La surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5-hmC induit l'instabilité génomique et augmente la mutagenèse en absence de TDG:

L'objectif général du projet était de déterminer si TET2, via l'activation de la déméthylation active de l'ADN, jouait un rôle sur la stabilité du génome. Nous avons observé que la surexpression de TET2 entraîne un ralentissement du cycle cellulaire et une importante aneuploïdie associée à une instabilité centrosomique dans les cellules Ba/F3-EPOR. Ce phénomène est dépendant du site catalytique. Notre étude a aussi permis de montrer que TET2 peut induire une mutagenèse spontanée dans un contexte déficient en *tdg* avec un spectre de mutagenèse de C->T. Ce résultat suggère que l'accumulation de 5-hmC ou 5-hmU induit un phénotype mutateur.

I- Surexpression de TET2 et ralentissement du cycle cellulaire

Nous pensons que le ralentissement de la progression en phase S du cycle cellulaire, induit par la surexpression de TET2 WT est due à la présence des 5-hmC. En effet, l'accumulation des 5-hmC pourrait freiner la réplication de l'ADN possiblement par une mauvaise reconnaissance de la base modifiée par l'ADN polymérase. Ainsi, les 5-hmC seraient assimilées par les systèmes de réparation à des dommages de l'ADN, ce qui ralentirait ou bloquerait la progression de la machinerie de réplication. Il serait intéressant d'étudier les origines de réplication ainsi que la vitesse d'élongation des fourches de réplication par peignage moléculaire. Alternativement, on peut émettre l'hypothèse que TET2 pourrait contrôler l'expression des protéines du cycle, en régulant la méthylation de certains promoteurs. En particulier, TET2 pourrait réguler les cyclines A ou E qui en se fixant à CDK2 (cyclin-dependent kinase 2), sont requises pour la transition G1/S et S, respectivement. Ainsi, TET2 comme d'autres suppresseurs de tumeurs, notamment P53 pourrait être capable de réguler le cycle cellulaire (Gudkov et Komarova 2010). Une étude dans ce sens rapporte que la surexpression de Tet1 dans la lignée MGC-803 (un modèle cellulaire de cancer gastrique) est associée à une faible prolifération et à une déméthylation notamment du promoteur de la DNA-PK qui permet d'activer P53 (Fu et al. 2014). Ces données montrent aussi que l'activation des TET et des 5-hmC permet l'expression de facteur impliqué dans la réparation d'ADN comme la DNA-PK (élément important de la recombinaison non homologue). Hajkova et al ont aussi montré que l'expression des protéines TET1 et TET2 augmente de façon concomitante à celle des protéines XRCC1 et APE1 impliquées dans le BER lors de la déméthylation dans les cellules primordiales germinales (Hajkova et al. 2010). Il serait donc important d'étudier l'expression des protéines impliquées dans la voie de réparation BER (comme APE1 et XRCC1) après induction de la surexpression de TET2. Il faudrait aussi étudier l'implication de TET2 dans d'autres voies de réparation telle que la voie de réparation par excision de nucléotide, la recombinaison ou la réparation des mésappariements de bases (MMR). Dans ce contexte, nous envisageons d'étudier en collaboration avec l'équipe de Murat SAPARBAEV (Gustave Roussy), l'effet de la surexpression de TET2 en absence de MSH2, une protéine clé dans la voie MMR.

II- Surexpression de TET2 et instabilité chromosomique

Nous montrons que la surexpression de TET2 induit une aneuploïdie significative associée à des aberrations de nombre de centrosomes par cellule au cours de la métaphase. Ces résultats nous poussent à penser que les 5-hmC pourraient être considérées comme des dommages de l'ADN. En effet les dysfonctionnements de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN qui génèrent des dommages à l'ADN, induisent de fortes instabilités chromosomiques associées à des défauts de centrosomes. C'est le cas notamment pour des défauts des protéines du BER comme XRCC1 ou de la recombinaison homologue comme RAD51, XRCC2 ou XRCC3 ou encore de P53 (Daboussi et al. 2005) (Sonoda et al. 1998) (Deans et al. 2003) (Griffin and Thacker 2004). L'instabilité chromosomique pourrait être aussi liée à la déméthylation puisque celle-ci a été corrélée à l'instabilité chromosomique. En effet, les souris hypomorphes pour *Dnmt1* qui présentent une hypométhylation génomique dans tous les tissus, développent des lymphomes T agressifs avec une instabilité chromosomique et une fréquence élevée de trisomie 15 (Gaudet et al. 2003). Une augmentation de la fréquence des réarrangements chromosomiques telle que la perte de l'hétérozygotie a aussi été observée dans les cellules souches embryonnaires de souris mutantes pour *Dnmt1* (Trinh et al. 2002).

De façon intéressante, il a été rapporté qu'EVI1, un facteur de transcription hématopoïétique fréquemment surexprimé dans les hémopathies malignes myéloïdes humaines (Kustikova et al. 2013) et qui régule l'autorenouvellement de la cellule souche et induit des modifications épigénétiques (Lugthart et al. 2011) induit une instabilité chromosomique associée à des anomalies du nombre de centrosomes via une cytokinèse anormale (Karakaya et al. 2012). Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de TET2 sur la formation du fuseau mitotique au cours de la mitose par vidéo-microscopie ainsi que sa localisation en examinant avec

attention sa co-localisation avec la γ -tubuline au niveau des centrosomes. L'impact sur les kinases impliquées dans la régulation du cycle des centrosomes comme les Aurora pourrait être aussi étudié.

III- TDG/TET2 un partenariat pour la maintenance de la déméthylation et de l'intégrité du génome.

La transition $C \rightarrow T$: le type de mutation la plus fréquente dans le génome humain est la transition de G>A ou C>T dans les sites CpG. Elle représente 23% des mutations dans les maladies héréditaires humaines et 24% des polymorphismes (SNP) (Krawczak et al. 1998) (Tomso and Bell 2003). Dans les cancers humains, les transitions au niveau des CpG représentent environ 24% des mutations de *P53*, y compris au niveau des « hot spot » (Waters et Swann 2000). La prédominance de ces mutations est due en grande partie au caractère hautement mutagène des paires de bases G:C à A:T au niveau des sites CpG. Elles sont les conséquences des mésappariements G:T non réparés qui résultent de déamination spontanée des 5-mC dans les CpG. Les 5-mC sont beaucoup moins stables que la cytosine et peuvent être déaminées de façon spontanée en thymine avec une fréquence 5 fois plus élevée que pour la cytosine non méthylée (Kumar et Subramanian 2002). Notre étude montre aussi que les 5-mC peuvent être mutagènes et induire des transitions de C->T en absence d'une protéine impliquée dans la réparation des cytosines déaminées : TDG (**Figure 13**).

TDG protège les ilots CpG de l'hyperméthylation:

TDG joue un rôle important non seulement dans le maintien de l'intégrité génétique mais aussi de la régulation épigénétique. TDG excise la thymine à partir des mésappariements G :T entrainées par la déamination des 5-mC et d'autres lésions comme l'uracile (U) et les 5-hmU. Au cours de la déméthylation de l'ADN, TDG est capable d'exciser aussi les 5-fC et les 5-caC générées à partir des 5-mC par les enzymes TET. Les souris *Tdg Knock-out* ne sont pas viables (Cortellino et al. 2011) (Cortazar et al. 2011), et la réparation du mésappariement G:T a été trouvée abolie dans les extraits nucléaires MEF $tdg^{-/-}$ (Cortellino et al. 2011) (Cortazar et al. 2011).

En plus de sa fonction catalytique, TDG peut affecter la déméthylation et l'activation de la transcription en agissant comme co-activateur ou comme protéine de structure dans des complexes intervenant dans la déméthylation. TDG pourrait par exemple favoriser l'ouverture

de la chromatine et la transcription via des interactions protéines-protéines (Bird 2002) et (Illingworth and Bird 2009). L'interaction de TDG avec DNMT3a et DNMT3b résulte dans la stimulation de l'activité de TDG et dans une inhibition de l'activité DNMT3a (Li et al. 2007) (Boland et Christman 2008). Par ailleurs, TDG interagit aussi avec l'histone acétyltransférase p300 et CREB- binding protein (CBP) (Tini et al. 2002), ce qui permet de protéger les ilots CpG de l'hyperméthylation et d'activer la transcription (Cortellino et al. 2011) et (Cortazar et al. 2011). Grace à ce rôle de co-activateur de la transcription, TDG module l'activité de nombreux récepteurs d'hormones nucléaires comme le récepteur alpha de l'œstrogène (ERa) ou les récepteurs de l'acide rétinoïque (Tini et al. 2002), (Cortellino et al. 2011), (Chen et al. 2003), (Missero et al. 2001) et (Um et al. 1998). TDG est aussi impliquée dans le contrôle de la déméthylation des promoteurs de nombreux gènes qui sont impliqués dans l'embryogénèse et le développement (Maiti and Drohat 2011) (Cortellino et al. 2011) et (Cortazar et al. 2011). En absence de TDG, il a été observé une perte des marques activatrices des histones (H3K9ac, H3K14ac, H3K4me2) et une augmentation des marques répressives des histones (H3K27me3 et H3K9me3) (Cortellino et al. 2011) et (Cortazar et al. 2011). Ainsi, TDG interagit avec les facteurs de transcription, les DNMT et les histones acetyltransférases pour protéger les ilots CpG de l'hyperméthylation (Chen et al. 2003) (Li et al. 2007) (Gallais et al. 2007) (Tini et al. 2002).

Au total, les cellules déficientes en TDG présentent deux altérations majeures: d'une part une réduction de la capacité de réparation par BER induisant une augmentation de la sensibilité aux dommages mutagènes et l'accumulation de mutations et d'autre part la perte de la capacité à déméthyler les régions promotrices ce qui entraine une expression inappropriée des gènes.

On peut donc penser que TET2 et TDG agissent en partenariat pour maintenir une déméthylation des CpG et une intégrité de l'ADN, la perte de TDG entrainant une mutagenèse accrue au niveau des CpG. TET2/TDG est donc un complexe permettant de contrôler l'homéostasie de la déméthylation.

Implication potentielle de MBD4, une autre glycosylase

L'absence de *Mbd4* chez les souris ($mbd4^{-/-}$) entraine également une augmentation des mutations C->T dans les CpG et accélère la formation de tumeurs intestinales chez les souris qui présentent une prédisposition comme des mutations du gène *APC* (adenomatous polyposis

coli gene (*Apc*^{Min/+}) (Millar et al. 2002) (Wong et al. 2002). *MBD4* est muté dans de nombreux cancers qui présentent une instabilité des microsatellites, en entraînant l'expression d'une protéine MBD4 tronquée de son domaine glycosylase qui a un effet dominant négatif (Bader et al. 1999) (Bader et al. 2007) (Riccio et al. 1999). En conséquence, il y a une réduction des facultés de la réparation dans les cellules cancéreuses et augmentation des mutations dans les sites CpG mais aussi dans d'autres régions du génome (Bader et al. 1999) (Bader et al. 2007). De façon intéressante, MBD4 a été trouvé comme se liant aux 5hmU (Morera et al. 2012) suggérant que MBD4 pourrait intervenir dans l'action de TET2 et TDG. Des études devront être menées pour savoir si la mutagenèse est différente en présence de TET2 dans des cellules déficientes à la fois en MBD4 et en TDG.

IV- Comparaison entre le phénotype observé suite à l'augmentation des 5-hmC et le traitement par les agents déméthylants

Les effets de la surexpression de TET2 et l'utilisation des agents hypométhylants comme l'azacitidine ou la décitabine, utilisés dans le traitement des SMD ou des LAM pourraient être comparés bien qu'empruntant deux voies de déméthylation distinctes. En effet, TET2 induit une déméthylation active faisant intervenir les déaminases et les protéines du BER tandis que les agents hypométhylants induisent la déméthylation passive dépendante des divisions cellulaire et la dégradation protéosomale des DNMTs (Ghoshal et al. 2005). De façon très intéressante, il a été rapporté que l'incorporation d'agents hypométhylants dans l'ADN des cellules malignes induit des dommages de l'ADN et active la réponse aux dommages à l'ADN (via l'activation des checkpoint kinases (Chk-1 et Chk-2) et la phosphorylation de γ -H2AX) (Thepot et al. 2011) mais aussi la voie BER (Orta et al. 2014). De plus, il a été montré que les cellules déficientes en XRCC1 sont plus sensibles au traitement par l'azacitidine, suggérant un rôle de XRCC1 dans la réparation des lésions génétiques induites par ce genre de traitement (Orta et al. 2014). Ceci est en concordance avec nos résultats qui montrent que la déméthylation induite par la surexpression de TET2 en absence de TDG induit l'augmentation de la mutagenèse. Par ailleurs, il a été décrit que les patients qui présentent des mutations de TET2, sans anomalies additionnelles, répondent aux agents hypométhylants mieux que les patients avec TET2 sauvage (Itzykson et al. 2011) (Bejar et al. 2014). De plus, des expériences de transplantation de moelle osseuse chez la souris ont montré que l'exposition à l'azacitidine diminue l'avantage clonal associé à la perte de la fonction de TET2. Cependant, les mécanismes par lesquels les mutations ou la perte de TET2 peuvent

influencer la réponse au traitement par les agents hypométhylants n'est pas clair (Moran-Crusio et al. 2011) (Li et al. 2011).

V- Défaut en TET2 et instabilité chromosomique.

Dans cette étude, nous nous sommes principalement focalisés sur les effets de la surexpression de TET2 et sur la génération anormale des 5-hmC sur l'instabilité génétique et chromosomique. Etant donné que dans les hémopathies malignes, il a été identifié des mutations pertes de fonctions de TET2 et non des surexpressions ou des amplifications de TET2, nous nous interrogeons aussi sur le rôle d'un défaut de TET2 dans l'instabilité génétique. Les résultats du laboratoire et d'autres sur la fonction de TET2 dans les hémopathies suggèrent que son altération est précoce et précède la mutation JAK2V617F dans les NMP ou d'autres oncogènes comme KITD816V dans la mastocytose. L'une des hypothèses est que l'inactivation de ce gène génère un état « pré-leucémique » avec expansion clonale. Dans ce contexte, la survenue d'une mutation oncogénique secondaire ferait évoluer l'état pré-leucémique vers un NMP, un SMD ou une LAM. TET2 pourrait donc modifier l'hématopoïèse pour permettre à des cellules contenant des oncogènes de s'amplifier ou bien TET2 pourrait avoir directement un rôle dans l'apparition de ces deuxièmes événements en jouant sur le contrôle de la stabilité du génome ou bien le défaut en TET2 en induisant une prolifération augmentée du système hématopoïétique en générant une hématopoïèse clonale induirait un stress réplicatif et favoriserait indirectement des mutations. En accord avec ces deux dernières hypothèse, les souris knock-out tet2 développent des hémopathies myéloïdes ressemblant à des LMMC, mais avec un délai assez long. En revanche ce délai est très raccourci lors de transplantations secondaires (Quivoron et al. 2011). D'autre part, certains résultats encore controversés dans les NMP semblent suggérer un mauvais pronostic pour les patients présentant des mutations de TET2 (Lundberg et al. 2014).

Des données de la littérature ont montré que la déplétion de Tet1 joue aussi sur le cycle cellulaire dans les cellules NIH3T3 en bloquant l'accumulation de la cycline D1 en phase G1 du cycle cellulaire, inhibant la phosphorylation de Rb et par conséquent entrainant un ralentissement de l'entrée en phase G1/S. Ceci montre que Tet1 est nécessaire pour la prolifération cellulaire et que ce processus se produit *via* la voie Rb (Huang et al. 2013). Nos résultats préliminaires sur l'effet de la déplétion en TET2 montrent qu'une déficience en TET2 induit également une instabilité chromosomique dans des lignées cellulaires en utilisant

des shARN. Ceci suggère aussi qu'une diminution des 5-hmC, c'est à dire vraisemblablement une augmentation des 5-mC serait aussi néfaste pour les cellules sur le plan de la stabilité du génome. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un défaut de TET2 pourrait conduire à une méthylation de promoteurs de certains gènes de réparation. Ces résultats sont très intéressants pour expliquer à la fois l'hétérogénéité des hémopathies malignes des patients mutées pour *TET2*, et d'autres part la longue latence des souris invalidées pour *Tet2* pour développer des LMMC ou des MDS.

Ainsi, d'autres travaux devront être développés pour savoir si le défaut en TET2 ou des mutations de TET2 entrainent une mutagenèse et une instabilité génétique. Dans nos modèles de cellules Ba/F3, nous avons trouvé que la surexpression ectopique d'une protéine TET2 tronquée (TET2*) ou qui présentent des mutations ponctuelles au niveau des résidus de fixation de Fe²⁺ (H1382Y et D1384V, HxD) n'affecte pas le taux des 5-hmC en comparaison avec les cellules contrôles montrant que ces deux mutations ne sont pas de type dominant négatif. Invalider le gène *TET2* endogène ou mimer des mutations de TET2 par la technique CRISPR-cas9 au niveau des acides aminés clés permettrait d'étudier l'effet exclusif de la mutation sur l'instabilité génétique. Générer des cellules induites à la pluripotence à partir de cellules de patients qui présentent des mutations du site catalytique pourrait être aussi un modèle d'étude. Enfin, les souris ko *tet2* constitutives pourraient être utilisées pour générer des fibroblastes embryonnaires *tet2^{-/-}* par exemple.

VI- Divers rôles joués par les 5-hmC

Nous attribuons le phénotype d'instabilité chromosomique et de mutagenèse observé dans notre étude à l'augmentation des 5-hmC dans la cellule. En effet, il est maintenant évident que les 5-hmC ne sont plus de simples intermédiaires de la déméthylation active. Bien qu'elles aient été découvertes pour la première fois dans l'ADN mammaire en 1972 (Penn et al. 1972), les 5-hmC n'ont fait l'objet de recherches qu'à partir de 2009. Depuis, de nombreuses études se sont intéressées à la fonction et au métabolisme de ces composés et de leurs dérivés et ont montré que les 5-hmC peuvent avoir un rôle dans le cytosquelette, le transport des ions, la transcription, l'adhésion cellulaire, la mort cellulaire, le développement, la différenciation, la maturation, la structure de la chromatine, l'épissage, l'autorenouvellement et la myélopoïèse (Kriaucionis et Heintz 2009), (Tahiliani et al. 2009), (Ito et al. 2010), (Hahn et al. 2013), (Mellen et al. 2012), (Ko et al. 2010), (Szulwach et al. 2011), (Jin et al. 2011), (Dawlaty et al.

2011), (Pastor et al. 2011), (Wossidlo et al. 2011), (Koh et al. 2011), (Song et al. 2011), (Ivanov et al. 2012) et (Wang et al. 2012). Les changements de la distribution et de la concentration des 5-hmC dans un tissu peuvent être à l'origine de maladies. Certaines maladies neurologiques comme la RTT (maladie postnatale neurologique et développementale due à l'absence du gène MeCP) et la maladie d'Alzheimer sont corrélées à des aberrations des 5-hmC. Il a été reporté que le taux des 5-hmC, 5-fC et 5-caC jouent un rôle dans la progression de la maladie d'Alzheimer. En effet, la concentration de ces métabolites varie entre les différentes régions du cerveau et selon les stades de progression de la maladie (préclinique et stade tardif) (Bradley-Whitman MA et Lovell MA. 2013). Dans les cancers colorectaux et les cancers gastriques, il a été montré que le taux des 5-hmC est considérablement plus faible en comparaison avec les tissus normaux appariés adjacents (Li and Liu 2011) et (Kudo et al. 2012). Le taux des 5-hmC et de TET2 a été trouvé fortement augmenté dans le naevus benin, le naevus dysplasique, le mélanome superficiel et les maladies cutanées métastasiques (Gambichler et al. 2013).

Les 5-hmC sont les produits d'hydroxylation des 5-mC induite par les protéines TET. Néanmoins, le taux des 5-hmC ne dépend pas uniquement du statut des TET dans la cellule (sauvage ou muté), mais aussi d'autres protéines impliquées dans la régulation de la fonction enzymatique des TET. Il a été montré que les 5-hmC sont absents dans toutes les tumeurs stromales gastrointestinales déficitaires pour la succcinate déhydrogénase (SDH) (Mason and Hornick 2013). L'absence de SDH peut entrainer l'accumulation de succinate, un oncométabolite qui peut inhiber l'activité des enzymes dioxygenases dépendantes de l'akétoglutarate comme les protéines TET. Des mutations identifiées dans les hémopathies des enzymes appelées isocitrate déshydrogénase, IDH1/2 (isocitrate dehydrogenase 1/2) ont la capacité de synthétiser l'énantiomère R du 2-hydroxyglutarate, capable aussi d'inhiber l'activité des dioxygénases par compétition avec le 2OG (Koivunen et al. 2012). Enfin, certains cofacteurs, comme la vitamine C, favorisent l'activité de ces dioxygénases en permettant le repliement du domaine catalytique et le recyclage du Fe II (Blaschke et al. 2013). Enfin des miRNA comme miR-29a peuvent diminuer les 5-hmC en régulant l'expression de TET3 et de TDG chez des souris âgées (Zhang et al. 2013). Ceci suggère que les mi-RNA peuvent réguler le taux des 5-hmC dans la cellule et entrainer le vieillissement (Figure 6). Le dosage du taux des 5-hmC comme marqueur de l'activité catalytique de TET2 dans l'hématopoïèse au cours du vieillissement pourrait être recherché puisque les mutations de *TET2* ont été détectées chez des personnes âgées présentant une hématopoïèse clonale.

Partie II : Effet de l'activation de P53 par des antagonistes de MDM2 au cours de l'hématopoïèse.

La boucle de rétrocontrôle P53–MDM2 est une voie clé pour réguler P53 (Bargonetti et Manfredi 2002). Par conséquent, cette voie constitue la piste la plus étudiée pour activer P53 dans les cellules tumorales via le développement d'agents qui bloquent l'interaction P53-MDM2 (Shangary et Wang 2008) (Tovar et al. 2006). L'activité de ces inhibiteurs de MDM2 dépend de l'activation de P53 dans les cellules exprimant une protéine P53 normale. Ainsi, les hémopathies malignes comme les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) qui expriment une P53 normale en phase chronique sont potentiellement des tumeurs cibles pour ce type de traitement. Les petites molécules inhibitrices qui ont été décrites pour pouvoir induire la stabilisation et la réactivation de P53 dans différentes hémopathies malignes sont nombreuses et incluent la Nutline-3, le MI-219, le MI-63, le RITA, et récemment le RG7112 et le SAR405838.

Dans cette deuxième partie de thèse, nous avons montré que le SAR405838, un antagoniste de MDM2, en évaluation clinique depuis 2012, induit l'apoptose de façon dépendante de P53 des cellules progénitrices CD34⁺ normales isolées par cytaphérèse de donneurs. L'activation de P53 dans ces cellules est associée à l'activation des cibles classiques comme *MDM2*, *BBC3* et *CDK1A*. Nous avons ensuite montré que le SAR405838 réduit de façon dépendante de la dose et du temps le nombre des progéniteurs érythroïdes, granuleux et mégacaryocytaires. Dans la lignée mégacaryocytaire, cet effet est plus prononcé aux stades tardifs de la différenciation par rapport aux stades précoces. Le SAR405838 entraine une diminution de la ploïdie et de façon dose dépendante et P53-dépendante une réduction de la production des proplaquettes (**Figure 14**). Nous avons aussi montré que l'addition de fortes doses de TPO ne corrige pas la cytotoxicité induite par le SAR405838.



Figure 14: Effet de la stabilisation de P53 au cours de l'hématopoïèse. La stabilisation de p53 dans les cellules primaires entraîne la diminution du nombre de tous les progéniteurs myéloïdes y compris les BFU-E, les CFU-GM et les CFU-Még mais aussi l'altération de la polyploïdisation des mégacaryocytes (Még) et de la formation des proplaquettes (PPT).

I- Un effet dépendant des divisions cellulaires :

Nos données tendent à montrer que la toxicité induite par les SAR405838 est liée au nombre de divisions cellulaires. En effet, la toxicité est d'autant plus forte que le temps de traitement est important au niveau des progéniteurs. De plus, ce sont les progéniteurs BFU-E qui sont les plus sensibles à l'effet de SAR405838 en comparaison avec les CFU-MK et les CFU-GM. Enfin, nous avons observé une diminution des mégacaryocytes polyploïdes (N>4N). Ainsi, nous pensons que la cytotoxicité induite par le SAR405838 dépend des divisions cellulaires et pour confirmer cette hypothèse nous envisageons d'étudier le nombre de divisions mitotiques

des progéniteurs en présence ou non de SAR405838 et ceci par cytométrie de flux par le test CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester).

II- L'addition de fortes doses de TPO ne diminue pas la cytotoxicité :

Comme la thrombocytopénie observée en clinique, chez les patients traités par le SAR405838 est réversible au bout de quelques semaines, il a été suggéré que le traitement par la TPO ou par ses agonistes comme l'Eltrombopag pourrait restaurer cette cytopénie (Iancu-Rubin et al. 2014). La TPO est un facteur de survie pour les cellules de la lignée mégacaryocytaire. En effet la TPO induit l'expression de Bcl-xL, une protéine anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 (Kirito et al. 2002). Nous avons étudié cette hypothèse et nous avons montré que l'addition de fortes doses de TPO ne freine pas l'apoptose et ne restaure pas la cytotoxicité induite par SAR405838. Inversement, nous avons montré que l'effet négatif d'un inhibiteur de Bcl-XL est très diminué par un shRNA contre TP53, suggérant bien un antagonisme entre Bcl-XL et la voie p53 sur la mégacaryopoïèse. Cependant, il est possible que dès les doses de TPO considérées comme faibles *in vitro* (1ng) sont en fait des doses élevées par rapport à l'*in vivo* (10 pg/ml) et que ces doses induisent déjà une expression quasi maximum de Bcl-XL. Il est donc possible que de fortes doses de TPO in vivo puissent en partie avoir un effet et permettre de diminuer les effets toxiques des inhibiteurs de MDM2.

III- Effet du SAR sur la mutation JAK2V617F dans les hémopathies malignes :

Comme les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), constituent un prototype des hémopathies malignes caractérisées par l'inactivation fonctionnelle de P53, due à la surexpression de son régulateur négatif MDM2, nous avons étudié l'effet d'une gamme de concentrations de SAR405838 sur les cellules primaires CD34⁺ de patients atteints de NMP positifs pour la mutation JAK2V617F (**Figure 15**). Nous montrons que le SAR405838 n'a aucun effet spécifique sur les clones malins JAK2V617F positifs. Dans la littérature le RG7112, seul réduit, modérément, la formation des colonies CFU-GM et BFU-E de patients PV de façon dose dépendante (Lu et al. 2014) et doit être combiné à l'interferon- α (IFN α) pour potentialiser la réduction de la charge allélique de *JAK2V617F* chez les patients atteints de PV et de TE. Cependant, il existe des patients résistants à l'IFN α et il serait légitime de se demander s'ils présentent des mutations de *P53* puisque ces mutations sont présentes avec une forte proportion quand les NMP se transforment.



Figure 15: Effet des antagonistes de MDM2 sur les cellules JAK2V617F positives dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). Dans les NMP, la mutation *JAK2V617F* entraine la surexpression de MDM2 via l'induction de la surexpression de l'antigène La. Ceci entraine la réduction du taux de P53 suite à son ubiquitination et sa dégradation. L'addition de SAR405838, un antagoniste de MDM2 avec une plus forte affinité que celle de P53 induit la stabilisation de P53 et consécutivement l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

IV- Résistance aux drogues et autres approches pour cibler p53 :

Dans les cellules cancéreuses qui expriment une P53 normale, l'inhibition de P53 est une étape critique dans la progression du cancer. Comme presque la moitié des cancers présente une P53 normale, il a été proposé que les molécules qui sont capables d'activer les réponses dépendantes de P53 dans les cellules tumorales puissent avoir des bénéfices thérapeutiques. Néanmoins, il a été reporté que les tumeurs développent souvent une résistance à ces drogues *via* l'acquisition de mutations de P53 (Lane DP. 2005). Ce phénomène a été observé dans les lignées cellulaires traitées par le SAR405838 (Hoffman-Luca et al. 2015) ou par la Nutlin-3 (Aziz et al. 2011) (Michaelis et al. 2011). Ainsi, les stratégies thérapeutiques devraient, à la fois, cibler la P53 normale et mutée.

Outre l'abolition de l'interaction P53-MDM2, d'autres approches thérapeutiques ciblant la protéine p53, ont été développées et certaines sont en évaluation clinque.

IV-1- Restauration des fonctions normales de P53 mutée

De nombreuses molécules ont été décrites pour leur faculté à reverser les propriétés oncogéniques de P53 muté. Parmi ces molécules, PRIMA-1, une petite molécule en évaluation clinique depuis 2012, est capable de restaurer la conformation normale de P53 muté ainsi que sa liaison spécifique à l'ADN et par conséquent induire l'apoptose dans les cellules tumorales exprimant une protéine P53 mutée. Elle active aussi bien P53 normale que P53 mutée (Lambert et al. 2009). PRIMA-1 tout comme son dérivé méthylé plus actif, PRIMA-1^{MET} inhibent la prolifération cellulaire aussi bien dans différentes cellules malignes exprimant un mutant de P53 que dans des xénogreffes de tumeurs dans des modèles animaux (Duffy et al. 2014). Néanmoins, l'effet de ces drogues est associé à une légère toxicité chez les animaux testés (Zandi et al. 2011). De plus, une mutation, Phe176, de P53 semble être réfractaire à PRIMA-1. PRIMA-1^{MET} induit l'apoptose et inhibe la prolifération cellulaire, selon le type de cancer, via les autres membres de la famille P53, P73 et P63 (Saha et al. 2013). Parmi les gènes dont l'expression est modifié par PRIMA-1 ou PRIMA-1^{MET} les cibles classiques de P53 wild-type comme P21, NOXA, PUMA, GADD45, les caspases 2, 3 et 9) et MDM2 (Zandi et al. 2011).

IV-2- La thérapie génique par un gène TP53 wild type

La thérapie génique consiste à l'administration d'un vecteur rétroviral codant pour un gène *TP53* normal directement dans la tumeur. Cette approche n'a pas induit de cytotoxicité par contre les essais cliniques n'ont pas montré de régression tumorale mais des anomalies génomiques. Ainsi, le rétrovirus a été remplacé par un adénovirus (Roth 2006) dont l'évaluation clinique a révélé un effet sur l'apoptose, l'absence de cytotoxicité, mais comme le rétrovirus, une efficacité très limitée sur la régression tumorale. Malgré ces résultats l'adénovirus-P53 est commercialisé et son utilisation est autorisée en Chine mais pas en Europe ou aux états unis (Duffy et al. 2014).

IV-3- la létalité synthétique :

La troisième approche thérapeutique ciblant P53 est la létalité synthétique (SL). Le processus de la létalité synthétique se produit lorsque deux mutations non létales entrainent la létalité

lorsqu'elles sont présentes simultanément dans une cellule. Ainsi, cibler les gènes qui montrent une létalité synthétique avec TP53 muté peut être néfaste pour les cellules cancéreuses. 98 gènes ont été décrits comme des gènes potentiellement SL avec TP53 (Wang et Simon 2013). Ces gènes sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme les modifications post-traductionnelles, la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire et les voies de signalisation. L'un des partenaires les mieux caractérisé comme induisant la SL avec P53 est CHK1 (Schoppy et Brown 2012), (Ma et al. 2012). En effet, la combinaison d'un inhibiteur de CHK1 (UCN-01 or AZD7762) avec l'irinotécan (un inhibiteur de la topoisomérase 1 qui induit des cassures de l'ADN préférentiellement dans les cellules cancéreuses) dans un modèle murin de cancer du sein, réduit la croissance tumorale spécifiquement dans les tumeurs mutées pour P53 (Ma et al. 2012). L'hypothèse rationnelle de cette relation de létalité synthétique est la nécessité de cellules déficitaires en P53 et CHK1 d'arrêter la progression du cycle cellulaire au niveau de la phase S et G2 (Schoppy et Brown 2012). Ainsi, quand les points de contrôle en S et G2 sont bloqués suite à l'inhibition de CHK1, les cellules déficitaires en P53 succombent à l'apoptose et à la catastrophe mitotique (Ma et al. 2012) (Figure 16).

IV-3-1 Combinaison avec d'autres drogues :

IV-3-1-a Dans notre étude : Combinaison de SAR405838 avec un anti-CHK1, le MK-8776

Dans ce contexte, et suite l'inefficacité du SAR405838 seul sur la réduction des clones JAK2V617F chez les patients atteints de NMP, nous avons étudié l'effet de la combinaison du SAR405838 et du MK-8776, un inhibiteur de CHK1 en essais cliniques de phase 1-2. Nous avons testé cette combinaison sur 8 patients (1-8) : 2 PV, 2 TE, 2 PV->MF et 2 TE->MF et évalué l'impact sur les progéniteurs JAK2V617F. La réponse à la combinaison des deux molécules est très variable d'un patient à l'autre, les doses qui induisent la réduction du clone muté ne sont pas les mêmes d'un patient à l'autre. Pour certains, ces doses efficaces sur le clone muté sont cytotoxiques et affectent également le clone WT. Nous pensons qu'il faudra augmenter le nombre d'échantillons étudiés pour pouvoir faire des statistiques et conclure sur l'effet de cette combinaison.



Figure 16: Effet combiné du SAR405838 et de MK-8776 sur les cellules JAK2V617F positives dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP). La mutation *JAK2V617F* entraine l'ubiquitination de p53 et sa dégradation et la phosphorylation de la protéine CHK-1 (A). L'addition concomitante de SAR405838 et de MK-8776, un inhibiteur de CHK-1, induit l'apoptose suite à l'activation de p53 et l'amplification des dommages de l'ADN en l'absence de point de contrôle conduisant à une catastrophe mitotique et une augmentation de la mort cellulaire (B).

IV-3-1-a Dans les autres études :

De nombreuses combinaisons entre drogues ont montré une synergie de létalité des cellules malignes. L'inhibition de CHK1 par le MK-8776 sensibilise les cellules CD34⁺ isolées à partir de patients atteints de LAM au traitement par le vorinostat, un inhibiteur de HDAC. La combinaison de ces deux drogues entraine des dommages de l'ADN et induit la diminution de protéines impliquées dans la voie de réparation des cassures double brin par recombinaison homologue. La synergie de ces deux molécules a été approuvée aussi bien dans les cellules

leucémique P53 normale que dans les cellules P53 mutées (Dai et al. 2013). Il a été montré qu'*in vitro* PRIMA-1^{MET} synergise avec le cisplatine, l'adriamycine et la camptothecine dans des lignées cellulaires de cancer du poumon, avec le cisplatine et le vinblastine dans des lignées cellulaires de cancer colorectal et avec la camptothecine dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome (Bykov et al. 2005). *In vivo*, PRIMA-1^{MET} synergise avec le cisplatine dans un modèle de cancer des poumons et avec la dexamethasone dans un modèle de myélome multiple (Saha et al. 2013). Dans les NMP, la combinaison de faibles doses de RG7112 avec le Peg-IFN α 2a inhibe significativement la formation de colonies par les progéniteurs hématopoïétiques des patients PV et MFP. Cette combinaison induit aussi la diminution de nombre de colonies positives pour la mutation *JAK2V617F* (Lu et al. 2014). La synergie du Peg-IFN α 2a avec la Nutline-3 a été aussi montrée (Lu et al. 2014).

CONCLUSION : TET2 et P53, deux suppresseurs de tumeurs

Dans cette thèse, j'ai étudié le rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 qui ont tous deux des fonctions à la fois communes et différentes.

Ces deux gènes semblent très importants pour l'homéostasie des CSHs et sont trouvés mutés dans les hémopathies malignes. Les mutations de *TET2* sont acquises très tôt au niveau de l'hématopoïèse (Smith et al. 2010) et précèdent souvent les mutations comme *JAK2V617F* dans les NMP même si elles peuvent survenir aussi tardivement lors de la progression de ces maladies vers la myélofibrose ou les leucémies. Les mutations de *P53* sont rarement détectées dans le diagnostic des hémopathies malignes et des NMP. Cependant leur prévalence augmente au moment de la transformation des NMP en leucémies secondaires avec 30% de mutations.

TET2 et P53 régulent le cycle cellulaire. En effet, la surexpression de TET2 ralentit le cycle cellulaire et la transition G1/S. De la même façon, la stabilisation de P53 intervient dans le contrôle du cycle cellulaire notamment aux points de contrôles G1/2 mais aussi en intra-S et en G2/M (**Figure 17**).

TET2 et P53 régulent la transcription des gènes. En effet, P53 est un facteur transcriptionnel permettant l'induction des gènes. TET2 permet aussi probablement la stimulation de la transcription des gènes via son rôle dans la déméthylation active. Il reste à déterminer quels gènes TET2 peut réguler spécifiquement.

TET2 et P53 sont impliqués dans la réparation de l'ADN et l'induction de dommages. TET2 en générant des 5-hmC implique indirectement l'activation des protéines du BER et la perte de TDG entraîne une mutagenèse accrue. P53 est également impliqué dans la gestion des dommages à l'ADN et dans la réparation. Sa stabilisation permet d'arrêter le cycle cellulaire pour permettre aux cellules de réparer en cas de stress et éventuellement d'éliminer par apopotose les cellules trop endommagées. Il intervient aussi dans la régulation de nombreux mécanismes de réparation d'ADN comme la recombinaison homologue ou le MMR. De nombreuses études ont montré qu'il est impliqué dans la régulation et le contrôle de différentes étapes de la voie BER (Offer et al. 1999) (Zhou et al. 2001) (Seo et al. 2002) (Achanta and Huang 2004) (de Souza-Pinto et al. 2004) et ceci soit directement en régulant la transcription de *OGG1* (Chatterjee et al. 2006), soit indirectement via l'interaction avec de nombreux effecteurs de la réparation comme APE1 et la polymérase β . Seo et al. ont montré 111 que les cellules déficitaires en P53 présentent une diminution des faculté de réparation par BER (Seo et al. 2002). De plus, il a été montré que l'expression de TDG est sous le contrôle direct de l'activité transcriptionnelle de P53 via trois RE (Response Element) à P53 localisés sur le promoteur de TDG (da Costa et al. 2012). Tous ces résultats confirment que P53 est essentielle pour la réparation des lésions prises en charge par BER. La régulation de TDG par P53 confère à la cellule la capacité de contrôler à la fois la stabilité génétique et épigénétique. Il en résulte que la perte des fonctions de P53, soit suite à des mutations du gène soit via ses régulateurs négatifs peut contribuer à la fois à un phénotype mutateur et à une instabilité épigénétique. Dans ce cas, le phénotype mutateur résulterait de la diminution de la capacité de réparation des mésappariements résultant de la déamination spontanée de la cytosine méthylée, ce qui conduit à l'accumulation des transitions G:C à A:T, comme nous l'avons montré en présence de TET2 dans un contexte déficient en TDG. D'autres études sont nécessaires pour déterminer l'impact de la régulation de TDG par P53 sur la stabilité génétique et épigénétique, *in vivo*.

Au total, TET2 et P53 sont des gènes très importants puisqu'ils contrôlent probablement l'autorenouvellement, la prolifération, la différenciation et la réparation des CSHs. Il est possible que ces gènes coopèrent ou interagissent puisque certaines études suggèrent que TET1 phosphoryle et active P53 via la DNA-PK (Fu et al. 2014) et qu'il existe une synergie entre l'inactivation de TET2 et les mutations de P53 au cours de la tumorigenèse (Jardin et al. 2011).

En revanche, contrairement à P53, TET2 n'a pas encore été impliqué ni dans l'apoptose ni dans la sénescence et des études restent à mener.



Figure 17: Rôles de P53 et TET2, deux suppresseurs de tumeurs dans un contexte hématopoïétique. TET2 et P53 ont des fonctions à la fois communes et différentes : P53 stabilisé et activé intervient dans le contrôle du cycle cellulaire notamment aux points de contrôles G1/2 et G2/M, la surexpression de TET2 ralentit le cycle cellulaire et la transition G1/S. TET2 et P53 sont impliqués dans la réparation de l'ADN : TET2 en générant des 5-hmC implique indirectement l'activation des protéines du BER notamment TDG et P53 régule directement l'expression de TDG. Des études restent à mener sur des éventuelles interactions entre TET2 et P53.

LISTE DES PUBLICATIONS

Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, Pasquier F, Valle VD, Secardin L, Leroy G, **Mahfoudhi E**, Grosjean S, Droin N, Diop M, Dessen P, Charrier S, Palazzo A, Merlevede J, Meniane JC, Delaunay-Darivon C, Fuseau P, Isnard F, Casadevall N, Solary E, Debili N, Bernard OA, Raslova H, Najman A, Vainchenker W, Bellanné-Chantelot C, Plo I. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. Nat Genet. 2015.

Mahfoudhi E, Secardin L, Scourzic L, Bernard O, Vainchenker W, Plo I. Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis. Med Sci (Paris). 2015. Review. French.

Yamada O, **Mahfoudhi E**, Plo I, Ozaki K, Nakatake M, Akiyama M, Yamada H, Kawauchi K, Vainchenker W. Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone. J Clin Oncol. 2014 Jul.

Mahfoudhi E, Lecluse Y, Driss F, Abbes S, Flaujac C, Garçon L. Red cells exchanges in sickle cells disease lead to a selective reduction of erythrocytes-derived blood microparticles.Br J Haematol. 2012 Feb.

ANNEXES PUBLICATIONS

ANNEXE 1

Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone
JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

Emergence of a *BCR-ABL* Translocation in a Patient With the *JAK2*V617F Mutation: Evidence for Secondary Acquisition of *BCR-ABL* in the *JAK2*V617F Clone

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs), such as essential thrombocythemia, polycythemia vera (PV) and primary myelofibrosis (PMF), are distinct from chronic myeloid leukemia (CML), which is positive for the Philadelphia chromosome (Ph) and the *BCR-ABL* translocation. Significant numbers of Ph-negative MPNs harbor an activating mutation in the *Janus Kinase 2* gene (*JAK2*V617F mutation),¹ and the *JAK2* mutation and the *BCR-ABL* translocation are considered to be mutually exclusive. We observed the development of CML in a patient with PMF harboring the typical *JAK2*V617F mutation and investigated the emergence of the *JAK2*V617F and *BCR-ABL* mutations at the single-cell level. Clonal evolution of cancer cells was demonstrated, and diversity within the subclonal structure was investigated.

Case Report

A 67-year-old man whose WBC count had been elevated for several years was referred to our hospital in April 2008 for evaluation of marked leukocytosis (WBC, 22.6×10^9 /L). He was slightly anemic, with tear drop cells, a hematocrit of 40.2%, and an elevated platelet count of 65.2 $\times 10^{10}$ /L (Fig 1; Hb, hemoglobin). A trephine biopsy revealed mega-karyocytic hyperplasia with marked fibrosis. Chromosomal analy-

sis revealed a normal karyotype. Genomic DNA was sequenced with specific primers (5'-TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT-3' and 5'-TCCTACAGTGTTTTCAGTTTCAA-3') and a heterozygous $G \rightarrow T$ transversion in JAK2 was detected (Figs 2A and 2B, arrows). These findings met the diagnostic criteria for PMF,² and the patient was followed without therapy. By April 2011, his leukocyte count had gradually increased, and his spleen showed a marked enlargement, as indicated by the larger red arrow in Figure 1. The small illustrations shown along the x-axis in Figure 1 depict the location of the spleen. The spleen size correlates with the thickness of the red arrow. A bone marrow biopsy again revealed prominent myelofibrosis, with increased megakaryocytes. Karyotype analysis was positive for t(9;22;21), and the BCR-ABL fusion transcript was observed in 90% of peripheral blood neutrophils by fluorescent in situ hybridization (FISH). The small photographs shown in Figure 1 depict FISH analyses performed throughout the clinical course. The white arrows indicate BCR and ABL transcripts, and the white arrowhead indicates the BCR-ABL fusion transcript. A three-way variant Philadelphia translocation (9;22;21)(q34;q11;q22) with a BCR-ABL fusion residing on the der(22) was present, as is shown by arrows in Figure 3. A diagnosis of chronic-phase CML was made, although the level of JAK2V617F had not changed. The patient was started on the tyrosine kinase inhibitor (TKI) nilotinib in July 2011. Nilotinib therapy was ceased 1 month later as a result of hyperglycemia, and the patient was started on dasatinib. A complete molecular response (CMR) for BCR-ABL,³ as determined by nested polymerase chain reaction (PCR), was achieved after 6 months of treatment, although no change in the JAK2V617F level was observed (Fig 2C,



e76 © 2014 by American Society of Clinical Oncology Journal of Clinical Oncology, Vol 32, No 21 (July 20), 2014: pp e76-e79
Information downloaded from jco.ascopubs.org and provided by at Inst Gustave Roussy on November 25, 2015 from
Copyright © 2014 American Sotato of Clinical Oncology. All rights reserved.



arrow). Thus, the translocation generating *BCR-ABL* may have been a molecular event independent of the *JAK2*V617F mutation or a secondary event in the *JAK2*V617F–containing clone.

Results and Discussion

To address this question, CD34-positive cells were separated from peripheral blood drawn from the patient at the emergence of CML in 2011 (sample 2011S) and at the time of CMR in 2012 (sample 2012S). The cells were then plated at one cell per well by cell sorting in serum-free medium, as previously described.⁴ Colonies were selected, and direct reverse transcription was performed using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (www.invitrogen-.com) before PCR amplification. The mutational status of the JAK2 gene was determined for every colony of sorted CD34-positive cells using a real-time PCR single-nucleotide polymorphism detection system as previously described.¹ From the 2011S sample, 25 colonies were obtained, of which two were wild type (WT) for JAK2, 22 were heterozygous for JAK2V617F, and one was homozygous for JAK2V617F. Of the 51 colonies analyzed from the 2012S sample, eight (15.7%) were WT, 38 (74.5%) were heterozygous, and five (9.8%) were homozygous (Fig 4A). The BCR-ABL transcript was also examined by nested PCR in every colony. The primers 5'-GCTTCTCCCTGACATCCGTC-3' and 5'-GGCCCATGGTA CCAGGAGTG-3' were used for the first nested PCR reaction, and the primers 5'-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3' and 5'-GTTTCTCCAGACTGTTGACTG-3 were used for the second PCR reaction. In 2011S, only colonies that were heterozygous for JAK2V617F (12 out of 22) were positive for the BCR-ABL transcript. In 2012S, seven of the 38 colonies that were heterozygous for JAK2V617F and two of the five colonies that were homozygous for JAK2V617F were BCR-ABL positive as well. No colony contained the BCR-ABL transcript in the absence of the JAK2 mutation. Percentage of JAK2V617F heterozygous colonies with or without BCR-ABL and representative agarose gels that indicate the presence of the BCR-ABL fusion gene are shown for both the 2011S and 2012S samples (Fig 4B; and Fig 5, red arrows). These results suggest that a preexisting JAK2V617F heterozygous clone acquired the BCR-ABL translocation. Although the patient achieved a CMR according to standard diagnostic criteria,3 the BCR-ABL transcript remained in nine of 43 expanded colonies derived from CD34positive single cells with JAK2V617F. This observation suggests a requirement for new surrogate markers of CMR in patients with CML treated with TKIs. Moreover, it is crucial to detect the BCR-ABL translocation in cases of PMF with an atypical clinical course to permit TKI treatment before the onset of acute transformation.

Bocchia et al⁵ and Bornhauser et al⁶ reported a case of polycythemia vera and PMF that progressed to CML.^{5,6} They detected JAK2V617F and BCR-ABL in hematopoietic colonies derived from plated peripheral blood mononuclear cells. To expand on this idea, we investigated at a single-cell level whether JAK2V617F and BCR-ABL could coexist in the same progenitor cell. Our results suggest that JAK2V617F might have preceded BCR-ABL acquisition, because clones were identified that contained JAK2V617F alone or in combination with BCR-ABL, but no JAK2 WT colonies that also contained BCR-ABL were identified in either 2011S or 2012S. However, the dynamics of the JAK2V617F mutation were complex, as the loss of heterozygosity appeared twice, once before the BCR-ABL emergence and once after (Fig 6). Indeed, JAK2V617F heterozygous colonies and homozygous colonies were identified with and without BCR-ABL. This result further underscores the fact that in cancer, the clonal architecture is complex, with a branched structure.⁷ One likely hypothesis is that JAK2 activation increases genetic instability, contributing to the acquisition of a translocation or to the loss of heterozygosity.⁸ Alternatively, the patient may have a germline predisposition to leukemia, or the JAK2V617F mutation may have occurred on a hematopoietic stem cell (HSC) with other somatic mutations that induce genetic instability. In addition to these possibilities, and in light of the observation that the patient had an enlarged spleen when CML emerged, the spleens of patients with PMF may contain malignant HSCs that are more prone to genetic insults that result in the BCR-ABL translocation.⁹ Overall, these results suggest that acquisition of the BCR-ABL translocation provides a growth advantage over that provided by the JAK2V617F mutation, including at the level of the HSC. Indeed, BCR-ABL induces more potent and complex signaling than JAK2V617F. BCR-ABL may stimulate HSC self-renewal by increasing β -catenin expression¹⁰ and induce higher proliferation than JAK2V617F, whose signaling activity remains tightly regulated by cytokine receptors.



In conclusion, we have described a rare case of a patient who was diagnosed with PMF followed by a diagnosis of CML and demonstrated at a single-cell level that a preexisting *JAK2*V617F-positive clone acquired *BCR-ABL* translocation. A CMR for *BCR-ABL* was achieved after 6 months of treatment, although no change in the *JAK2*V617F level was observed. This might suggest the necessity of screening for *JAK2*V617F mutation in patients with CML with poor TKI response.

Osamu Yamada

Medical Research Institute and Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Emna Mahfoudhi

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1009, Institut Gustave Roussy, Université Paris XI, Paris; INSERM, UMR 1009, Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge, Villejuif, France; Laboratoire d'hématologie moléculaire et cellulaire (S. Abbes), Institut Pasteur de Tunis, Belvédère, Tunisia

Isabelle Plo

INSERM, UMR 1009, Institut Gustave Roussy, Université Paris XI, Paris; INSERM, UMR 1009, Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge, Villejuif, France

Kohji Ozaki

Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan



e78 © 2014 by American Society of Clinical Oncology

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

Information downloaded from jco.ascopubs.org and provided by at Inst Gustave Roussy on November 25, 2015 from Copyright © 2014 American Sot3256f1C0023al Oncology. All rights reserved.



Fig 5.

Mayuka Nakatake

Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Masaharu Akiyama and Hisashi Yamada

Institute of DNA Medicine, Jikei University School of Medicine, Tokyo, Japan

Kiyotaka Kawauchi

Medical Research Institute, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

William Vainchenker

INSERM, UMR 1009, Institut Gustave Roussy, Université Paris XI; INSERM, UMR 1009, Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge, Villejuif, France

ACKNOWLEDGMENT

Supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (National League Against Cancer; équipe labelisée 2010-2012), Agence



Nationale de la Recherche Blanc 2010, INSERM, INSERM–Direction Générale de la Recherche Scientifique (Tunis), and by a Grant-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (grant No. 22501053).

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434:1144-1148, 2005

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

 Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al: Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. J Clin Oncol 27:6041-6051, 2009

4. Norol F, Vitrat N, Cramer E, et al: Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. Blood 91:830-843, 1998

5. Bocchia M, Vannucchi AM, Gozzetti A, et al: Insights into JAK2–V617F mutation in CML. Lancet Oncol 8:864-866, 2007

 Bornhäuser M, Mohr B, Oelschlaegel U, et al: Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. Leukemia 21:1824-1826, 2007

7. Greaves M, Maley CC: Clonal evolution in cancer. Nature 481:306-313, 2012

8. Plo I, Nakatake M, Malivert L, et al: JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: Potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. Blood 112:1402-1412, 2008

9. Wang X, Prakash S, Lu M, et al: Spleens of myelofibrosis patients contain malignant hematopoietic stem cells. J Clin Invest 22:3888-3899, 2012

10. Cilloni D, Saglio G: Molecular pathways: BCR-ABL. Clin Cancer Res 18:930-937, 2012

DOI: 10.1200/JCO.2012.47.8669; published online ahead of print at www.jco.org on February 10, 2014

ANNEXE 2

Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies

Germline duplication of *ATG2B* and *GSKIP* predisposes to familial myeloid malignancies

Joseph Saliba^{1-4,14}, Cécile Saint-Martin^{1-3,5,14}, Antonio Di Stefano^{1-4,14}, Gaëlle Lenglet¹⁻⁴, Caroline Marty¹⁻⁴, Boris Keren⁵, Florence Pasquier¹⁻⁴, Véronique Della Valle¹⁻³, Lise Secardin¹⁻⁴, Gwendoline Leroy⁵, Emna Mahfoudhi^{1-4,6}, Sarah Grosjean¹⁻⁴, Nathalie Droin¹⁻³, M'boyba Diop¹⁻³, Philippe Dessen¹⁻³, Sabine Charrier⁷, Alberta Palazzo¹⁻³, Jane Merlevede¹⁻³, Jean-Côme Meniane⁸, Christine Delaunay-Darivon⁸, Pascal Fuseau⁹, Françoise Isnard^{10,11}, Nicole Casadevall^{1,12}, Eric Solary¹⁻³, Najet Debili¹⁻³, Olivier A Bernard¹⁻³, Hana Raslova¹⁻³, Albert Najman^{10,11}, William Vainchenker^{1-4,13,15}, Christine Bellanné-Chantelot^{1-3,5,11,15} & Isabelle Plo^{1-4,15}

No major predisposition gene for familial myeloproliferative neoplasms (MPN) has been identified. Here we demonstrate that the autosomal dominant transmission of a 700-kb duplication in four genetically related families predisposes to myeloid malignancies, including MPN, frequently progressing to leukemia. Using induced pluripotent stem cells and primary cells, we demonstrate that overexpression of ATG2B and GSKIP enhances hematopoietic progenitor differentiation, including of megakaryocytes, by increasing progenitor sensitivity to thrombopoietin (TPO). ATG2B and GSKIP cooperate with acquired *JAK2*, *MPL* and *CALR* mutations during MPN development. Thus, the germline duplication may change the fitness of cells harboring signaling pathway mutations and increases the probability of disease development.

Most myeloid malignancies, including acute myeloid leukemias (AML), myelodysplastic syndromes (MDS) and MPN, are sporadic diseases. Familial forms are rare but informative, as germline mutations may phenocopy initiating mutations in sporadic leukemias. Such germline mutations have been identified in *RUNX1* (in a familial platelet disorder that predisposes to AML, or FPD/AML)¹, *CEBPA*² and *GATA2* (refs. 3,4) coding sequences as well as in the 5'UTR of the *ANKRD26* (*THC2*) gene⁵.

Familial cases of MPN are usually transmitted by autosomal inheritance with incomplete penetrance, appear in adulthood and exhibit acquired genetic abnormalities that are similar to those identified in sporadic cases, such as mutations of *JAK2* (encoding p.Val617Phe) and *TET2* (refs. 6,7). The independent acquisition of several oncogenic hits in the same patient with MPN suggested that an unidentified germline predisposition locus might be present in some sporadic cases^{6–8}. For example, the *JAK2* 46/1 haplotype was shown to increase the risk of developing MPN with *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe^{9–11}, whereas a germline intronic SNP in the *TERT* gene is another susceptibility factor for MPN development^{12,13}. Linkage and segregation analyses indicate that genetic predisposition to MPN cannot be related to a common alteration and rather involves a number of susceptibility loci responsible for independent familial aggregations. Identification of these susceptibility loci may improve understanding of the mechanisms of predisposition, which might either result in the induction of genetic instability, favoring the acquisition of oncogenic mutations, or correspond to a fertile ground for the selection of somatic mutations.

Here we describe a newly identified germline copy number variation (CNV) that predisposes to several myeloid malignancies, particularly essential thrombocythemia, which can progress to myelofibrosis or leukemia.

RESULTS

Identification of a germline CNV on chromosome 14

We identified two large families (F1 and F2) from the French West Indies with affected individuals having clinical features distinct from those of other familial cases of MPN (**Fig. 1**). Adult-onset hematological malignancies, including MPN, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) and AML, were transmitted in these families with autosomal dominant inheritance (**Table 1** and **Supplementary Table 1**).

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1170, Villejuif, France. ²Université Paris XI, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France. ³Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁴Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif, France. ⁵Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Département de Génétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ⁶Laboratoire d'Hématologie Moléculaire et Cellulaire (Salem Abbes), Institut Pasteur de Tunis, Belvédère, Tunisia. ⁷Généthon, Evry, France. ⁸Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Fort de France, Fort de France, France. ⁹Laboratoire d'Hématologie, CHU Fort de France, Fort de France, France. ⁹Laboratoire d'Hématologie, CHU Fort de France, Fort de France, France. ¹⁰Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Département d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹¹Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Groupe de Recherche Clinique sur les Myéloproliférations Aiguës et Chroniques (GRC 7, MYPAC), Paris, France. ¹²Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France. ¹⁴These authors contributed equally to this work. ¹⁵These authors jointly supervised this work. Correspondence should be addressed to W.V. (verpre@igr.fr), C.B.-C. (christine.bellanne-chantelot@aphp.fr) or I.P. (isabelle.plo@gustaveroussy.fr).

Received 3 March; accepted 21 July; published online 17 August 2015; doi:10.1038/ng.3380





Figure 1 Pedigrees of the four families with MPN. Filled symbols represent cases. Under each symbol, the first line shows the genetic status for the germline CNV (+, the CNV was found; –, otherwise); the second line indicates the phenotype at the time of diagnosis followed by the disease evolution. ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera; MF, myelofibrosis; PMF, primary myelofibrosis; AML, acute myeloid leukemia; aCML, atypical chronic myeloid leukemia; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; NS, not studied.

Moreover, two-thirds of the patients (22/33) initially had essential thrombocythemia, with half of them progressing to myelofibrosis or AML. Genetic linkage analysis of the two families identified positive linkage at the 14q32.13-q32.2 locus (logarithm of odds (LOD) score $z_{\text{max}} = 3.7$) (Fig. 2a). Using additional microsatellite markers and taking advantage of a crossing-over event in one patient (F1:II-7) and an ancestral patient from family F2, the susceptibility region was further narrowed down to a 1.86-Mb interval (95.76-97.62 Mb, hg19) (Supplementary Fig. 1a). Complete sequencing of the 1.86-Mb candidate locus did not identify any germline mutation in coding regions that segregated with the disease (data not shown). SNP array analysis detected a 700-kb duplication located within the linkage region and absent from the Database of Genomic Variants (DGVS, v10) (Fig. 2b). We further confirmed the presence of the CNV in all affected cases in both families by quantitative RT-PCR (qRT-PCR; Fig. 1 and Supplementary Table 2). PCR analyses mapped the proximal and distal breakpoints of the CNV and established this duplication as a 700-kb head-to-tail tandem duplication (Fig. 2c,d and Supplementary Table 2). This region includes the genes TCL1A, GSKIP, ATG2B, BDKRB1 and BDKRB2, together with the first exon of AK7 (Fig. 2e). Using quantitative PCR, we identified in two other families the same CNV with identical breakpoints (families F3 and F4; Fig. 1 and Supplementary Fig. 1b). These families shared with the two initial families their geographical origin and the clinical features of affected individuals. Analysis of the 4 families demonstrated the high penetrance of the phenotype, as 24 of 34 carriers of the germline CNV developed disease (**Fig. 1**). Asymptomatic carriers of the CNV were matched by age to patients with MPN and presented no major blood abnormalities (**Supplementary Table 3**). This CNV was not identified in 199 control DNA samples from individuals with the same geographical origin and 98 unrelated Eurocaucasian familial MPN cases.

Molecular characterization of the familial MPN cases

Analysis of the genetic abnormalities associated with disease development collected from 24 members of these families identified a signaling mutation profile in MPN (essential thrombocythemia or primary myelofibrosis (PMF)) similar to that observed in sporadic cases: cases had JAK2 mutation encoding p.Val617Phe (15/22, 68%), MPL mutation (2/22, 9%) or CALR mutation (4/22, 18%) or were triple negative for these mutations (1/22, 5%) (Fig. 3 and Table 1). Sequencing performed on the most recent samples showed the acquisition of secondary events in TET2 (7/21, 38%), IDH1 (2/21, 10%), IDH2 (4/21, 19%) and ASXL1 (1/21, 5%) with disease evolution to myelofibrosis and leukemia (Fig. 3 and Table 1). Several patients exhibited biallelic mutation of TET2 or a combination of epigenetic mutations (in TET2 and *IDH2* or *IDH1* and *IDH2*; n = 3/21, 14%). No *TP53* mutation was detected. Complex karyotypes were observed only when the leukemia occurred.

ARTICLES

Table 1 Clinical and molecular data for the four families with MPN

Family	, ID	Sex	Initial diagnosis	Age at diagnosis (years)	Follow-up duration (years)	Evolution	Outcome	Signaling mutation (allele burden)	Epigenetic mutation	Karyotype
F1	I-1	Male	AML4	75.4	0.5		Died	NS	NS	46,XY,del(13)(q12q22) [1]/46,XY,del(13) (q12q22),t(1;1) (p34,3p36,3),t(2;20) (p13;q11,2),t(4;12) (q12;q15),add(5) (q35)[16]
F1	II-1	Female	ET	63.5	7.5	AML	Alive	JAK2: p.Val617Phe (45%)	<i>IDH1</i> : c.394C>T, p.Arg132Cys	46,XX,-7[10]/47,-7, +11/46,XX
F1	11-2	Female	ET	39.5	20.2	MF	Died	JAK2: p.Val617Phe (84%)	<i>IDH2</i> : c.419G>A, p.Arg140GIn	46,XX,der(6)t(6;?) (p25)[7]/46,XX,dup(12) (q13q22)[2]/46,XX[8]
F1	II-3	Female	ET	38	17	PV> MF>AML	Died	JAK2: p.Val617Phe (48%)	<i>IDH2</i> : c.563G>A, p.Arg188GIn <i>TET2</i> : c.1648C>T, p.Arg550*/ c.2567delG, p.Glv856fs	46,XX,+1,der(1;7) (q10;p10) [11]/46,XX[5]
F1	II-5	Female	ET	41.2	21.8		Alive	JAK2: p.Val617Phe (62%)	<i>IDH1</i> : c.394C>A, p.Arg132Ser	46,XX
F 1		Mala	FT.	26.0	17		A 1	(A/C) = (A/C) = (20)	10112: C.303G2A, p.Arg186GIII	
ΓI	11-0	Male	EI	30.0	17		Allve	JAN2: p.valo17Pile (2%)	<i>TET2</i> : c.3321dupA, p.Ser1107fs	40,81[20]
F1	11-7	Male	AML2	43.6	7.9		HSCT, alive	Triple negative	<i>IDH1</i> : c.394C>T, p.Arg132Cys	46,XY,- 7,+14[12]/46,XY[11]
F1	-1	Male	ET	34	8	AML	Died	CALR: c.1099_1150del52 (30%)	<i>TET2</i> : c.2058A>T, p.Arg686Ser	45,XY,-5,der(6)t(6;8) (p22;q21), -17+mar(16)/ 46,XY[1]
F1	111-4	Male	ET	35.5	8.5		Alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (2%)	None	NS
F2	11-1	Male	ET	81	0.5	AML	Died	NS	NS	NS
F2	11-2	Female	AML	52	1		Died	NS	NS	NS
F2	11-3	Female	AML	52	ns		Died	NS	NS	NS
F2	-1	Female	AML2	37.5	0.5		Died	NS	NS	NS
F2	111-2	Female	ET	49	11	PV>MF	Alive	JAK2: p Val617Phe (49%)	<i>TET2</i> : c.3500+3A>C	46,XY,inv(2)
F2	111-4	Female	aCML	48	0.9	AML	Died	Triple negative	<i>TET2</i> : c.1954delC, p.Gln652fs/ c.2490dupA, p.Gln831fs <i>ASXI 1</i> : c.2893C>T_p Arg965*	46,XX,-7[20]
F2	111-7	Male	ET	36	22	AML	HSCT, alive	CALR: c.1099_1150del52	None	46,XY,inv(2) (p24g11)c[23]
F2	111-8	Male	CMMI	45.5	0.5		Alive	<i>IAK2</i> : p Val617Phe (38%)	TET2: c.4469delA p.Glu1490fs	46 XY inv(2) (p25g13)[25]
F2	111-9	Male	ET	41	9	AML	HSCT,	MPL: p.Trp515Leu (5%)	<i>TET2</i> : c.5551G>T, p.Glu1851*	46,XY,inv(2) (p2?5g1?4)[20]
F2	III-10	Female	ET	34	16	CML, MF	Alive	CALR: c.1099_1150del52 (35%);	None	46,XX,t(9,22) (q34,q11)[17]
								m-Bcr (e1/a2)		
F2	111-11	Female	ET	41.5	6.5		Alive	MPL: p.Trp515Leu (3%)	<i>TET2</i> : c.3804–2A>T	NS
F2	III-13	Female	AML2	35	0.8		HSCT, died	NS	NS	NS
F2	IV-2	Female	ET	33	5		Alive	JAK2: p.Val617Phe (1%)	None	46,XY,inv(2) (p24q14)[11]
F2	IV-4	Male	PMF ⁱ	36	0.5		Alive	JAK2: p.Val617Phe (72%)	ASXL1: c.1934dupA, p.Gly646fs	46,XY
F2	IV-10	Male	ET	42	0.2		Alive	JAK2: p.Val617Phe (14%)	NS	NS
F2	IV-11	Male	AML6	34	1.6		Died	NS	NS	45,XY,-7[18]
F3	II-1	Female	AML5	64.8	0		Died	NS	NS	48,XX,+4,+8[15]
F3	11-2	Female	ET	46.3	22	MF	Alive	JAK2: p.Val617Phe (5%)	TET2: c.3689delT, p.lle1230fs	46,XX[15]
F3	111-1	Female	ET	42	8		Alive	JAK2: p.Val617Phe (1.4%)	None	NS
F3	111-2	Female	ET	34	11		Alive	Triple negative	None	NS
F3	IV-1	Female	ET	29	2		Alive	JAK2: p.Val617Phe (11%)	NS	NS
F4	11-1	Male	ET	43.8	0.6		Alive	<i>CALR</i> : c.1099_1150del52 (10%)	None	46,XY[20]
F4	11-2	Female	FT	42	02		Alive	IAK2: n Val617Phe (0.6%)	None	NS
F4	11-3	Male	PMF	38.5	0.8		HSCT, alive	<i>JAK2</i> : p.Val617Phe (61%)	None	46,XY[20]

AML, acute myeloid leukemia (subtype according to French-American-British (FAB) classification); ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera; aCML, atypical chronic myeloid leukemia (*BCR-ABL* negative); CMML, chronic myelomonocytic leukemia; PMF, primary myelofibrosis; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; m-Bcr (e1/a2), major breakpoint cluster region rearrangement between exons 1 and 2; NS, not studied. Triple-negative individuals lacked the mutation in *JAK2* encoding p.Val617Phe (c.1849G>T), the mutation in *MPL* encoding p.Trp515Leu (c.1544G>T) and the 52-bp deletion (p.Leu367Thrfs*46) or 5-bp insertion (p.Lys385Asnfs*47) in *CALR*. ID is according to the pedigrees shown in **Figure 1**.

Expression of the genes contained in the duplication

Using gene expression arrays, we found that three of the six duplicated genes were expressed in Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cell lines (EBVCs) from three donors, namely TCL1A, ATG2B and GSKIP, after normalization to the levels of a housekeeping gene (PPIA or B2M). However, expression of only ATG2B and GSKIP was detected on microarrays of CD34⁺ purified hematopoietic progenitors from donors and CD36⁺ erythroblasts or CD41⁺ megakaryocytes derived from CD34⁺ progenitors cultured in vitro. Moreover, ATG2B and GSKIP expression levels were similar to those of RUNX1 and STAT5A, two genes well expressed during normal hematopoiesis (Fig. 4a). Microarrays showed significantly higher levels of ATG2B and GSKIP transcripts in EBVCs derived from five patients in comparison to EBVCs derived from three control relatives but no difference for TCL1A levels (Fig. 4b). We further analyzed the expression of these two genes during normal in vitro erythroid and megakaryocyte differentiation from CD34⁺ progenitors. Different cellular fractions were sorted by flow cytometry, and the expression levels of ATG2B and GSKIP were quantified by qRT-PCR (Fig. 4c,d). GSKIP expression did not vary, whereas ATG2B expression decreased during megakaryocyte and erythroid differentiation. A strong increase in ATG2B expression was observed in terminal erythroid differentiation. We confirmed by qRT-PCR the overexpression (by two- to threefold) of ATG2B and GSKIP in megakaryocytes derived from patients as compared to controls (Fig. 4e).

Derivation of human induced pluripotent stem cells

To analyze the consequences of the duplication conferring predisposition to MPN, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) from CD34⁺ progenitor cells sorted from two patients; the patients were selected from the same family to reduce genetic heterogeneity (F2:III-2 (iPSC/P3) and F2:IV-2 (iPSC/P4))¹⁴. Patient F2:III-2, who developed essential thrombocythemia that progressed to myelofibrosis, had a JAK2 mutation encoding p.Val617Phe (allele burden in granulocytes, 50%) and a heterozygous *TET2* mutation (c.3500+3A>C) associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) levels (Supplementary Fig. 2). Patient F2:IV-2, who developed essential thrombocythemia with a platelet count slightly above the normal value $(450-550 \times 10^9 \text{ cells/l})$, had a *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe with very low allele burden (<1% in granulocytes). We obtained clones bearing only the CNV predisposition locus from patient F2:IV-2 (P4-CNV) and clones harboring the CNV together with one wildtype JAK2 allele and one allele encoding the p.Val617Phe alteration, with (P3-CNV-VF-TET2) or without (P3-CNV-VF) TET2 mutation, from patient F2:III-2 (Supplementary Fig. 2). We used as controls previously published iPSC clones obtained by reprogramming CD34+ cells from healthy donors or sporadic MPN cases heterozygous for the JAK2 mutation encoding p.Val617Phe (P2-VF)¹⁵. All these clones formed embryonic stem cell (ES)-like colonies. We selected two clones of each genotype (a or b), performed genomic characterization using comparative genomic hybridization (CGH) arrays, cytogenetics and

whole-exome sequencing (**Supplementary Fig. 3a,b**), and validated the phenotype while checking for the silencing of transgenes, the reexpression of endogenous pluripotent transcription factors, and the ability to generate embryoid bodies *in vitro* and to form teratomas *in vivo* (**Supplementary Fig. 4a–g**).

CNV increases the generation of iPSC-derived hematopoietic cells

To explore the hematopoietic differentiation of iPSC clones, sac-like structures were dissociated at day 12 and cultured on the OP9 stromal cell line in the presence of cytokines¹⁶. First, when hematopoietic progenitor colonies were enumerated 10-12 d after seeding day 13 unfractionated cells in semisolid medium, we observed a tenfold higher number of colonies for samples carrying the CNV predisposition locus alone, regardless of an additional mutation in JAK2 or TET2, in comparison to controls (Fig. 5a). Second, we performed kinetic analyses from day 10 until day 21, and the percentages of megakaryocytes (CD41⁺), erythroblasts (GPA⁺) and monocytes (CD14⁺) were determined as previously described^{15,17,18}. P2-VF iPSC clones (heterozygous for the JAK2 mutation encoding p.Val617Phe) did not show marked differences in the expression of hematopoietic markers in comparison to control iPSC clones, whereas all the iPSC clones carrying the CNV predisposition locus had a significantly higher proportion of megakaryocytes as differentiation progressed (Fig. 5b). Increases in the proportions of differentiated cells for clones carrying the CNV alone were further enhanced by the JAK2 mutation in P3-CNV-VF clones and were even more remarkable, especially for erythroblasts, in P3-CNV-VF-TET2 clones mutated for both JAK2 and TET2. Finally, when iPSCs were sorted for the TRA-1-81 pluripotent surface marker and grown on OP9 cells with a cocktail of cytokines, we observed significantly higher absolute numbers of CD41+, CD14+ and GPA+ cells generated by P4-CNV iPSCs as compared to control iPSCs at day 18 (Fig. 5c).

These results indicate that the CNV predisposition locus could be sufficient to increase the generation of hematopoietic progenitor cells and the overproduction of erythroblasts, megakaryocytes and monocytes, an effect that is reinforced by additional mutations in *JAK2* and/or *TET2*.

CNV and the response of progenitors to cytokines

Because hypersensitivity of hematopoietic progenitors to cytokines is a characteristic feature of MPN¹⁹, we cultured iPSC clones on OP9 stromal cells for 12 d in the presence of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hematopoietic cytokines and then sorted for the hematopoietic progenitor cell fraction (GPA+CD41⁺). These cells were grown for 12 d in methylcellulose in the presence of stem cell factor (SCF) and increasing concentrations of erythropoietin (EPO). The response to EPO was equivalent for control, P2-VF and P4-CNV progenitor cells. In contrast, P3-CNV-VF and P3-CNV-VF-TET2 progenitor cells demonstrated increased sensitivity to EPO, with around 30% of the colonies formed constituting endogenous erythroid colonies (EECs) (**Supplementary Fig. 5a**). Moreover, the

Figure 2 Characterization of the germline CNV. (a) Positive linkage signal (*z* score = 3.7) at 14q32. The dashed lines highlight the linkage signal in the two initial families (F1 and F2). (b) SNP array analysis showing a 700-kb duplication in both families F1 and F2. A chromosome 14 ideogram is shown at the top. For each individual, the lower plot shows the log R ratio (*y* axis) for 9,592 probes on chromosome 14 (*x* axis) and the upper plot shows the B allele frequency (*y* axis) for each probe position (*x* axis). The array profiles for F1:II-5 and F2:III-7 show 3 copies of the genomic region chr. 14: 95.76–97.62 Mb, with an increased log R ratio of ~0.4 and B allele frequencies with values at 0 for the AAA genotype, 0.33 for the AAB genotype, 0.67 for the ABB genotype and 1 for the BBB genotype. The array profile for F1:I-2 (a control) shows only 2 copies for this segment with a normal log R ratio and B allele frequencies with values at 0 for the ABB genotype. (c) Gel electrophoresis showing the amplification of a 962-bp junction fragment in patients (F1:III-4 and F2:III-10) and its absence in non-carrier controls (F1:III-6 and F2:IV-8). Analysis of DNA extracted from blood and fibroblasts (F2:III-10) showed the germline status of the identified CNV. The primers used for PCR were Chr14_B2-C2.1F and Chr14_B1-C2.3R (**Supplementary Table 2**). (d) Mapping and sequencing of the proximal and distal breakpoints established the duplication as a 700-kb head-to-tail tandem duplication. (e) Schematic structural organization of the duplicated region including six genes. Arrowheads indicate the direction of transcription.

percentage of large primitive erythroblast colonies was higher for P3-CNV-VF-TET2 progenitor cells as compared to P3-CNV-VF and control progenitor cells (**Supplementary Fig. 5b,c**).

JAK2 is a key molecule in the cytokine receptor signaling cascade, and JAK2 Val617Phe induces constitutive activation of downstream signaling pathways in cell lines and primary cells²⁰. iPSC-derived





Figure 3 Pie chart representation of acquired signaling and epigenetic mutations in MPN from the four families.

erythroblasts were expanded in liquid culture in the presence of EPO and SCF from day 12 to day 18 and then deprived of cytokines. Constitutive STAT5, ERK and AKT phosphorylation was observed only in P3-CNV-VF and P3-CNV-VF-TET2 cells (**Supplementary Fig. 5d**), confirming their EPO-independent growth. This effect was not observed in either P2-VF cells, bearing only a heterozygous *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe, or P4-CNV cells. EPO induced the phosphorylation of STAT5, ERK and AKT in all erythroblast cultures, whatever their genotype. These results argue for a synergistic effect of the CNV and the *JAK2* and *TET2* mutations on erythroid progenitor sensitivity to EPO.

We subsequently explored the TPO sensitivity of megakaryocyte progenitors. Day 12 GPA+CD41⁺ progenitors were sorted and grown for 12 d in serum-free fibrin clots in the presence or absence of increasing TPO concentrations. Rare TPO-independent megakaryocyte colonies, around 10% of the maximum number for TPOstimulated cultures, were obtained for megakaryocyte progenitors generated from control iPSCs in contrast to the 50% of maximum TPO-stimulated colonies obtained for TPO-independent megakaryocyte colonies generated from iPSCs heterozygous for the *JAK2* mutation, as described¹⁵ (**Supplementary Fig. 5e**). Interestingly, the predisposition locus alone (P4-CNV) caused a similar induction in the formation of TPO-independent megakaryocytes (resulting in around 40% of the maximum colony numbers for TPO-stimulated cells), an effect that was further enhanced by the *JAK2* mutation (P3-CNV-VF), whereas *TET2* mutation (P3-CNV-VF-TET2) did not further modify the response to TPO. Finally, when GPA+CD41+ progenitors were cultured in the presence of SCF and TPO, the mega-karyocytes derived from all iPSCs harboring the predisposition locus showed enrichment for hyperploid megakaryocyte cells (**Supplementary Fig. 5f.g**).

To validate these observations, we went back to CD34⁺ hematopoietic progenitors from patients, including F2:III-6 (CNV alone), F2:IV-2 (CNV and a low burden of JAK2 mutation (p.Val617Phe)), F2:III-2 (CNV and JAK2 (p.Val617Phe) and TET2 mutation) and F1:II-1 (CNV and JAK2 (p.Val617Phe) and IDH1 mutation), and explored their ability to form EECs and endogenous CFU-MKs. We observed that the CNV alone promoted the spontaneous generation of colony forming unit-megakaryocytes (CFU-MKs) and that this effect was reinforced by JAK2 mutation (Fig. 6a). We also detected a tiny amount of spontaneous EEC formation with the CNV alone that was further enhanced by the JAK2 mutation in patients F2:IV-2 and F1:II-1 (Fig. 6b). The TET2 mutation, in contrast to the IDH1 mutation, did not have an additive effect on this response but instead affected the size of the colonies and, thus, the proliferation rate of the erythroblasts (F2:III-6 versus F2:III-2; Fig. 6c). Taken together, the results suggest that the CNV predisposition locus promotes megakaryopoiesis by inducing the spontaneous generation of CFU-MKs and the formation of hyperploid megakaryocytes. The CNV predisposition locus also seems to cooperate with the JAK2 mutation to modify the response of hematopoietic progenitors to EPO.

Characterization of genes involved in the phenotype

To investigate the function of *ATG2B* and *GSKIP* in hematopoiesis, we transduced CD34⁺ progenitor cells from controls with a lentivirus expressing either short hairpin RNA (shRNA) targeting these genes or a scrambled sequence, with GFP as a selection marker. The shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP*, alone or in combination, resulted in about a 40–50% reduction in the transcript levels of their respective targets (**Fig. 7a**). We explored the effect of these shRNAs on megakaryocyte progenitors and found a significant decrease in the frequency of CFU-MKs with each shRNA alone or with the shRNAs used in combination. In addition, the simultaneous silencing of both *ATG2B*





Erythroid differentiation

Figure 4 ATG2B and GSKIP are overexpressed by the CNV. (a) *TCL1A*, BDKRB1, BDKRB2, ATG2B, GSKIP, AK7, STAT5A and RUNX1 signal intensities normalized to those for a housekeeping gene (*PPIA* or *B2M*) in microarrays on EBVCs (n = 3), CD34⁺ progenitor–derived CD41⁺ megakaryocytes (n = 3) and CD34⁺ progenitor–derived CD36⁺ erythroblasts (n = 3). Data are shown as means ±s.e.m for EBVCs from three different donors in triplicate. (b) Relative fold change in *TCL1A*, ATG2B and GSKIP expression in control EBVCs (n = 3 in triplicate) as compared to patient-derived EBVCs (n = 5 in triplicate). Data are shown as means ±s.e.m.; *P < 0.05, **P < 0.01, Student's *t* test. (c,d) Primary cells from three control donors were sorted for CD34⁺ cells,

grown with SCF (25 ng/ml) and TPO (20 ng/ml) (c) or with SCF (25 ng/ml), interleukin (IL)-3 (10 μ g/ml) and EPO (1 U/ml) (d), and sorted at day 6 or 10 for megakaryocyte (MK) differentiation (c) or at day 7 or 14 for erythroid differentiation (d). *ATG2B* and *GSKIP* levels were quantified by qRT-PCR in each fraction. Expression relative to that of *PPIA* was calculated. Data are shown as means ±s.e.m. (e) *ATG2B* and *GSKIP* expression was quantified by qRT-PCR in CD41+CD42+ cells derived from three controls and three patients at day 10 of megakaryocyte differentiation. Data are shown as means ±s.e.m.; ***P* < 0.01, Student's *t* test.



n = 4; *P < 0.05. (b) Hematopoietic differentiation of iPSCs (control, P2-VF, P3-CNV-VF, P3-CNV-VF-TET2 and P4-CNV) was induced by seeding iPSCs onto OP9 stromal cells in the presence of VEGF and hematopoietic cytokines. Bulk and hematopoietic cells collected at days 8, 10, 12, 15, 18 and 21 were analyzed by flow cytometry. The relative percentages of CD41⁺, GPA⁺ and CD14⁺ cells were calculated. Data are shown as means ±s.e.m.; n = 3; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, Student's *t* test for CD41⁺ and CD14⁺ cells and Bonferroni test for GPA⁺ cells. (c) The hematopoietic potential of iPSCs was quantified by plating one TRA-1-81⁺ cell per well in a 96-well plate coated with OP9 stromal cells. The absolute numbers of CD41⁺, GPA⁺ and CD14⁺ cells in each clone were measured by flow cytometry at day 18. Data are shown as means ±s.e.m.; n > 20 clones per genotype, 2 independent experiments; *P < 0.05, **P < 0.001, Mann-Whitney test, two-tailed).

and *GSKIP* led to a further decrease in CFU-MK size beyond that resulting from silencing with the shRNAs individually (**Fig. 7b,c**).

To investigate the role of these genes in the phenotypic consequences of the genomic duplication, the shRNAs were virally transduced, alone or in combination, into CD41+GPA+ megakaryocyte progenitors generated from P4-CNV iPSCs at day 12, and the progenitors were grown for 12 additional days in serum-free fibrin clots in the presence or absence of TPO (Fig. 7d). ATG2B and GSKIP shRNA alone had no impact on spontaneous CFU-MK formation, but the combination of these shRNAs resulted in a major inhibition of TPOindependent CFU-MK formation (Fig. 7e). The role of ATG2B and GSKIP in the spontaneous generation of megakaryocytes was further confirmed by virally transducing both shRNAs into CD34⁺ hematopoietic progenitor cells from patients (Fig. 7f,g). Conversely, we failed to detect any effect of TCL1A downregulation by shRNA under the same conditions, and overexpression of TCL1A in CD34⁺ progenitors did not result in the spontaneous generation of megakaryocytes (data not shown). Altogether, our findings indicate that both ATG2B and GSKIP are responsible for the megakaryocyte phenotype induced by the CNV predisposition locus.

functioning of the endoplasmic reticulum with deregulated chaperoning and glycosylation (**Supplementary Table 4**). Transcriptome analysis showed a significant (P < 0.001) increase in the expression of *WIP11* (*ATG18*), which encodes a protein that interacts with ATG2B, in patients with MPN. Moreover, autophagosome accumulation was found in platelets from patients or asymptomatic carriers, as shown by an increase in the levels of the autophagosome marker LC3-II, a phosphatidylethanolamine-conjugated form of LC3-I (**Supplementary Fig. 6a,b**).

DISCUSSION

We identified a 700-kb germline duplication that predisposes patients to myeloid malignancies, including AML, MPN, CMML and frequent essential thrombocythemia with progression to myelofibrosis and secondary AML. Two of the six duplicated genes, namely *ATG2B* and *GSKIP*, are overexpressed in hematopoietic progenitors. In turn, megakaryocyte progenitors demonstrate increased sensitivity to TPO. The overexpression of these genes cooperates with classical mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR* to generate the MPN phenotype. This germline duplication is, to our knowledge, the first identified genomic alteration that accounts for familial MPN.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis of the genes differentially expressed by control- and patient-derived EBVCs identified eight significantly different gene sets and points to abnormal

Some susceptibility alleles, such as the one in the *JAK2* 46/1 haplotype, an intronic SNP in the *TERT* gene^{9–13} and variants in the





The percentage of CFU-MKs (a) or erythroid colonies (b) was calculated in comparison to the condition with maximum growth (with either 10 ng/ml TPO or 1 U/ml EPO, respectively). Results are shown as means \pm s.d. (c) Images represent EECs (obtained without EPO). Scale bars, 200 μ m.

ARTICLES



control with scrambled shRNA. (c) CFU-MKs were classified on the basis of megakaryocyte cluster size (corresponding to the number of megakaryocytes per colony). (d) CD41⁺ cells derived from P4-CNV iPSCs were virally transduced with shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP*, and the expression of these genes was calculated in comparison to *PPIA* levels. (e) iPSC-derived hematopoietic progenitors (CD41⁺GPA⁺) were plated in plasma clots with or without TPO, and CFU-MKs were counted at day 10 after indirect staining for CD41a. The percentage of spontaneous CFU-MKs was calculated for each condition in comparison to the condition with maximum growth. (f) CD34⁺ cells purified from patients F2:III-2, F2:IV-4, F2:IV-5 and F2:III-10 were virally transduced with scrambled shRNA or shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP*, and the expression of these genes was calculated in comparison to *PPIA* levels. (g) CD34⁺ cells from patients (F2:III-2, F2:IV-4, F2:IV-5 and F2:III-10) were virally transduced with scrambled shRNA or shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP*, and the expression of these genes was calculated in comparison to *PPIA* levels. (g) CD34⁺ cells from patients (F2:III-2, F2:IV-4, F2:IV-5 and F2:III-10) were virally transduced with or without SCF and TPO, and CFU-MKs were counted at day 10 after indirect staining for CD41a. The percentage of inhibition of spontaneous CFU-MK formation with combined shRNAs to *ATG2B* and *GSKIP* was calculated in comparison to the condition with scrambled control shRNA. Results are the means ±s.e.m. of three independent experiments for **b**, **c** and **e**, four independent experiments for **a**, **f** and **g**, and five independent experiments for **d**; **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, Student's *t* test.

ERCC2, ATM, CCDC6 and NR3C1 (GR) genes, are diversely present in the general population and favor the development or evolution of sporadic cases of MPN^{21,22}. However, they appear to have limited roles in familial MPN. CNVs, involving either deletion or amplification, have been frequently related to cancer predisposition^{23,24}. The 700-kb germline duplicated region identified here, which segregates among the 24 affected family members of the 4 families, is associated with a high penetrance level, above 80%. The predisposition locus is located in the 14q32.2 region, which is rarely affected by recurrent cytogenetic aberrations in chronic and acute phases of MPN evolution²⁵⁻²⁷, although trisomy 14 has been associated with myeloid malignancies that develop in older individuals^{28,29}, in MDS, atypical chronic myeloid leukemia (aCML) and CMML^{30,31}. Interestingly, one patient (F1:II-7) who directly developed an acute leukemia demonstrated mosaic trisomy 14 with up to five copies of the CNV, arguing for a gene dosage effect.

Our familial MPN cases were characterized by an earlier age of MPN onset in comparison to sporadic cases (41 years versus >60 years). Notably, the spectrum of acquired driver mutations leading to essential thrombocythemia included JAK2 (p.Val617Phe), MPL and CALR mutations, with some cases triple negative for these mutations, similar to the spectrum of mutations in sporadic essential thrombocythemia cases^{32,33}. Additional genetic events were detected in this setting, including the combination of a BCR-ABL fusion gene³⁴ and epigenetic regulator gene mutations affecting TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1, when the MPN progressed. The percentage of cases with TET2 mutations (38%) was very high when compared to that described for cases of sporadic essential thrombocythemia and other familial clusters of MPN (10-15%)^{7,35}. The detection of TET2 mutations (including biallelic mutations) and IDH1 and IDH2 mutations was frequently associated with disease progression to acute leukemia, in agreement with some observations suggesting that, in MPN, the acquisition of a *TET2* mutation is predictive of a poor outcome and a high risk of transformation into leukemia^{7,36,37}. No mutation of *TP53* was found in our cases, contrary to what was observed in AML evolving from MPN, suggesting two different pathways for leukemic transformation.

A well-studied chromosomal duplication that predisposes to acute leukemia is the trisomy 21 responsible for Down syndrome. Trisomy 21 predisposes to the acquisition of GATA1 mutations resulting in a short form of the transcription factor, which induces a transient myeloproliferative disorder. In about 25% of cases, this transient proliferation evolves into megakaryoblastic leukemia through the acquisition of secondary mutations that target cohesin components, epigenetic modulators and signaling pathways, including JAK2 and MPL mutations³⁸. There is evidence that trisomy 21, by increasing the proliferation of erythroid and megakaryocyte progenitors in fetal liver, predisposes to leukemia. This effect has been modeled in iPSCs, as mouse models of trisomy 21 failed to fully recapitulate the disease predisposition^{39,40}. We also established iPSC clones to explore the consequences of the gene duplication, alone or in combination with acquired mutations, on hematopoiesis, showing that the CNV (i) promotes the amplification of hematopoietic progenitors, including megakaryocytes, through increasing their sensitivity to TPO; (ii) consequently induces an increase in the size and ploidy of mature CD41⁺ megakaryocytes; (iii) cooperates with JAK2 (p.Val617Phe) mutation to increase the sensitivity of erythroid progenitors to EPO and promote constitutive activation of signaling pathways; and (iv) synergizes with TET2 and JAK2 (p.Val617Phe) mutations to promote erythroid cell proliferation and amplification. The hypersensitivity of hematopoietic precursors carrying the CNV to EPO and TPO was further confirmed in primary cells collected from patients. As with trisomy 21, the identified germline duplication did not result in overt genetic instability but rather increased the fitness of the JAK2 mutation encoding p.Val617Phe by acting synergistically with it. In agreement with this, we observed a similar occurrence of higher numbers of mutations (around 10–15) during iPSC reprogramming in cells derived from patients in comparison to control cells from normal donors⁴¹. Moreover, recent data show that the *JAK2* mutation encoding p.Val617Phe is quite frequent in the general aging population^{42–45}, suggesting that it rarely induces MPN development, as demonstrated in mice engrafted with a single hematopoietic stem cell (HSC) expressing Jak2 Val617Phe⁴⁶. Therefore, the duplication could provide a favorable genetic background to facilitate the clonal dominance of a cell expressing JAK2 Val617Phe (**Supplementary Fig. 7**). In support of this hypothesis, (i) the duplication enhances the fitness of mutations but does not directly cause a mutant phenotype and (ii) the spectrum and distribution of signaling mutations in these families are similar to those of sporadic MPN cases.

Of the six duplicated genes in the CNV region, only the expression of ATG2B and GSKIP was reproducibly detected in hematopoietic cells, including CD34⁺ hematopoietic progenitors, megakaryocytes and erythroid cells. TCL1A, whose expression was first described in mature T cell leukemia, was not expressed in CD34⁺ cells or myeloid cells, nor was it overexpressed in patient-derived EBVCs. Strikingly, ATG2B cooperated with GSKIP to induce the spontaneous formation of CFU-MKs from patient-derived cells and iPSC-derived hematopoietic cells, and silencing of ATG2B and GSKIP reversed this phenotype. Loss-of-function mutations in ATG2B, which encodes an important player in autophagy⁴⁷, have been identified in gastric and colorectal cancers⁴⁸, and deregulated autophagy could affect HSC self-renewal capabilities, for example, in aging subjects^{49,50}. Accordingly, we found increased autophagosome accumulation in platelets from patients and asymptomatic carriers of the CNV. The GSKIP gene encodes a negative regulator of GSK3 β (refs. 51,52), and its mutation may thus mimic activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway involved in HSC homeostasis and normal megakaryopoiesis^{53,54}, as well as transformation in chronic myeloid leukemia and the development of leukemia stem cells in AML^{55,56}. Accordingly, the overexpression of these two genes may account for the progression of essential thrombocythemia to myelofibrosis and AML observed in the families studied here. Complementary studies will explore how ATG2B and GSKIP overexpression cooperates with JAK2 (p.Val617Phe) mutation to provide a growth advantage to HSCs. It may also be useful to determine whether ATG2B or GSKIP amplification is a frequent event in a large cohort of patients with sporadic MPN.

In summary, analysis of four families with the same geographical origin identifies a locus whose duplication promotes the occurrence of severe MPN through overexpression of *ATG2B* and *GSKIP*, resulting in increased fitness for cells bearing somatic mutations such as mutations in *JAK2*, *MPL* and *CALR*. Together with the recent observation that these mutations are frequent in otherwise healthy aging individuals, these results pave the way for the search for other genetic events that promote the expansion of mutated cells and the generation of overt MPNs, with or without progression to myelofibrosis and AML.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Accession codes. The microarray data have been submitted to the ArrayExpress data repository at the European Bioinformatics Institute under accession E-MTAB-3570. CGH array data are available at the Gene Expression Omnibus (GEO) under accession GSE67938.

The CNVs found in patients were deposited in ClinVar under accessions SCV000223992, SCV000224007, SCV000224008, SCV000224009 and SCV000224010.

Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank all the patients and family members involved in the study. We also thank O. Bawa and P. Opolon for the histopathological analysis of teratomas. We thank B. Benyahia for cytogenetic analysis. We thank M. Vestris for recruitment of patients. We greatly thank B. Job and the genomic platform for transcriptome and CGH analysis and also the iPSC platform of Institut Gustave Roussy. We thank S. Saker and T. Larmonier from the Généthon DNA and Cell Bank (Evry, France) for the establishment of B-lymphoblastoid cells from 'NMP' patients. We thank the cytometry platform of Institut Gustave Roussy (P. Rameau and Y. Lecluse). We thank C. Marzac for clinical data. We are grateful to S. Constantinescu and J. Feunteun for critical reading of the manuscript. We are also very grateful to E. Schwartz for proofreading the manuscript.

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Blanc Megon 2009, Thrombocytosis 2011; ANR-13-JVSV1-GERMPN-01), Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (Fondation ARC Libre 2012-SL220120605292), Groupe Information Santé (GIS)–Institute for Rare Diseases for High-Throughput Sequencing (AO9102LS), Association de Recherche sur la Moelle Osseuse (ARMO), regional Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) AOR07014, Association Laurette Fugain and INCa-DGOS-INSERM 6043. Labex GR-Ex (I.P. and W.V.) is funded by the program 'Investissements d'Avenir'. G. Lenglet was supported by a postdoctoral fellowship from Ile-de-France Cancéropôle and ANR Molecular Medicine in Oncology (MMO) (funded by the program 'Investissements d'Avenir'). F.P. was supported by ARC. L.S. and J.S. were supported by doctoral grants from the Ile-de-France region (Cancéropôle and DIM Cellule Souche) and from Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). C.M. was supported by ANR-13-JVSV1-GERMPN-01.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

W.V., I.P. and C.B.-C. designed and performed research, analyzed data, prepared figures and wrote the manuscript. J.S. performed research on iPSCs and primary cells. G. Lenglet, A.D.S. and L.S. performed research on iPSCs. C.S.-M., N. Droin and G. Leroy performed pangenomic analysis. C.M. performed immunoblot and qRT-PCR analyses. A.P. purified primary cells from donors. E.M. performed colony assays. F.P., J.-C.M., C.D.-D., P.F., F.I. and N.C. were involved in the clinical aspect of the study. A.N. was involved in the clinical aspect of the study and initiated the familial study of MPN. S.G. and S.C. were involved in the generation of EBVCs and their study. B.K. performed cytogenetic analysis. M'b.D., J.M. and P.D. carried out bioinformatics study of exome and transcriptomic data. N. Debili and H.R. provided experimental and/or intellectual input on iPSC culture and hematopoietic differentiation. V.D.V. performed TCL1 mouse modeling. E.S. and O.A.B. contributed intellectual input. All authors contributed to writing and editing.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permissions information is available online at http://www.nature.com/ reprints/index.html.

- Song, W.J. *et al.* Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat. Genet.* 23, 166–175 (1999).
- Smith, M.L., Cavenagh, J.D., Lister, T.A. & Fitzgibbon, J. Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 351, 2403–2407 (2004).
- Hahn, C.N. et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nat. Genet. 43, 1012–1017 (2011).
- Pasquet, M. *et al.* High frequency of *GATA2* mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 822–829 (2013).
- Bluteau, D. *et al.* Thrombocytopenia-associated mutations in the *ANKRD26* regulatory region induce MAPK hyperactivation. *J. Clin. Invest.* **124**, 580–591 (2014).
- Bellanné-Chantelot, C. *et al.* Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 108, 346–352 (2006).
- Saint-Martin, C. et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. Blood 114, 1628–1632 (2009).

- Yamada, O. *et al.* Emergence of a *BCR-ABL* translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of *BCR-ABL* in the JAK2V617F clone. J. Clin. Oncol. **32**, e76–e79 (2014).
- Jones, A.V. *et al. JAK2* haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 41, 446–449 (2009).
- Kilpivaara, O. *et al.* A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2^{V617F}-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* 41, 455–459 (2009).
- Olcaydu, D. et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. Nat. Genet. 41, 450–454 (2009).
- Jäger, R. *et al.* Common germline variation at the *TERT* locus contributes to familial clustering of myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* **89**, 1107–1110 (2014).
 Oddsson, A. *et al.* The germline sequence variant rs2736100_C in *TERT* associates
- with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **28**, 1371–1374 (2014).
- 14. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
- Saliba, J. *et al.* Heterozygous and homozygous JAK2^{V617F} states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients. *PLoS ONE* 8, e74257 (2013).
- Takayama, N. et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. Blood 111, 5298–5306 (2008).
- Klimchenko, O. *et al.* A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* **114**, 1506–1517 (2009).
- Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A. & Slukvin, I.I. Human embryonic stem cell–derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* **105**, 617–626 (2005).
- Prchal, J.F. & Axelrad, A.A. Letter: bone-marrow responses in polycythemia vera. N. Engl. J. Med. 290, 1382 (1974).
- James, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434, 1144–1148 (2005).
- Jones, A.V. & Cross, N.C. Inherited predisposition to myeloproliferative neoplasms. Ther. Adv. Hematol. 4, 237–253 (2013).
- Harutyunyan, A.S. & Kralovics, R. Role of germline genetic factors in MPN pathogenesis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 26, 1037–1051 (2012).
- Krepischi, A.C., Pearson, P.L. & Rosenberg, C. Germline copy number variations and cancer predisposition. *Future Oncol.* 8, 441–450 (2012).
- Kuiper, R.P., Ligtenberg, M.J., Hoogerbrugge, N. & Geurts van Kessel, A. Germline copy number variation and cancer risk. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 282–289 (2010).
- Klampfl, T. *et al.* Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* **118**, 167–176 (2011).
- Rice, K.L. *et al.* Analysis of genomic aberrations and gene expression profiling identifies novel lesions and pathways in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cancer J.* 1, e40 (2011).
- Rumi, E. et al. Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. Am. J. Hematol. 86, 974–979 (2011).
- Cui, W. et al. Trisomy 14 as a sole chromosome abnormality is associated with older age, a heterogenous group of myeloid neoplasms with dysplasia, and a wide spectrum of disease progression. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 365318 (2010).
- Mancini, M. et al. Trisomy 14 in hematologic diseases. Another non-random abnormality within myeloid proliferative disorders. Cancer Genet. Cytogenet. 66, 39–42 (1993).
- Mertens, F. et al. Trisomy 14 in atypical chronic myeloid leukemia. Leukemia 4, 117–120 (1990).
- Toze, C.L., Barnett, M.J., Naiman, S.C. & Horsman, D.E. Trisomy 14 is a non-random karyotypic abnormality associated with myeloid malignancies. *Br. J. Haematol.* 98, 177–185 (1997).

- Bellanne-Chantelot, C., Jego, P., Lionne-Huyghe, P., Tulliez, M. & Najman, A. The JAK2^{V617F} mutation may be present several years before the occurrence of overt myeloproliferative disorders. *Leukemia* 22, 450–451 (2008).
- Rumi, E. *et al. CALR* exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 123, 2416–2419 (2014).
- Cabagnols, X., Cayuela, J.M. & Vainchenker, W. A CALR mutation preceding BCR-ABL1 in an atypical myeloproliferative neoplasm. N. Engl. J. Med. 372, 688–690 (2015).
- Delhommeau, F. et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N. Engl. J. Med. 360, 2289–2301 (2009).
- Abdel-Wahab, O. et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res. 70, 447–452 (2010).
- Lundberg, P. et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood 123, 2220–2228 (2014).
- Yoshida, K. *et al.* The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat. Genet.* 45, 1293–1299 (2013).
- Chou, S.T. *et al.* Trisomy 21–associated defects in human primitive hematopoiesis revealed through induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 17573–17578 (2012).
- Maclean, G.A. *et al.* Altered hematopoiesis in trisomy 21 as revealed through in vitro differentiation of isogenic human pluripotent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 17567–17572 (2012).
- Gore, A. et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature 471, 63–67 (2011).
- Genovese, G. *et al.* Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* 371, 2477–2487 (2014).
- Jaiswal, S. et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N. Engl. J. Med. 371, 2488–2498 (2014).
- McKerrell, T. et al. Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. Cell Rep. 10, 1239–1245 (2015).
- 45. Xie, M. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat. Med. 20, 1472–1478 (2014).
- Lundberg, P. et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. J. Exp. Med. 211, 2213–2230 (2014).
- Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E. & Mizushima, N. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J. Cell Sci.* 127, 4089–4102 (2014).
- Kang, M.R. *et al.* Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. J. Pathol. 217, 702–706 (2009).
- Mortensen, M., Watson, A.S. & Simon, A.K. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy* 7, 1069–1070 (2011).
- Warr, M.R. et al. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. Nature 494, 323–327 (2013).
- Chou, H.Y. et al. GSKIP is homologous to the Axin GSK3(interaction domain and functions as a negative regulator of GSK3β. Biochemistry 45, 11379–11389 (2006).
- Lin, C.C. *et al.* GSKIP, an inhibitor of GSK3β, mediates the N-cadherin/β-catenin pool in the differentiation of SH-SY5Y cells. *J. Cell. Biochem.* **108**, 1325–1336 (2009).
- 53. Li, D., August, S. & Woulfe, D.S. GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis. *Blood* **111**, 3522–3530 (2008).
- Soda, M., Willert, K., Kaushansky, K. & Geddis, A.E. Inhibition of GSK-3β promotes survival and proliferation of megakaryocytic cells through a β-catenin–independent pathway. *Cell. Signal.* 20, 2317–2323 (2008).
- Abrahamsson, A.E. *et al.* Glycogen synthase kinase 3β missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3925–3929 (2009).
- 56. Wang, Y. *et al.* The Wnt/β-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* **327**, 1650–1653 (2010).

ONLINE METHODS

Patients. All participants in this study gave their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the local research ethics committee from Saint-Antoine Hospital (Paris, France). MPN was defined according to World Health Organization (WHO) criteria for essential thrombocythemia and myelofibrosis⁵⁷. Clinical features and hematological parameters were collected at diagnosis and during the course of the disease and recorded in an Access database approved by the French computer commission (CNIL 815419).

We studied 4 families originating from the West Indies and analyzed as controls 98 unrelated familial cases collected through a national network previously described as controls^{6,58}. We also used geographically matched DNA controls from 39 sporadic MPN cases recruited from the Department of Hematology (Fort de France Hospital) and 199 healthy controls of West Indies origin collected by the Department of Genetics (Pitié-Salpêtrière Hospital).

iPSC generation and culture. CD34⁺ and CD3⁺ cells were purified from blood mononuclear cells. CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cells were cultured in serum-free medium with cytokines for 5 d before being infected with VSV-G pseudotyped retroviruses encoding *Oct4*, *Myc*, *Klf4* and *Sox2* (ref. 14). Six days later, cells were seeded on irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in ES medium⁵⁹. Colonies with an ES-like morphology were picked from day 20 to day 30 and expanded. Cells were routinely screened for mycoplasma using the Plasma Test kit (Invivogen).

Hematopoietic differentiation was performed on OP9 stromal cells in the presence of VEGF (20 ng/ml; Peprotech)¹⁶. The mouse OP9 cell line was from the RIKEN Institute, Osaka University. On day 7, EPO (1 U/ml; Amgen), TPO (20 ng/ml; a generous gift from Kirin), SCF (25 ng/ml; Biovitrum AB) and IL-3 (10 ng/ml; Miltenyi Biotec) were added, and on days 11 and 12 cells were enzymatically dissociated. The recovered cells were cultured or sorted on the basis of the expression of GPA and CD41. Clonal differentiation of iPSCs was also performed on OP9 cells.

Quantification of clonogenic progenitors in semisolid culture. Cells were plated either in methylcellulose to quantify erythroid and granulomonocytic (CFU-GM) progenitors or in serum-free fibrin clot assays to quantify CFU-MKs⁶⁰. Cultures were scored after 12–14 d for all colonies¹⁷. CFU-MKs were enumerated at day 10 after labeling by an indirect alkaline phosphatase-based immunostaining technique using a monoclonal antibody to CD41a (Becton Dickinson, clone HIP8), as previously described⁶⁰.

Teratoma assays and embryoid bodies. iPSCs (1×10^6) were scraped off plates and resuspended in 140 µl of ES medium. Undiluted Matrigel (60 µl) was added before subcutaneous injection into $Rag2^{-/-}\gamma C^{-/-}$ mice. After 8–12 weeks, tumors were isolated and fixed in 10% formalin. Sections were stained for germ layer analysis. Spontaneous differentiation was achieved by embryoid body formation¹⁷.

Antibodies and flow cytometry analysis. Monoclonal antibodies directly conjugated to fluorescent dye were used for iPSCs (SSEA4, eBioscience; TRA-1-81, BD) and for the sorting and characterization of hematopoietic cells (CD34, Beckman; CD43 (clone L10), CD42 (clone GRP-P) and GPA (clone CLB-ery-1(AME-1)), Invitrogen; CD41 (clone HIP2) and CD14 (clone M5E2), Pharmingen). Cells were sorted on an Influx flow cytometer (BD) and analyzed on a FACSCanto II (BD). iPSC colonies were stained by an alkaline phosphatase reaction (Stemgent).

Quantitative RT-PCR and gene expression array analysis. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen), and cDNA was synthesized by SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR reactions were carried out on the ABI Prism GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Life Technologies), using Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) and TaqMan gene expression assays for *TCL1A*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *ATG2B* and *GSKIP* (Applied Biosystems, Life Technologies). The expression for all genes was calculated relative to the levels of *PPIA* or *HPRT1*. For microarray analysis, RNA was hybridized to Agilent 4X44K arrays

according to the manufacturer's protocols. Analysis was performed using Bioconductor and Rosetta Resolver (Microsoft). Gene set class comparison was performed with KEGG to classify regulated genes.

Karyotypes and CGH arrays. CGH arrays for CD34⁺ cells and iPSCs were conducted on the human CGH 2x400K platform (G4448A, Agilent Technologies) by hybridization of sample versus matched normal commercially available reference, and hierarchical clustering was performed. Karyotype analysis was performed using standard procedures on R-banded metaphase spreads (450–600 bands).

Linkage analysis, microsatellite genotyping and single-nucleotide array analysis. Families F1 and F2 were subjected to a genome scan using the 6 K Illumina SNP genotyping Linkage IVb panel on a BeadStation system (Illumina). Allele detection and genotype calling were performed using BeadStudio software (Illumina). Genotype data from the genome scan were subjected to parametric linkage analyses in MERLIN using a dominant model with incomplete penetrance (0.8), a disease allele frequency of 0.000005 and no phenocopy.

A total of 16 microsatellite markers spanning the chromosome 14 candidate regions were added to the analysis. All microsatellites were analyzed by electrophoresis on the ABI3730 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems), and data were collected and analyzed using GENESCAN software Version 4.0 (PE Applied Biosystems). Multipoint parametric linkage analysis was performed in ALLEGRO using a dominant model with incomplete penetrance (0.8), a disease allele frequency of 0.000005 and no phenocopy. Microsatellite allele frequencies were deduced from a matched control population (n = 33).

SNP array analysis. Five affected cases (F1:II-2, F1:II-5, F1:II-7, F2:III-2 and F2:III-7; **Fig. 1**) and one unaffected control (F1:I-2) were genotyped using the Illumina Human CNV 370 BeadChip. Results were analyzed with the genome viewer in Illumina GenomeStudio software. The duplicated region was further confirmed by qRT-PCR based on SYBR Green I fluorescence using the ABI 7900 Sequence Detection System (Life Technologies, Thermo Scientific). Primers were designed mapping to two genes in proximal and distal parts of the duplicated region, and PCR was carried out in a 20-µl reaction using SYBR Green I PCR Master Mix (Life Technologies) together with 300 nmol/l of each primer and 20 ng of DNA. We used as reference the β -globin gene (*HBB*). The number of copies was determined as previously described⁶¹. Primer sequences are available in **Supplementary Table 2**.

Characterization of the duplication. The breakpoints of the duplicated motif were determined by quantitative RT-PCR based on SYBR Green I fluorescence. Oligonucleotides were designed for 12 amplicons between 100 and 200 bp in length (**Supplementary Table 2**). Refinement of the breakpoints and determination of the orientation of the two duplicated motifs were carried out by PCR and agarose gel electrophoresis (Chr14_B2C2.1F and Chr14_B1C2.3R; **Fig. 2c**) followed by sequencing analysis (Chr14_B2C2.1F/Chr14dup_joncR and Chr14dup_joncF/Chr14_B1C2.3R; **Fig. 2d**).

Targeted sequencing and whole-exome sequencing. Primers were designed with Primer3plus. The coding sequence and exon-intron boundaries of candidate genes were amplified, and PCR products were sequenced in both directions with the ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit (Life Technologies) on an ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer. Sequences were analyzed with Seqscape software v 2.2 (Life Technologies), and variants identified were analyzed with Alamutv2 software (Interactive Biosoftware). Signaling mutations of *JAK2* (c.1849G>T, p.Val617Phe), *MPL* (c.1544G>T, p.Trp515Leu) and *CALR* (c.1099_1150del, p.Leu367Thrfs*46 and c.1154_1155ins, p.Lys385Asnfs*47) were analyzed as previously described⁵³. The spectrum of other acquired events was determined by Sanger sequencing of *IDH1* and *IDH2* (exons 4 and 5), *ASXL1* (exons 12 and 13) and the entire coding regions of *TET2, EZH2, DNMT3A* and *TP53*.

Whole-exome sequencing was performed using the HiSeq 2000 platform after capture with the Agilent kit (SureSelect v4). We analyzed the results by comparing CD3⁺ non-tumoral cells to either CD34⁺ cells or iPSCs and by

comparing CD34⁺ cells to iPSCs (CD3⁺ and CD34⁺ cells were purified by CD34 or CD3 microbead kit (Miltenyi Biotec, 130-046-702 and 130-050-101)).

Immunoblot analysis. Signaling studies were performed on cultured erythroblasts after overnight cytokine deprivation in serum-free medium. Stimulation by EPO (10 U/ml) for 15 min served as a positive control. Samples were subjected to immunoblot analysis using polyclonal antibodies against the phosphorylated forms of STAT5 (Tyr694, 9359), ERK1 and ERK2 (Thr202/Tyr204, 9101) and AKT (Ser473, 9271) and the LC3I/II form of LC3 (12741) (Cell Signaling Technology). HSC70 was used as a loading control, and the corresponding antibody was from Stressgen.

Constructs and viral particle production. The sequences for shRNAs targeting human *ATG2B* and *GSKIP* (**Supplementary Table 2**) were vectorized either in PLKO.1-puromycin-Ubc-turboGFP (Sigma-Aldrich) or PRRLsin-PGK-eGFP-WPRE for *GSKIP* shRNA or in PRRLsin-PGK-mCherry-WPRE for *ATG2B* shRNA (Généthon). Lentivirus particles were produced as previously described⁶². iPSC-derived CD34⁺ cells or CD34⁺ cells were transduced with lentivirus encoding shRNA for *GSKIP* or *ATG2B* and sorted for GFP or mCherry, respectively, on the BD Influx sorter. Alternatively, we used selection with puromycin.

Statistics. Data are presented as means (±s.d. or s.e.m.). Statistical significance was determined by Student's *t* test or Mann-Whitney Wilcoxon test. P < 0.05 was considered statistically significant. A Bonferroni test was performed in instances involving testing of multiple parameters. All the tests were two-tailed and unpaired.

- 57. Tefferi, A. *et al.* Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* **110**, 1092–1097 (2007).
- Malak, S., Labopin, M., Saint-Martin, C., Bellanne-Chantelot, C. & Najman, A. Long term follow up of 93 families with myeloproliferative neoplasms: life expectancy and implications of *JAK2*^{V617F} in the occurrence of complications. *Blood Cells Mol. Dis.* 49, 170–176 (2012).
- Mali, P. et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. Stem Cells 26, 1998–2005 (2008).
- 60. Debili, N. et al. Characterization of a bipotent erythro-megakaryocytic progenitor in human bone marrow. Blood 88, 1284–1296 (1996).
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402–408 (2001).
- Plo, I. et al. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. Blood 112, 1402–1412 (2008).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Wahab, O., J. Gao, et al. (2013). "Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo." <u>The Journal of experimental medicine</u> 210(12): 2641-2659.

- Abdel-Wahab, O., A. Mullally, et al. (2009). "Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies." <u>Blood</u> 114(1): 144-147.
- Achanta, G. and P. Huang (2004). "Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents." <u>Cancer research</u> 64(17): 6233-6239.
- Ades, L., R. Itzykson, et al. (2014). "Myelodysplastic syndromes." Lancet 383(9936): 2239-2252.
- Agirre, X., F. J. Novo, et al. (2003). "TP53 is frequently altered by methylation, mutation, and/or deletion in acute lymphoblastic leukaemia." <u>Molecular carcinogenesis</u> 38(4): 201-208.
- Akada, H., S. Akada, et al. (2014). "Loss of wild-type Jak2 allele enhances myeloid cell expansion and accelerates myelofibrosis in Jak2V617F knock-in mice." <u>Leukemia</u> 28(8): 1627-1635.
- Akalin A, Garrett-Bakelman FE et al. (2012). "Base-pair resolution DNA methylation sequencing reveals profoundly divergent epigenetic landscapes in acute myeloid leukemia". <u>PLoS</u> <u>Genet</u>. 8(6).
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." <u>Nature</u> 404(6774): 193-197.
- Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, et al. (2002). "Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors." <u>Nature genetics</u> 30(2): 227-232.
- Ali, A., O. Bluteau, et al. (2013). "Thrombocytopenia induced by the histone deacetylase inhibitor abexinostat involves p53-dependent and -independent mechanisms." <u>Cell death & disease</u> 4: e738.
- Andersson, T., E. Sodersten, et al. (2009). "CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells." <u>The Journal of biological chemistry</u> 284(6): 3672-3681.
- Andreeff, M., K. R. Kelly, et al. (2015). "Results of the Phase 1 Trial of RG7112, a Small-molecule MDM2 Antagonist in Leukemia." <u>Clinical cancer research : an official journal of the</u> <u>American Association for Cancer Research</u>.
- Appella, E. and C. W. Anderson (2001). "Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses." <u>European journal of biochemistry / FEBS</u> 268(10): 2764-2772.
- Arioka, Y., A. Watanabe, et al. (2012). "Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins." <u>PloS one</u> 7(9): e45031.
- Avet-Loiseau, H., J. Y. Li, et al. (1999). "P53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma." <u>British journal of haematology</u> 106(3): 717-719.
- Ayton, P. M., E. H. Chen, et al. (2004). "Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein." <u>Molecular and cellular biology</u> 24(23): 10470-10478.
- Aziz, M. H., H. Shen, et al. (2011). "Acquisition of p53 mutations in response to the non-genotoxic p53 activator Nutlin-3." <u>Oncogene</u> 30(46): 4678-4686.
- Bader, S., M. Walker, et al. (1999). "Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency." <u>Oncogene</u> 18(56): 8044-8047.
- Bader, S. A., M. Walker, et al. (2007). "A human cancer-associated truncation of MBD4 causes dominant negative impairment of DNA repair in colon cancer cells." <u>British journal of</u> <u>cancer</u> 96(4): 660-666.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." <u>Science</u> 244(4901): 217-221.
- Bargonetti, J. and J. J. Manfredi (2002). "Multiple roles of the tumor suppressor p53." <u>Current</u> <u>opinion in oncology</u> 14(1): 86-91.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. (2005). "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." <u>Lancet</u> 365(9464): 1054-1061.

Beckerman, R. and C. Prives (2010). "Transcriptional regulation by p53." <u>Cold Spring Harbor</u> <u>perspectives in biology</u> 2(8): a000935.

- Bejar, R., A. Lord, et al. (2014). "TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients." <u>Blood</u> 124(17): 2705-2712.
- Bejar, R., K. Stevenson, et al. (2011). "Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes." <u>The New England journal of medicine</u> 364(26): 2496-2506.
- Bejar, R., K. E. Stevenson, et al. (2012). "Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes." <u>Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology</u> 30(27): 3376-3382.
- Bhutani, N., D. M. Burns, et al. (2011). "DNA demethylation dynamics." <u>Cell</u> 146(6): 866-872.
- Biderman, L., J. L. Manley, et al. (2012). "Mdm2 and MdmX as Regulators of Gene Expression." <u>Genes & cancer</u> 3(3-4): 264-273.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." <u>Genes & development</u> 16(1): 6-21.
- Bixby, D., L. Kujawski, et al. (2008). "The pre-clinical development of MDM2 inhibitors in chronic lymphocytic leukemia uncovers a central role for p53 status in sensitivity to MDM2 inhibitor-mediated apoptosis." <u>Cell cycle</u> 7(8): 971-979.
- Blaschke, K., K. T. Ebata, et al. (2013). "Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells." <u>Nature</u> 500(7461): 222-226.
- Blau, O., C. D. Baldus, et al. (2011). "Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts." <u>Blood</u> 118(20): 5583-5592.
- Bo, M. D., P. Secchiero, et al. (2010). "MDM4 (MDMX) is overexpressed in chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and marks a subset of p53wild-type CLL with a poor cytotoxic response to Nutlin-3." <u>British journal of haematology</u> 150(2): 237-239.
- Boland, M. J. and J. K. Christman (2008). "Characterization of Dnmt3b:thymine-DNA glycosylase interaction and stimulation of thymine glycosylase-mediated repair by DNA methyltransferase(s) and RNA." Journal of molecular biology 379(3): 492-504.
- Borregaard, N. (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes." Immunity 33(5): 657-670.
- Bouilloux, F., G. Juban, et al. (2008). "EKLF restricts megakaryocytic differentiation at the benefit of erythrocytic differentiation." <u>Blood</u> 112(3): 576-584.
- Brecqueville, M., J. Rey, et al. (2012). "Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms." <u>Genes, chromosomes & cancer</u> 51(8): 743-755.
- Briddell, R. A., J. E. Brandt, et al. (1989). "Characterization of the human burst-forming unitmegakaryocyte." <u>Blood</u> 74(1): 145-151.
- Brooks, C. L. and W. Gu (2006). "p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond." <u>Molecular cell</u> 21(3): 307-315.
- Bruno, S., M. Gunetti, et al. (2003). "In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution." <u>Haematologica</u> 88(4): 379-387.
- Busque, L., J. P. Patel, et al. (2012). "Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis." <u>Nature genetics</u> 44(11): 1179-1181.
- Bykov, V. J., N. Zache, et al. (2005). "PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis." <u>Oncogene</u> 24(21): 3484-3491.
- Campbell, H. G., R. Mehta, et al. (2013). "Activation of p53 following ionizing radiation, but not other stressors, is dependent on the proline-rich domain (PRD)." <u>Oncogene</u> 32(7): 827-836.
- Canadillas, J. M., H. Tidow, et al. (2006). "Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of</u> <u>America</u> 103(7): 2109-2114.

- Cao, Q., C. Qin, et al. (2011). "Genetic polymorphisms in APE1 are associated with renal cell carcinoma risk in a Chinese population." <u>Molecular carcinogenesis</u> 50(11): 863-870.
- Carr, S. M., S. Munro, et al. (2012). "Lysine methylation and the regulation of p53." Essays in biochemistry 52: 79-92.
- Carter, S., O. Bischof, et al. (2007). "C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53." <u>Nature cell biology</u> 9(4): 428-435.
- Castro-Vega, L. J., A. Buffet, et al. (2014). "Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas." <u>Human molecular genetics</u> 23(9): 2440-2446.
- Chang, A. N., A. B. Cantor, et al. (2002). "GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis." <u>Proceedings of the National</u> <u>Academy of Sciences of the United States of America</u> 99(14): 9237-9242.
- Chang, H., C. Qi, et al. (2005). "p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation." <u>Blood</u> 105(1): 358-360.
- Chang, Y., D. Bluteau, et al. (2007). "From hematopoietic stem cells to platelets." <u>Journal of</u> <u>thrombosis and haemostasis : JTH</u> 5 Suppl 1: 318-327.
- Chatterjee, A., E. Mambo, et al. (2006). "The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1) activity." <u>FASEB journal : official publication of the</u> <u>Federation of American Societies for Experimental Biology</u> 20(1): 112-114.
- Chen, D., M. J. Lucey, et al. (2003). "T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase potentiates transcription of estrogen-regulated genes through direct interaction with estrogen receptor alpha." <u>The Journal of biological chemistry</u> 278(40): 38586-38592.
- Chen, H., B. Zhou, et al. (2014). "Association between single-nucleotide polymorphisms of OGG1 gene and pancreatic cancer risk in Chinese Han population." <u>Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine</u> 35(1): 809-813.
- Chen, J., F. M. Ellison, et al. (2008). "Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice." <u>Experimental hematology</u> 36(10): 1236-1243.
- Chen, L., D. M. Gilkes, et al. (2005). "ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage." <u>The EMBO journal</u> 24(19): 3411-3422.
- Chi, J., K. A. Nicolaou, et al. (2014). "Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis." <u>Leukemia</u> 28(5): 1152-1154.
- Chng, W. J., T. Price-Troska, et al. (2007). "Clinical significance of TP53 mutation in myeloma." <u>Leukemia</u> 21(3): 582-584.
- Coll-Mulet, L., D. Iglesias-Serret, et al. (2006). "MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." <u>Blood</u> 107(10): 4109-4114.
- Cortazar, D., C. Kunz, et al. (2007). "The enigmatic thymine DNA glycosylase." <u>DNA repair</u> 6(4): 489-504.
- Cortazar, D., C. Kunz, et al. (2011). "Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability." <u>Nature</u> 470(7334): 419-423.
- Cortellino, S., J. Xu, et al. (2011). "Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair." <u>Cell</u> 146(1): 67-79.
- Cross, B., L. Chen, et al. (2011). "Inhibition of p53 DNA binding function by the MDM2 protein acidic domain." <u>The Journal of biological chemistry</u> 286(18): 16018-16029.
- da Costa, N. M., A. Hautefeuille, et al. (2012). "Transcriptional regulation of thymine DNA glycosylase (TDG) by the tumor suppressor protein p53." <u>Cell cycle</u> 11(24): 4570-4578.
- Daboussi, F., J. Thacker, et al. (2005). "Genetic interactions between RAD51 and its paralogues for centrosome fragmentation and ploidy control, independently of the sensitivity to genotoxic stresses." <u>Oncogene</u> 24(22): 3691-3696.

- Dai, C. and W. Gu (2010). "p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis." <u>Trends in molecular medicine</u> 16(11): 528-536.
- Dai, Y., S. Chen, et al. (2013). "The novel Chk1 inhibitor MK-8776 sensitizes human leukemia cells to HDAC inhibitors by targeting the intra-S checkpoint and DNA replication and repair." <u>Molecular cancer therapeutics</u> 12(6): 878-889.
- Dalton, S. R. and A. Bellacosa (2012). "DNA demethylation by TDG." Epigenomics 4(4): 459-467.
- Dameshek, W. (1951). "Some speculations on the myeloproliferative syndromes." <u>Blood</u> 6(4): 372-375.
- Dang L, White DW, et al. (2010) "Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate". <u>Nature</u>. 465(7300):966.
- Dawlaty, M. M., K. Ganz, et al. (2011). "Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development." <u>Cell stem cell</u> 9(2): 166-175.
- de Souza-Pinto, N. C., C. C. Harris, et al. (2004). "p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria." <u>Oncogene</u> 23(39): 6559-6568.
- De Vita, S., R. K. Schneider, et al. (2014). "Loss of function of TET2 cooperates with constitutively active KIT in murine and human models of mastocytosis." <u>PloS one</u> 9(5): e96209.
- Deans, B., C. S. Griffin, et al. (2003). "Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice." <u>Cancer research</u> 63(23): 8181-8187.
- DeHart, C. J., J. S. Chahal, et al. (2014). "Extensive post-translational modification of active and inactivated forms of endogenous p53." <u>Molecular & cellular proteomics : MCP</u> 13(1): 1-17.
- DeLeo, A. B., G. Jay, et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." <u>Proceedings of the National</u> <u>Academy of Sciences of the United States of America</u> 76(5): 2420-2424.
- Delhommeau, F., S. Dupont, et al. (2009). "Mutation in TET2 in myeloid cancers." <u>The New England</u> journal of medicine 360(22): 2289-2301.
- Deneberg, S., P. Guardiola, et al. (2011). "Prognostic DNA methylation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks." <u>Blood</u> 118(20): 5573-5582.
- Dianov, G., C. Bischoff, et al. (1998). "Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts." <u>The Journal of biological chemistry</u> 273(50): 33811-33816.
- Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." <u>Nature</u> 356(6366): 215-221.
- Dornan, D., H. Shimizu, et al. (2003). "The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53." <u>Molecular and cellular biology</u> 23(23): 8846-8861.
- Duan, J. and L. Nilsson (2006). "Effect of Zn2+ on DNA recognition and stability of the p53 DNAbinding domain." <u>Biochemistry</u> 45(24): 7483-7492.
- Duffy, M. J., N. C. Synnott, et al. (2014). "p53 as a target for the treatment of cancer." <u>Cancer</u> <u>treatment reviews</u> 40(10): 1153-1160.
- Dunn, A. R., N. M. Kad, et al. (2011). "Single Qdot-labeled glycosylase molecules use a wedge amino acid to probe for lesions while scanning along DNA." <u>Nucleic acids research</u> 39(17): 7487-7498.
- Dutt, S., A. Narla, et al. (2011). "Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells." <u>Blood</u> 117(9): 2567-2576.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." <u>Nucleic acids research</u> 10(8): 2709-2721.
- Estecio, M. R. and J. P. Issa (2011). "Dissecting DNA hypermethylation in cancer." <u>FEBS letters</u> 585(13): 2078-2086.

Etheridge, S. L., M. E. Cosgrove, et al. (2014). "A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis." <u>Blood</u> 123(7): 1059-1068.

Fahraeus, R. and V. Olivares-Illana (2014). "MDM2's social network." Oncogene 33(35): 4365-4376.

- Faquin, W. C., T. J. Schneider, et al. (1992). "Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production." <u>Blood</u> 79(8): 1987-1994.
- Feng, Z. and A. J. Levine (2010). "The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein." <u>Trends in cell biology</u> 20(7): 427-434.
- Figueroa, M. E., S. Lugthart, et al. (2010). "DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia." <u>Cancer cell</u> 17(1): 13-27.
- Figueroa ME, Abdel-Wahab O, et al. (2010). "Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation". <u>Cancer Cell</u>. 18(6):553-67
- Figueroa, M. E., L. Skrabanek, et al. (2009). "MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation." <u>Blood</u> 114(16): 3448-3458.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." <u>Cell</u> 57(7): 1083-1093.
- Forslund, A., Z. Zeng, et al. (2008). "MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers." Molecular cancer research : MCR 6(2): 205-211.
- Frede, S., J. Fandrey, et al. (1997). "Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats." <u>The American journal of</u> <u>physiology</u> 273(3 Pt 2): R1067-1071.
- Fu, H. L., Y. Ma, et al. (2014). "TET1 exerts its tumor suppressor function by interacting with p53-EZH2 pathway in gastric cancer." Journal of biomedical nanotechnology 10(7): 1217-1230.
- Gallais, R., F. Demay, et al. (2007). "Deoxyribonucleic acid methyl transferases 3a and 3b associate with the nuclear orphan receptor COUP-TFI during gene activation." <u>Molecular</u> <u>endocrinology</u> 21(9): 2085-2098.
- Galy, A., M. Travis, et al. (1995). "Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset." <u>Immunity</u> 3(4): 459-473.
- Gambichler, T., M. Sand, et al. (2013). "Loss of 5-hydroxymethylcytosine and ten-eleven translocation 2 protein expression in malignant melanoma." <u>Melanoma research</u> 23(3): 218-220.
- Gaudet, F., J. G. Hodgson, et al. (2003). "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation." <u>Science</u> 300(5618): 489-492.
- Ghoshal, K., J. Datta, et al. (2005). "5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal." <u>Molecular and cellular biology</u> 25(11): 4727-4741.
- Griffin, C. S. and J. Thacker (2004). "The role of homologous recombination repair in the formation of chromosome aberrations." <u>Cytogenetic and genome research</u> 104(1-4): 21-27.
- Grisouard, J., H. Hao-Shen, et al. (2014). "Selective deletion of Jak2 in adult mouse hematopoietic cells leads to lethal anemia and thrombocytopenia." <u>Haematologica</u> 99(4): e52-54.
- Gryfe, R. (2009). "Inherited colorectal cancer syndromes." <u>Clinics in colon and rectal surgery</u> 22(4): 198-208.
- Gu, J., H. Kawai, et al. (2002). "Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53." <u>The Journal of biological chemistry</u> 277(22): 19251-19254.
- Gudkov, A. V. and E. A. Komarova (2010). "Pathologies associated with the p53 response." <u>Cold</u> <u>Spring Harbor perspectives in biology</u> 2(7): a001180.
- Guo, J. U., Y. Su, et al. (2011). "Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond." <u>Cell cycle</u> 10(16): 2662-2668.

- Haferlach, T., Y. Nagata, et al. (2014). "Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes." <u>Leukemia</u> 28(2): 241-247.
- Hahn, M. A., R. Qiu, et al. (2013). "Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis." <u>Cell reports</u> 3(2): 291-300.
- Hajkova, P., S. J. Jeffries, et al. (2010). "Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway." <u>Science</u> 329(5987): 78-82.
- Hao, Q. L., E. M. Smogorzewska, et al. (1998). "In vitro identification of single CD34+CD38- cells with both lymphoid and myeloid potential." <u>Blood</u> 91(11): 4145-4151.
- Hao, Q. L., J. Zhu, et al. (2001). "Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood." <u>Blood</u> 97(12): 3683-3690.
- Hardeland, U., M. Bentele, et al. (2003). "The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, Drosophila and fission yeast orthologs." <u>Nucleic acids</u> <u>research</u> 31(9): 2261-2271.
- Hardeland, U., C. Kunz, et al. (2007). "Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2." <u>Nucleic acids research</u> 35(11): 3859-3867.
- Hardeland, U., R. Steinacher, et al. (2002). "Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover." <u>The EMBO journal</u> 21(6): 1456-1464.
- Harutyunyan, A., T. Klampfl, et al. (2011). "p53 lesions in leukemic transformation." <u>The New</u> <u>England journal of medicine</u> 364(5): 488-490.
- Hasan, S., C. Lacout, et al. (2013). "JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNalpha." <u>Blood</u> 122(8): 1464-1477.
- He, Y. F., B. Z. Li, et al. (2011). "Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA." <u>Science</u> 333(6047): 1303-1307.
- Hegde, M. L., T. K. Hazra, et al. (2008). "Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells." <u>Cell research</u> 18(1): 27-47.
- Helin, K. and D. Dhanak (2013). "Chromatin proteins and modifications as drug targets." <u>Nature</u> 502(7472): 480-488.
- Hoffman-Luca, C. G., C. Y. Yang, et al. (2015). "Significant Differences in the Development of Acquired Resistance to the MDM2 Inhibitor SAR405838 between In Vitro and In Vivo Drug Treatment." <u>PloS one</u> 10(6): e0128807.
- Horman, S. R., C. S. Velu, et al. (2009). "Gfi1 integrates progenitor versus granulocytic transcriptional programming." <u>Blood</u> 113(22): 5466-5475.
- Hu, W., Z. Feng, et al. (2012). "The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2." <u>Genes & cancer</u> 3(3-4): 199-208.
- Huang, S., Z. Zhu, et al. (2013). "Tet1 is required for Rb phosphorylation during G1/S phase transition." <u>Biochemical and biophysical research communications</u> 434(2): 241-244.
- Huang, Y., L. Chavez, et al. (2014). "Distinct roles of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet2 in mouse embryonic stem cells." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 111(4): 1361-1366.
- Iancu-Rubin, C., G. Mosoyan, et al. (2014). "Activation of p53 by the MDM2 inhibitor RG7112 impairs thrombopoiesis." <u>Experimental hematology</u> 42(2): 137-145 e135.
- Illingworth, R. S. and A. P. Bird (2009). "CpG islands--'a rough guide'." <u>FEBS letters</u> 583(11): 1713-1720.
- Iqbal, K., S. G. Jin, et al. (2011). "Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine." <u>Proceedings of the National</u> <u>Academy of Sciences of the United States of America</u> 108(9): 3642-3647.
- Ito, K., A. Hirao, et al. (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." <u>Nature medicine</u> 12(4): 446-451.

- Ito, M., L. Barys, et al. (2011). "Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis." <u>Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research</u> 17(3): 416-426.
- Ito, S., A. C. D'Alessio, et al. (2010). "Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell selfrenewal and inner cell mass specification." <u>Nature</u> 466(7310): 1129-1133.
- Ito, S., L. Shen, et al. (2011). "Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5carboxylcytosine." <u>Science</u> 333(6047): 1300-1303.
- Itzykson, R., O. Kosmider, et al. (2011). "Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias." <u>Leukemia</u> 25(7): 1147-1152.
- Ivanov, M., M. Kacevska, et al. (2012). "Epigenomics and interindividual differences in drug response." <u>Clinical pharmacology and therapeutics</u> 92(6): 727-736.
- Ivanovic, Z. (2004). "Interleukin-3 and ex vivo maintenance of hematopoietic stem cells: facts and controversies." <u>European cytokine network</u> 15(1): 6-13.
- Iwasaki, H. and K. Akashi (2007). "Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell." <u>Immunity</u> 26(6): 726-740.
- Iwasaki, H., C. Somoza, et al. (2005). "Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation." <u>Blood</u> 106(5): 1590-1600.
- Jager, R., H. Gisslinger, et al. (2010). "Deletions of the transcription factor lkaros in myeloproliferative neoplasms." <u>Leukemia</u> 24(7): 1290-1298.
- Jaiswal, S., P. Fontanillas, et al. (2014). "Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes." <u>The New England journal of medicine</u> 371(26): 2488-2498.
- James, C., V. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." <u>Nature</u> 434(7037): 1144-1148.
- Jankowska, A. M., H. Makishima, et al. (2011). "Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A." <u>Blood</u> 118(14): 3932-3941.
- Jardin, F., P. Ruminy, et al. (2011). "TET2 and TP53 mutations are frequently observed in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm." <u>British journal of haematology</u> 153(3): 413-416.
- Jeong, M., D. Sun, et al. (2014). "Large conserved domains of low DNA methylation maintained by Dnmt3a." <u>Nature genetics</u> 46(1): 17-23.
- Jin, S. G., X. Wu, et al. (2011). "Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain." <u>Nucleic acids research</u> 39(12): 5015-5024.
- Joerger, A. C., M. D. Allen, et al. (2004). "Crystal structure of a superstable mutant of human p53 core domain. Insights into the mechanism of rescuing oncogenic mutations." <u>The Journal of biological chemistry</u> 279(2): 1291-1296.
- Jones, A. V., S. Kreil, et al. (2005). "Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders." <u>Blood</u> 106(6): 2162-2168.
- Jones, S. N., A. R. Hancock, et al. (1998). "Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53independent role for Mdm2 in tumorigenesis." <u>Proceedings of the National Academy of</u> <u>Sciences of the United States of America</u> 95(26): 15608-15612.
- Jones, S. N., A. E. Roe, et al. (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." <u>Nature</u> 378(6553): 206-208.
- Jorgensen, H. F., I. Ben-Porath, et al. (2004). "Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains." <u>Molecular and cellular biology</u> 24(8): 3387-3395.
- Junt, T., H. Schulze, et al. (2007). "Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow." <u>Science</u> 317(5845): 1767-1770.

- Kaar, J. L., N. Basse, et al. (2010). "Stabilization of mutant p53 via alkylation of cysteines and effects on DNA binding." <u>Protein science : a publication of the Protein Society</u> 19(12): 2267-2278.
- Kang, H., Z. Dai, et al. (2013). "A genetic variant in the promoter of APE1 gene (-656 T>G) is associated with breast cancer risk and progression in a Chinese population." <u>Gene</u> 531(1): 97-100.
- Kano, G., A. Morimoto, et al. (2008). "Ikaros dominant negative isoform (Ik6) induces IL-3independent survival of murine pro-B lymphocytes by activating JAK-STAT and upregulating Bcl-xl levels." <u>Leukemia & lymphoma</u> 49(5): 965-973.
- Karakaya, K., F. Herbst, et al. (2012). "Overexpression of EVI1 interferes with cytokinesis and leads to accumulation of cells with supernumerary centrosomes in G0/1 phase." <u>Cell cycle</u> 11(18): 3492-3503.
- Kaushansky, K. (2005). "The molecular mechanisms that control thrombopoiesis." <u>The Journal of</u> <u>clinical investigation</u> 115(12): 3339-3347.
- Kaushansky, K. (2005). "Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell." <u>Annals of the New York</u> <u>Academy of Sciences</u> 1044: 139-141.
- Kaushansky, K. and J. G. Drachman (2002). "The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production." <u>Oncogene</u> 21(21): 3359-3367.
- Kemp, C. J., T. Wheldon, et al. (1994). "p53-deficient mice are extremely susceptible to radiationinduced tumorigenesis." <u>Nature genetics</u> 8(1): 66-69.
- Khoo, K. H., A. Andreeva, et al. (2009). "Adaptive evolution of p53 thermodynamic stability." Journal of molecular biology 393(1): 161-175.
- Kieran, M. W., A. C. Perkins, et al. (1996). "Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 93(17): 9126-9131.
- Kim, S. I. and E. H. Bresnick (2007). "Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles." <u>Oncogene</u> 26(47): 6777-6794.
- Kim, Y. J. and D. M. Wilson, 3rd (2012). "Overview of base excision repair biochemistry." <u>Current</u> <u>molecular pharmacology</u> 5(1): 3-13.
- Kirito, K., T. Watanabe, et al. (2002). "Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways." <u>The Journal of biological</u> <u>chemistry</u> 277(10): 8329-8337.
- Klampfl, T., H. Gisslinger, et al. (2013). "Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms." <u>The New England journal of medicine</u> 369(25): 2379-2390.
- Ko, M., J. An, et al. (2013). "Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX." <u>Nature</u> 497(7447): 122-126.
- Ko, M., H. S. Bandukwala, et al. (2011). "Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice." <u>Proceedings of the</u> <u>National Academy of Sciences of the United States of America</u> 108(35): 14566-14571.
- Ko, M., Y. Huang, et al. (2010). "Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2." <u>Nature</u> 468(7325): 839-843.
- Koh, K. P., A. Yabuuchi, et al. (2011). "Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells." <u>Cell stem cell</u> 8(2): 200-213.
- Koivunen, P., S. Lee, et al. (2012). "Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation." <u>Nature</u> 483(7390): 484-488.
- Kojima, K., M. Konopleva, et al. (2005). "MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy." <u>Blood</u> 106(9): 3150-3159.
- Kolbus, A., M. Blazquez-Domingo, et al. (2003). "Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: molecular analysis by expression profiling." <u>Blood</u> 102(9): 3136-3146.

Komrokji, R. S., E. Padron, et al. (2013). "Deletion 5q MDS: molecular and therapeutic implications." <u>Best practice & research. Clinical haematology</u> 26(4): 365-375.

- Kondo, M., I. L. Weissman, et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." <u>Cell</u> 91(5): 661-672.
- Konopleva, M., Y. Tabe, et al. (2009). "Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches." <u>Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy</u> 12(4-5): 103-113.
- Kosmider, O., V. Gelsi-Boyer, et al. (2009). "TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia." <u>Haematologica</u> 94(12): 1676-1681.
- Kralovics, R., F. Passamonti, et al. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." <u>The New England journal of medicine</u> 352(17): 1779-1790.
- Krawczak, M., E. V. Ball, et al. (1998). "Neighboring-nucleotide effects on the rates of germ-line single-base-pair substitution in human genes." <u>American journal of human genetics</u> 63(2): 474-488.
- Kriaucionis, S. and N. Heintz (2009). "The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain." <u>Science</u> 324(5929): 929-930.
- Krokan, H. E. and M. Bjoras (2013). "Base excision repair." <u>Cold Spring Harbor perspectives in</u> <u>biology</u> 5(4): a012583.
- Krug, U., A. Ganser, et al. (2002). "Tumor suppressor genes in normal and malignant hematopoiesis." <u>Oncogene</u> 21(21): 3475-3495.
- Krummel, K. A., C. J. Lee, et al. (2005). "The C-terminal lysines fine-tune P53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 102(29): 10188-10193.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2008). "SnapShot: p53 posttranslational modifications." <u>Cell</u> 133(5): 930-930 e931.
- Kruse, J. P. and W. Gu (2009). "Modes of p53 regulation." <u>Cell</u> 137(4): 609-622.
- Kudo, Y., K. Tateishi, et al. (2012). "Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation." <u>Cancer science</u> 103(4): 670-676.
- Kumar, S. and S. Subramanian (2002). "Mutation rates in mammalian genomes." <u>Proceedings of</u> <u>the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 99(2): 803-808.
- Kunimoto, H., Y. Fukuchi, et al. (2012). "Tet2 disruption leads to enhanced self-renewal and altered differentiation of fetal liver hematopoietic stem cells." <u>Scientific reports</u> 2: 273.
- Kussie, P. H., S. Gorina, et al. (1996). "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain." <u>Science</u> 274(5289): 948-953.
- Kustikova, O. S., A. Schwarzer, et al. (2013). "Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells." <u>Leukemia</u> 27(5): 1127-1138.
- Lacout, C., D. F. Pisani, et al. (2006). "JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis." <u>Blood</u> 108(5): 1652-1660.
- Lambert, J. M., P. Gorzov, et al. (2009). "PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain." <u>Cancer cell</u> 15(5): 376-388.
- Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." Nature 358(6381): 15-16.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." <u>Nature</u> 278(5701): 261-263.
- Langemeijer, S. M., R. P. Kuiper, et al. (2009). "Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes." <u>Nature genetics</u> 41(7): 838-842.
- Lau, W. W., R. Hannah, et al. (2015). "The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients." Blood 125(10): 1679-1681.
- Laurent, L., E. Wong, et al. (2010). "Dynamic changes in the human methylome during differentiation." <u>Genome research</u> 20(3): 320-331.
- Lee, H. Y., X. Gao, et al. (2015). "PPAR-alpha and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal." <u>Nature</u> 522(7557): 474-477.

- Leonova, K. I., J. Shneyder, et al. (2010). "A small molecule inhibitor of p53 stimulates amplification of hematopoietic stem cells but does not promote tumor development in mice." <u>Cell cycle</u> 9(7): 1434-1443.
- Leroy, B., M. Anderson, et al. (2014). "TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade." <u>Human mutation</u> 35(6): 672-688.
- Letouze, E., C. Martinelli, et al. (2013). "SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma." <u>Cancer cell</u> 23(6): 739-752.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." <u>Cell</u> 88(3): 323-331.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." <u>Cancer cell</u> 7(4): 387-397.
- Ley, T. J., L. Ding, et al. (2010). "DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia." <u>The New England</u> journal of medicine 363(25): 2424-2433.
- Li, D., N. D. Marchenko, et al. (2011). "Functional inactivation of endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 causes aberrant stabilization of mutant p53 in human cancer cells." <u>Molecular</u> <u>cancer research : MCR</u> 9(5): 577-588.
- Li, M., C. L. Brooks, et al. (2003). "Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." <u>Science</u> 302(5652): 1972-1975.
- Li, Q. and G. Lozano (2013). "Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy." <u>Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer</u> <u>Research</u> 19(1): 34-41.
- Li, W. and M. Liu (2011). "Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues." Journal of nucleic acids 2011: 870726.
- Li, Y. Q., P. Z. Zhou, et al. (2007). "Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair." <u>Nucleic acids research</u> 35(2): 390-400.
- Li, Z., X. Cai, et al. (2011). "Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies." <u>Blood</u> 118(17): 4509-4518.
- Lin, Y., E. Liu, et al. (2015). "The Prevalence of JAK2, MPL, and CALR Mutations in Chinese Patients With BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms." <u>American journal of clinical</u> <u>pathology</u> 144(1): 165-171.
- Linares, L. K., A. Hengstermann, et al. (2003). "HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United</u> <u>States of America</u> 100(21): 12009-12014.
- Linares, L. K., R. Kiernan, et al. (2007). "Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2." <u>Nature cell biology</u> 9(3): 331-338.
- Lindahl, T. (1990). "Repair of intrinsic DNA lesions." Mutation research 238(3): 305-311.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." <u>Nature</u> 362(6422): 709-715.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." <u>Cell</u> 17(1): 43-52.
- Lister, R., M. Pelizzola, et al. (2009). "Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences." <u>Nature</u> 462(7271): 315-322.
- Liu, Y., S. E. Elf, et al. (2009). "p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence." <u>Cell stem cell</u> 4(1): 37-48.
- Lobry, C., P. Ntziachristos, et al. (2013). "Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation." <u>The Journal of experimental medicine</u> 210(2): 301-319.
- Loeb, L. A. (1985). "Apurinic sites as mutagenic intermediates." <u>Cell</u> 40(3): 483-484.
- Long, J., B. Parkin, et al. (2010). "Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia." <u>Blood</u> 116(1): 71-80.

- Long, M. W., N. Williams, et al. (1982). "Immature megakaryocytes in the mouse: physical characteristics, cell cycle status, and in vitro responsiveness to thrombopoietic stimulatory factor." <u>Blood</u> 59(3): 569-575.
- Lorsbach, R. B., J. Moore, et al. (2003). "TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23)." <u>Leukemia</u> 17(3): 637-641.
- Lu, M. and R. Hoffman (2012). "p53 as a target in myeloproliferative neoplasms." <u>Oncotarget</u> 3(10): 1052-1053.
- Lu, M., X. Wang, et al. (2012). "Combination treatment in vitro with Nutlin, a small-molecule antagonist of MDM2, and pegylated interferon-alpha 2a specifically targets JAK2V617Fpositive polycythemia vera cells." <u>Blood</u> 120(15): 3098-3105.
- Lu, M., L. Xia, et al. (2014). "The orally bioavailable MDM2 antagonist RG7112 and pegylated interferon alpha 2a target JAK2V617F-positive progenitor and stem cells." <u>Blood</u> 124(5): 771-779.
- Lu, C. Ward, PS et al. (2012). "IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation ». <u>Nature</u>. 483(7390):474-8.
- Lugthart, S., M. E. Figueroa, et al. (2011). "Aberrant DNA hypermethylation signature in acute myeloid leukemia directed by EVI1." <u>Blood</u> 117(1): 234-241.
- Lundberg, P., A. Karow, et al. (2014). "Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms." <u>Blood</u> 123(14): 2220-2228.
- Ma, C. X., S. Cai, et al. (2012). "Targeting Chk1 in p53-deficient triple-negative breast cancer is therapeutically beneficial in human-in-mouse tumor models." <u>The Journal of clinical investigation</u> 122(4): 1541-1552.
- Maetens, M., G. Doumont, et al. (2007). "Distinct roles of Mdm2 and Mdm4 in red cell production." <u>Blood</u> 109(6): 2630-2633.
- Maffioli, M., A. Genoni, et al. (2014). "Looking for CALR mutations in familial myeloproliferative neoplasms." <u>Leukemia</u> 28(6): 1357-1360.
- Maiti, A. and A. C. Drohat (2011). "Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites." <u>The</u> <u>Journal of biological chemistry</u> 286(41): 35334-35338.
- Manz, M. G., T. Miyamoto, et al. (2002). "Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 99(18): 11872-11877.
- Marcucci, G., T. Haferlach, et al. (2011). "Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications." <u>Journal of clinical oncology : official journal of</u> <u>the American Society of Clinical Oncology</u> 29(5): 475-486.
- Mardis ER, Ding L, et al. (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. <u>N Engl J Med</u>. 361(11):1058-66.
- Marty, C., C. Lacout, et al. (2010). "Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice." <u>Blood</u> 116(5): 783-787.
- Marty, C., C. Saint-Martin, et al. (2014). "Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors." <u>Blood</u> 123(9): 1372-1383.
- Mason, E. F. and J. L. Hornick (2013). "Succinate dehydrogenase deficiency is associated with decreased 5-hydroxymethylcytosine production in gastrointestinal stromal tumors: implications for mechanisms of tumorigenesis." <u>Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc</u> 26(11): 1492-1497.
- McCullough, A. K., M. L. Dodson, et al. (1999). "Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures." <u>Annual review of biochemistry</u> 68: 255-285.
- McKerrell, T., N. Park, et al. (2015). "Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis." <u>Cell reports</u> 10(8): 1239-1245.

- Mead, A. J., M. J. Rugless, et al. (2012). "Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis." <u>The New England journal of medicine</u> 366(10): 967-969.
- Meek, D. W. (2015). "Regulation of the p53 response and its relationship to cancer." <u>The</u> <u>Biochemical journal</u> 469(3): 325-346.
- Meggendorfer, M., A. Roller, et al. (2012). "SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML)." <u>Blood</u> 120(15): 3080-3088.
- Mehdipour, P., F. Santoro, et al. (2015). "Epigenetic alterations in acute myeloid leukemias." <u>The</u> <u>FEBS journal</u> 282(9): 1786-1800.
- Mellen, M., P. Ayata, et al. (2012). "MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system." <u>Cell</u> 151(7): 1417-1430.
- Metzeler, K. H., K. Maharry, et al. (2011). "TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 29(10): 1373-1381.
- Michaelis, M., F. Rothweiler, et al. (2011). "Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells." <u>Cell death & disease</u> 2: e243.
- Millar, C. B., J. Guy, et al. (2002). "Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice." <u>Science</u> 297(5580): 403-405.
- Milosevic, J. D., A. Puda, et al. (2012). "Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia." <u>American journal of hematology</u> 87(11): 1010-1016.
- Missero, C., M. T. Pirro, et al. (2001). "The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription." <u>The Journal of biological chemistry</u> 276(36): 33569-33575.
- Mohammad, R. M., J. Wu, et al. (2009). "An MDM2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals." <u>Molecular cancer</u> 8: 115.
- Mol, C. D., S. S. Parikh, et al. (1999). "DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases." <u>Annual review of biophysics and biomolecular structure</u> 28: 101-128.
- Montes de Oca Luna, R., D. S. Wagner, et al. (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2deficient mice by deletion of p53." <u>Nature</u> 378(6553): 203-206.
- Moran-Crusio, K., L. Reavie, et al. (2011). "Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell selfrenewal and myeloid transformation." <u>Cancer cell</u> 20(1): 11-24.
- Morera, S., I. Grin, et al. (2012). "Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyuracil-containing DNA." <u>Nucleic acids research</u> 40(19): 9917-9926.
- Mostoslavsky, R., K. F. Chua, et al. (2006). "Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6." <u>Cell</u> 124(2): 315-329.
- Moulard, O., J. Mehta, et al. (2014). "Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union." <u>European journal of haematology</u> 92(4): 289-297.
- Mufti, G. J. (2004). "Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome." <u>Best</u> <u>practice & research. Clinical haematology</u> 17(4): 543-557.
- Muto, T., G. Sashida, et al. (2013). "Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders." <u>The Journal of experimental medicine</u> 210(12): 2627-2639.
- Nag, S., X. Zhang, et al. (2014). "Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet?" <u>Current medicinal chemistry</u> 21(5): 553-574.
- Nahi, H., G. Selivanova, et al. (2008). "Mutated and non-mutated TP53 as targets in the treatment of leukaemia." <u>British journal of haematology</u> 141(4): 445-453.

- Nakahata, T. and N. Okumura (1994). "Cell surface antigen expression in human erythroid progenitors: erythroid and megakaryocytic markers." <u>Leukemia & lymphoma</u> 13(5-6): 401-409.
- Nakatake, M., B. Monte-Mor, et al. (2012). "JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms." <u>Oncogene</u> 31(10): 1323-1333.
- Nangalia, J., C. E. Massie, et al. (2013). "Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2." <u>The New England journal of medicine</u> 369(25): 2391-2405.
- Neubauer, H., A. Cumano, et al. (1998). "Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis." <u>Cell</u> 93(3): 397-409.
- Nisse, C., C. Lorthois, et al. (1995). "Exposure to occupational and environmental factors in myelodysplastic syndromes. Preliminary results of a case-control study." <u>Leukemia</u> 9(4): 693-699.
- Odell, T. T., Jr., C. W. Jackson, et al. (1970). "Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy." <u>Blood</u> 35(6): 775-782.
- Offer, H., R. Wolkowicz, et al. (1999). "Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery." <u>FEBS letters</u> 450(3): 197-204.
- Ofir-Rosenfeld, Y., K. Boggs, et al. (2008). "Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26." <u>Molecular cell</u> 32(2): 180-189.
- Olivier, M., R. Eeles, et al. (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users." <u>Human mutation</u> 19(6): 607-614.
- Ono, R., T. Taki, et al. (2002). "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)." <u>Cancer</u> research 62(14): 4075-4080.
- Orkin, S. H. (2000). "Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages." <u>Nature</u> <u>reviews. Genetics</u> 1(1): 57-64.
- Orta, M. L., A. Hoglund, et al. (2014). "The PARP inhibitor Olaparib disrupts base excision repair of 5-aza-2'-deoxycytidine lesions." <u>Nucleic acids research</u> 42(14): 9108-9120.
- Ortmann, C. A., D. G. Kent, et al. (2015). "Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms." <u>The New England journal of medicine</u> 372(7): 601-612.
- Oscier, D., R. Wade, et al. (2010). "Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation." <u>Haematologica</u> 95(10): 1705-1712.
- Pant, V., A. Quintas-Cardama, et al. (2012). "The p53 pathway in hematopoiesis: lessons from mouse models, implications for humans." <u>Blood</u> 120(26): 5118-5127.
- Papaemmanuil, E., M. Gerstung, et al. (2013). "Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes." <u>Blood</u> 122(22): 3616-3627; quiz 3699.
- Parant, J., A. Chavez-Reyes, et al. (2001). "Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53." <u>Nature genetics</u> 29(1): 92-95.
- Pardanani, A. D., R. L. Levine, et al. (2006). "MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients." <u>Blood</u> 108(10): 3472-3476.
- Park, S. O., H. L. Wamsley, et al. (2013). "Conditional deletion of Jak2 reveals an essential role in hematopoiesis throughout mouse ontogeny: implications for Jak2 inhibition in humans." <u>PloS one</u> 8(3): e59675.
- Pastor, W. A., U. J. Pape, et al. (2011). "Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells." <u>Nature</u> 473(7347): 394-397.
- Patel, J. P., M. Gonen, et al. (2012). "Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia." <u>The New England journal of medicine</u> 366(12): 1079-1089.
- Patel, S. R., J. H. Hartwig, et al. (2005). "The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets." <u>The Journal of clinical investigation</u> 115(12): 3348-3354.

- Patnaik, A., A. Tolcher, et al. (2015). "Clinical pharmacology characterization of RG7112, an MDM2 antagonist, in patients with advanced solid tumors." <u>Cancer chemotherapy and</u> <u>pharmacology</u> 76(3): 587-595.
- Pekova, S., O. Mazal, et al. (2011). "A comprehensive study of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of 1287 diagnostic and 1148 follow-up CLL samples." <u>Leukemia research</u> 35(7): 889-898.
- Penn, N. W., R. Suwalski, et al. (1972). "The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid." <u>The Biochemical journal</u> 126(4): 781-790.
- Pereg, Y., D. Shkedy, et al. (2005). "Phosphorylation of Hdmx mediates its Hdm2- and ATMdependent degradation in response to DNA damage." <u>Proceedings of the National</u> <u>Academy of Sciences of the United States of America</u> 102(14): 5056-5061.
- Perez, C., N. Martinez-Calle, et al. (2012). "TET2 mutations are associated with specific 5methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia." <u>PloS one</u> 7(2): e31605.
- Peterson, L. F., E. Mitrikeska, et al. (2011). "p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells." <u>Leukemia</u> 25(5): 761-769.
- Pfaffeneder, T., F. Spada, et al. (2014). "Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA." <u>Nature chemical biology</u> 10(7): 574-581.
- Pick, M., A. Eldor, et al. (2002). "Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitors from cryopreserved umbilical cord blood. A potential source of megakaryocytes for transplantation." <u>Experimental hematology</u> 30(9): 1079-1087.
- Plass, C., S. M. Pfister, et al. (2013). "Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer." <u>Nature reviews. Genetics</u> 14(11): 765-780.
- Post, S. M., V. Pant, et al. (2010). "Prognostic impact of the MDM2SNP309 allele in leukemia and lymphoma." <u>Oncotarget</u> 1(3): 168-174.
- Preudhomme, C. and P. Fenaux (1997). "The clinical significance of mutations of the P53 tumour suppressor gene in haematological malignancies." <u>British journal of haematology</u> 98(3): 502-511.
- Pronier, E., C. Almire, et al. (2011). "Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors." <u>Blood</u> 118(9): 2551-2555.
- Quivoron, C., L. Couronne, et al. (2011). "TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis." <u>Cancer</u> <u>cell</u> 20(1): 25-38.
- Rampal, R., J. Ahn, et al. (2014). "Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the</u> <u>United States of America</u> 111(50): E5401-5410.
- Rampal, R., F. Al-Shahrour, et al. (2014). "Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis." <u>Blood</u> 123(22): e123-133.
- Ramsahoye, B. H., D. Biniszkiewicz, et al. (2000). "Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 97(10): 5237-5242.
- Rankin, S. M. (2010). "The bone marrow: a site of neutrophil clearance." <u>Journal of leukocyte</u> <u>biology</u> 88(2): 241-251.
- Ray-Coquard, I., J. Y. Blay, et al. (2012). "Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study." <u>The Lancet. Oncology</u> 13(11): 1133-1140.

- Raza, A. and N. Galili (2012). "The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes." <u>Nature reviews. Cancer</u> 12(12): 849-859.
- Reece, D., K. W. Song, et al. (2009). "Influence of cytogenetics in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: adverse effect of deletion 17p13." <u>Blood</u> 114(3): 522-525.
- Ribeil, J. A., Y. Zermati, et al. (2007). "Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3mediated cleavage of GATA-1." <u>Nature</u> 445(7123): 102-105.
- Riccio, A., L. A. Aaltonen, et al. (1999). "The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability." <u>Nature genetics</u> 23(3): 266-268.
- Ringshausen, I., C. C. O'Shea, et al. (2006). "Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo." <u>Cancer cell</u> 10(6): 501-514.
- Robb, L. (2007). "Cytokine receptors and hematopoietic differentiation." <u>Oncogene</u> 26(47): 6715-6723.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, et al. (2000). "Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation." <u>Molecular and cellular biology</u> 20(22): 8458-8467.
- Roth, J. A. (2006). "Adenovirus p53 gene therapy." Expert opinion on biological therapy 6(1): 55-61.
- Rumi, E., A. S. Harutyunyan, et al. (2014). "CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis." <u>Blood</u> 123(15): 2416-2419.
- Sablina, A. A., A. V. Budanov, et al. (2005). "The antioxidant function of the p53 tumor suppressor." <u>Nature medicine</u> 11(12): 1306-1313.
- Saha, M. N., H. Jiang, et al. (2013). "PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa." <u>Molecular cancer therapeutics</u> 12(11): 2331-2341.
- Saha, T., R. K. Kar, et al. (2015). "Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence." <u>Progress in biophysics and molecular biology</u> 117(2-3): 250-263.
- Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, et al. (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." <u>Annual review of biochemistry</u> 73: 39-85.
- Sasaki M, Knobbe CB, et al. (2012) "IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics". Nature. 488(7413):656-9
- Schoppy, D. W. and E. J. Brown (2012). "Chk'ing p53-deficient breast cancers." <u>The Journal of</u> <u>clinical investigation</u> 122(4): 1202-1205.
- Scott, L. M., P. A. Beer, et al. (2007). "Prevalance of JAK2 V617F and exon 12 mutations in polycythaemia vera." <u>British journal of haematology</u> 139(3): 511-512.
- Semerad, C. L., F. Liu, et al. (2002). "G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood." <u>Immunity</u> 17(4): 413-423.
- Seo, Y. R., M. L. Fishel, et al. (2002). "Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence." <u>Oncogene</u> 21(5): 731-737.
- Shangary, S. and S. Wang (2008). "Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy." <u>Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer</u> <u>Research</u> 14(17): 5318-5324.
- Shen, L., H. Kantarjian, et al. (2010). "DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 28(4): 605-613.
- Shen, L., H. Wu, et al. (2013). "Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5methylcytosine oxidation dynamics." <u>Cell</u> 153(3): 692-706.
- Shibagaki, I., H. Tanaka, et al. (1995). "p53 mutation, murine double minute 2 amplification, and human papillomavirus infection are frequently involved but not associated with each other

in esophageal squamous cell carcinoma." <u>Clinical cancer research : an official journal of the</u> <u>American Association for Cancer Research</u> 1(7): 769-773.

- Shide, K., T. Kameda, et al. (2012). "TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis." Leukemia 26(10): 2216-2223.
- Shih, A. H., O. Abdel-Wahab, et al. (2012). "The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies." <u>Nature reviews. Cancer</u> 12(9): 599-612.
- Shivdasani, R. A. (1996). "The role of transcription factor NF-E2 in megakaryocyte maturation and platelet production." <u>Stem cells</u> 14 Suppl 1: 112-115.
- Shivdasani, R. A. (2001). "Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation." <u>Stem cells</u> 19(5): 397-407.
- Shlush, L. I., S. Zandi, et al. (2014). "Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia." <u>Nature</u> 506(7488): 328-333.
- Shvarts, A., W. T. Steegenga, et al. (1996). "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2." <u>The EMBO journal</u> 15(19): 5349-5357.
- Siatecka, M. and J. J. Bieker (2011). "The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis." <u>Blood</u> 118(8): 2044-2054.
- Sieff, C. A., J. Yang, et al. (2010). "Pathogenesis of the erythroid failure in Diamond Blackfan anaemia." <u>British journal of haematology</u> 148(4): 611-622.
- Sitnicka, E., N. Lin, et al. (1996). "The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells." <u>Blood</u> 87(12): 4998-5005.
- Skoda, R. C., A. Duek, et al. (2015). "Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms." <u>Experimental</u> <u>hematology</u> 43(8): 599-608.
- Smet-Nocca, C., J. M. Wieruszeski, et al. (2008). "The thymine-DNA glycosylase regulatory domain: residual structure and DNA binding." <u>Biochemistry</u> 47(25): 6519-6530.
- Smith, A. E., A. M. Mohamedali, et al. (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." <u>Blood</u> 116(19): 3923-3932.
- Song, C. X., K. E. Szulwach, et al. (2011). "Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine." <u>Nature biotechnology</u> 29(1): 68-72.
- Sonoda, E., M. S. Sasaki, et al. (1998). "Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death." <u>The EMBO journal</u> 17(2): 598-608.
- Sosin, A. M., A. M. Burger, et al. (2012). "HDM2 antagonist MI-219 (spiro-oxindole), but not Nutlin-3 (cis-imidazoline), regulates p53 through enhanced HDM2 autoubiquitination and degradation in human malignant B-cell lymphomas." <u>Journal of hematology & oncology</u> 5: 57.
- Soussi, T. (2011). "Advances in carcinogenesis: a historical perspective from observational studies to tumor genome sequencing and TP53 mutation spectrum analysis." <u>Biochimica et</u> <u>biophysica acta</u> 1816(2): 199-208.
- Soussi, T. and K. G. Wiman (2015). "TP53: an oncogene in disguise." <u>Cell death and differentiation</u> 22(8): 1239-1249.
- Starcevic, D., S. Dalal, et al. (2004). "Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?" <u>Cell cycle</u> 3(8): 998-1001.
- Stegelmann, F., L. Bullinger, et al. (2011). "DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms." <u>Leukemia</u> 25(7): 1217-1219.
- Su, Y., A. Xu, et al. (2014). "The effect of oxoguanine glycosylase 1 rs1052133 polymorphism on colorectal cancer risk in Caucasian population." <u>Tumour biology : the journal of the</u> International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 35(1): 513-517.
- Svilar, D., E. M. Goellner, et al. (2011). "Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage." <u>Antioxidants & redox signaling</u> 14(12): 2491-2507.
- Szulwach, K. E., X. Li, et al. (2011). "5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging." <u>Nature neuroscience</u> 14(12): 1607-1616.

- Tablin, F., M. Castro, et al. (1990). "Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation." <u>Journal of cell science</u> 97 (Pt 1): 59-70.
- Tahiliani, M., K. P. Koh, et al. (2009). "Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1." <u>Science</u> 324(5929): 930-935.
- Tefferi, A. (2011). "Mutations galore in myeloproliferative neoplasms: would the real Spartacus please stand up?" <u>Leukemia</u> 25(7): 1059-1063.
- Tefferi, A. (2013). "Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management." <u>American journal of hematology</u> 88(6): 507-516.
- Tefferi, A., K. H. Lim, et al. (2009). "Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML." <u>Leukemia</u> 23(7): 1343-1345.
- Tefferi A, Jimma T et al. (2012). "IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F". Leukemia. 475-80.
- TeKippe, M., D. E. Harrison, et al. (2003). "Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice." <u>Experimental hematology</u> 31(6): 521-527.
- Terstappen, L. W., S. Huang, et al. (1991). "Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells." <u>Blood</u> 77(6): 1218-1227.
- Terzian, T., Y. Wang, et al. (2007). "Haploinsufficiency of Mdm2 and Mdm4 in tumorigenesis and development." <u>Molecular and cellular biology</u> 27(15): 5479-5485.
- Thepot, S., E. Lainey, et al. (2011). "Hypomethylating agents reactivate FOXO3A in acute myeloid leukemia." <u>Cell cycle</u> 10(14): 2323-2330.
- Thol, F., F. Damm, et al. (2011). "Incidence and prognostic influence of DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of <u>Clinical Oncology</u> 29(21): 2889-2896.
- Tiedt, R., H. Hao-Shen, et al. (2008). "Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice." <u>Blood</u> 111(8): 3931-3940.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." <u>Radiation research</u> 14: 213-222.
- Tini, M., A. Benecke, et al. (2002). "Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription." <u>Molecular cell</u> 9(2): 265-277.
- Tomso, D. J. and D. A. Bell (2003). "Sequence context at human single nucleotide polymorphisms: overrepresentation of CpG dinucleotide at polymorphic sites and suppression of variation in CpG islands." Journal of molecular biology 327(2): 303-308.
- Tovar, C., B. Graves, et al. (2013). "MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models." <u>Cancer research</u> 73(8): 2587-2597.
- Tovar, C., J. Rosinski, et al. (2006). "Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</u> 103(6): 1888-1893.
- Traina, F., V. Visconte, et al. (2012). "Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis." <u>PloS one</u> 7(8): e43090.
- Trinh, B. N., T. I. Long, et al. (2002). "DNA methyltransferase deficiency modifies cancer susceptibility in mice lacking DNA mismatch repair." <u>Molecular and cellular biology</u> 22(9): 2906-2917.
- Truscott, M., R. Harada, et al. (2008). "p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes." <u>Molecular and cellular biology</u> 28(10): 3127-3138.

- Um, S., M. Harbers, et al. (1998). "Retinoic acid receptors interact physically and functionally with the T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase." <u>The Journal of biological chemistry</u> 273(33): 20728-20736.
- Valinluck, V. and L. C. Sowers (2007). "Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1." <u>Cancer research</u> 67(3): 946-950.
- Vannucchi, A. M., A. Grossi, et al. (1994). "Inhibition of erythropoietin production in vitro by human interferon gamma." <u>British journal of haematology</u> 87(1): 18-23.
- Vardiman, J. W., J. Thiele, et al. (2009). "The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes." <u>Blood</u> 114(5): 937-951.
- Vartanian, V., B. Lowell, et al. (2006). "The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase." <u>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United</u> <u>States of America</u> 103(6): 1864-1869.
- Vassilev, L. T., B. T. Vu, et al. (2004). "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2." <u>Science</u> 303(5659): 844-848.
- Vaughn, J. E., B. L. Scott, et al. (2013). "Transplantation for myelodysplastic syndromes 2013." <u>Current opinion in hematology</u> 20(6): 494-500.
- Veerakumarasivam, A., H. E. Scott, et al. (2008). "High-resolution array-based comparative genomic hybridization of bladder cancers identifies mouse double minute 4 (MDM4) as an amplification target exclusive of MDM2 and TP53." <u>Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research</u> 14(9): 2527-2534.
- Viguie, F., A. Aboura, et al. (2005). "Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement?" <u>Leukemia</u> 19(8): 1411-1415.
- Vousden, K. H. and K. M. Ryan (2009). "p53 and metabolism." <u>Nature reviews. Cancer</u> 9(10): 691-700.
- Wade, M., Y. C. Li, et al. (2013). "MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy." <u>Nature reviews. Cancer</u> 13(2): 83-96.
- Walter, M. J., L. Ding, et al. (2011). "Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes." <u>Leukemia</u> 25(7): 1153-1158.
- Wang, S., W. Sun, et al. (2014). "SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression." <u>Cancer research</u> 74(20): 5855-5865.
- Wang, T., Q. Pan, et al. (2012). "Genome-wide DNA hydroxymethylation changes are associated with neurodevelopmental genes in the developing human cerebellum." <u>Human molecular genetics</u> 21(26): 5500-5510.
- Wang, X. and R. Simon (2013). "Identification of potential synthetic lethal genes to p53 using a computational biology approach." <u>BMC medical genomics</u> 6: 30.
- Ward PS, Patel J, et al. (2010). "The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate". <u>Cancer Cell</u>. 17(3):225-34.
- Waters, T. R. and P. F. Swann (2000). "Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites." <u>Mutation research</u> 462(2-3): 137-147.
- Wernig, G., T. Mercher, et al. (2006). "Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model." <u>Blood</u> 107(11): 4274-4281.
- Wilson, S. H. and T. A. Kunkel (2000). "Passing the baton in base excision repair." <u>Nature structural</u> <u>biology</u> 7(3): 176-178.
- Wlodarski, P., M. Wasik, et al. (1998). "Role of p53 in hematopoietic recovery after cytotoxic treatment." <u>Blood</u> 91(8): 2998-3006.
- Wong, E., K. Yang, et al. (2002). "Mbd4 inactivation increases Cright-arrowT transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation." <u>Proceedings of the National Academy of</u> <u>Sciences of the United States of America</u> 99(23): 14937-14942.
- Wossidlo, M., T. Nakamura, et al. (2011). "5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming." <u>Nature communications</u> 2: 241.
- Wu, H., A. C. D'Alessio, et al. (2011). "Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells." <u>Genes & development</u> 25(7): 679-684.
- Wu, H. and Y. Zhang (2014). "Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions." <u>Cell</u> 156(1-2): 45-68.
- Wu, X., J. H. Bayle, et al. (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." <u>Genes &</u> <u>development</u> 7(7A): 1126-1132.
- Xia, M., D. Knezevic, et al. (2008). "Elevated MDM2 boosts the apoptotic activity of p53-MDM2 binding inhibitors by facilitating MDMX degradation." <u>Cell cycle</u> 7(11): 1604-1612.
- Xiao, M., H. Yang, et al. (2012). "Inhibition of alpha-KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors." <u>Genes & development</u> 26(12): 1326-1338.
- Xie, M., C. Lu, et al. (2014). "Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies." <u>Nature medicine</u> 20(12): 1472-1478.
- Xiong, S., V. Pant, et al. (2010). "Spontaneous tumorigenesis in mice overexpressing the p53negative regulator Mdm4." <u>Cancer research</u> 70(18): 7148-7154.
- Xu, Y., C. Xu, et al. (2012). "Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for Xenopus eye and neural development." <u>Cell</u> 151(6): 1200-1213.
- Xu-Monette, Z. Y., L. J. Medeiros, et al. (2012). "Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies." <u>Blood</u> 119(16): 3668-3683.
- Yamada, O., E. Mahfoudhi, et al. (2014). "Emergence of a BCR-ABL translocation in a patient with the JAK2V617F mutation: evidence for secondary acquisition of BCR-ABL in the JAK2V617F clone." Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 32(21): e76-79.
- Yamazaki, J., R. Taby, et al. (2012). "Effects of TET2 mutations on DNA methylation in chronic myelomonocytic leukemia." <u>Epigenetics</u> 7(2): 201-207.
- Yan, X. J., J. Xu, et al. (2011). "Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia." <u>Nature genetics</u> 43(4): 309-315.
- Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, et al. (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas". <u>N Engl</u> <u>J Med</u>. 360(8):765-73.
- Yildirim, O., R. Li, et al. (2011). "Mbd3/NURD complex regulates expression of 5hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells." <u>Cell</u> 147(7): 1498-1510.
- Yu, Q., Y. Li, et al. (2014). "Amplification of Mdmx and overexpression of MDM2 contribute to mammary carcinogenesis by substituting for p53 mutations." <u>Diagnostic pathology</u> 9: 71.
- Zandi, R., G. Selivanova, et al. (2011). "PRIMA-1Met/APR-246 induces apoptosis and tumor growth delay in small cell lung cancer expressing mutant p53." <u>Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research</u> 17(9): 2830-2841.
- Zermati, Y., C. Garrido, et al. (2001). "Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation." <u>The Journal of experimental medicine</u> 193(2): 247-254.
- Zeuner, A., A. Eramo, et al. (2003). "Control of erythroid cell production via caspase-mediated cleavage of transcription factor SCL/Tal-1." <u>Cell death and differentiation</u> 10(8): 905-913.

- Zhang, P., B. Huang, et al. (2013). "Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a." Biochemical and biophysical research communications 437(3): 368-373.
- Zhang, P., J. Iwasaki-Arai, et al. (2004). "Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha." <u>Immunity</u> 21(6): 853-863.
- Zhao, Y., S. Yu, et al. (2013). "A potent small-molecule inhibitor of the MDM2-p53 interaction (MI-888) achieved complete and durable tumor regression in mice." <u>Journal of medicinal</u> <u>chemistry</u> 56(13): 5553-5561.
- Zhao, Z. and C. Jiang (2007). "Methylation-dependent transition rates are dependent on local sequence lengths and genomic regions." <u>Molecular biology and evolution</u> 24(1): 23-25.
- Zhou, J., J. Ahn, et al. (2001). "A role for p53 in base excision repair." <u>The EMBO journal</u> 20(4): 914-923.
- Zhu, J. K. (2009). "Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases." <u>Annual review of genetics</u> 43: 143-166.



Titre : Rôle de deux suppresseurs de tumeurs TET2 et P53 dans un contexte hématopoïétique

Mots clés : TET2, 5-hmC, instabilité génomique, mutagenèse, P53, MDM2.

TET2 et P53, deux suppresseurs de tumeurs, jouent un rôle important dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques et sont trouvés mutés dans les hémopathies malignes. Ils sont aussi impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, notamment la voie de réparation par excision de base (BER). Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que la surexpression de TET2 et l'augmentation consécutive des 5hmC, ralentit la progression du cycle cellulaire et la transition G1/S et induit une instabilité chromosomique associée à une instabilité centrosomique dans un modèle cellulaire Ba/F3. De plus, la surexpression de TET2 induit l'augmentation de la mutagenèse particulièrement des transitions C->T dans les sites CpG dans un contexte déficient en thymidine DNA glycosylase (TDG), une protéine initiatrice du BER. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons montré que l'activation de P53, par des antagonistes de MDM2, a un effet délétère sur tous les progéniteurs hématopoïétiques. Ces antagonistes induisent une cytotoxicité non seulement dans les stades précoces de la mégacaryopoïèse, mais aussi dans les stades tardifs. Cette cytotoxicité n'est pas réversible, contrairement à ce qui est observé en clinique, et ne peut pas être restaurée par des doses croissantes de thrombopoïétine. Au total, TET2 et P53 doivent être strictement régulés pour assurer l'homéostasie et la stabilité génétique des cellules hématopoïétiques.

Title: Role of two tumor suppressors, TET2 and P53, in hematopoietic context.

Key words: TET2, 5-hmC, genomic instability, mutagenesis, P53, MDM2

Two tumor suppressors, TET2 and P53, play an important role in the homeostasis of hematopoietic stem cells and have been found mutated in hematological malignancies. They are also involved in cell cycle control and DNA repair mechanisms, including the base excision repair pathway (BER). In the first part of this work, we showed that TET2 overexpression and the consequent increase of 5-hmC, inhibit cell cycle progression particularly G1/S transition and induce chromosomal instability associated with centrosome instability in Ba/F3 cellular model. In addition, overexpression of TET2 induces increased mutagenesis particularly transitions C->T at CpG sites in a context deficient in thymidine DNA glycosylase (TDG), a protein initiating BER. In the second part of this work, we have shown that P53 activation by MDM2 antagonists has deleterious effect on all haematopoietic progenitors. These antagonists also induce cytotoxicity is not reversible, in contrast to what is observed in clinic, and cannot be restored by increasing thrombopoietin doses. To conclude, TET2 and P53 must be strictly controlled to ensure homeostasis and genetic stability of the hematopoietic cells.