

Figure 2. Rôles cellulaires de ARF1 et ARF6. Les GTPases ARF1 et ARF6 régissent la migration et la prolifération cellulaires stimulées par le récepteur de l'EGF. ARF1 permet l'activation de la voie PI3K/Akt, tandis qu'ARF6 assure l'activation de la voie mitogénique des MAPK, avec pour intermédiaires Ras, Raf, MEKK et Erk.

(Madin-Darby canine kidney) de façon ARNO dépendante et affecte la localisation d'ARF1 dans l'appareil de Golgi [11]. Ces derniers résultats suggèrent donc qu'il existe un potentiel thérapeutique intéressant en vue de la création de composés inhibiteurs des ARF pour le traitement du cancer du sein. ♦

ARF proteins: molecular switches controlling tumour proliferation and metastasis

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

1. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 ; 7 : 347-58.
2. Cotton M, Boulay PL, Houndolo T, et al. Endogenous ARF6 interacts with Rac1 upon angiotensin II stimulation to regulate membrane ruffling and cell migration. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 501-11.
3. Malaney S, Daly RJ. The ras signaling pathway in mammary tumorigenesis and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001 ; 6 : 101-13.
4. Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility. *Cancer Lett* 2003 ; 189 : 117-28.
5. Boulay PL, Cotton M, Melancon P, Claing A. ADP-ribosylation factor 1 controls the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway to regulate epidermal growth factor-dependent growth and migration of breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 36425-34.
6. Cohen LA, Honda A, Varnai P, et al. Active Arf recruits ARNO/cytohesin GEFs to the PM by binding their PH domains. *Mol Biol Cell* 2007 ; 18 : 2244-53.
7. Tague SE, Muralidharan V, D'Souza-Schorey C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 9671-6.
8. Casanova JE. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic* 2007 ; 8 : 1476-85.
9. Inoue H, Randazzo PA. Arf GAPs and their interacting proteins. *Traffic* 2007 ; 8 : 1465-75.
10. Morishige M, Hashimoto S, Ogawa E, et al. GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nat Cell Biol* 2008 ; 10 : 85-92.
11. Viaud J, Zeghouf M, Barelli H, et al. Structure-based discovery of an inhibitor of Arf activation by Sec7 domains through targeting of protein-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 10370-5.

NOUVELLE

Mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes humaines

Olivier A. Bernard, François Delhommeau, Michaela Fontenay, William Vainchenker

► Les hémopathies malignes de type myéloïde sont caractérisées par des modifications des propriétés de survie, de prolifération ou de différenciation des cellules des lignées myéloïdes. Elles sont dues à l'accumulation d'anomalies génétiques généralement acquises qui touchent les cellules souches hématopoïétiques ou des progéniteurs plus ou moins engagés dans une voie de différenciation [1].

Elles sont classées en trois catégories : les leucémies aiguës (LAM), les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les syndromes myéloprolifératifs (SMP) (voir encadré). SMD et SMP peuvent évoluer vers une leucémie aiguë [2].

La caractérisation des anomalies de structure chromosomique observées dans les leucémies aiguës humaines a permis l'identification de nombreux gènes

O.A. Bernard : E0210 Inserm, Tour Pasteur, Hôpital Necker, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.
 Université René Descartes, Faculté de médecine, Paris, France.
 APHP, laboratoire d'hématologie, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France.
olivier.bernard@inserm.fr
 W. Vainchenker : Inserm, UMR790, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.
 Université Paris XI, F-94805 Villejuif, France.
verpre@igr.fr
 M. Fontenay : Université René Descartes, Faculté de médecine, Paris, France.
 APHP, laboratoire d'hématologie, Hôpital Cochin, F-75014 Paris, France.
 Inserm U567, CNRS UMR8104, département d'hématologie, Institut Cochin, Paris, France.
 F. Delhommeau : Inserm, UMR790, Institut Gustave Roussy, APHP, laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France.
 Université Paris VI Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des affections clonales des cellules souches (CS) hématopoïétiques survenant surtout chez les sujets âgés, caractérisées par une hématopoïèse inefficace, responsable de cytopénies sanguines. La moelle osseuse est généralement riche, mais avec des anomalies quantitatives et morphologiques des cellules médullaires. Il s'agit d'un groupe d'affections hétérogène par l'expression clinique et l'évolution. La transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM/SMD) est fréquente. Ce sont les plus fréquents des états pré-leucémiques de l'adulte. Les délétions des chromosomes 5, 7, 17 et 20 sont fréquentes.

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMP) « sont des hémopathies malignes ayant pour caractéristiques communes une hyperplasie myéloïde globale et une hypersensibilité aux cytokines des progéniteurs hématopoïétiques. Ce sont des maladies acquises, clonales, de la cellule souche hématopoïétique. La classification des SMP distingue : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la poly-

globulie primitive ou maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive, le syndrome hyperéosinophilique, et des SMP atypiques ». [Valérie Ugo, Chloé James, William Vainchenker. *Med Sci* 2005 ; 21 : 669-70]

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) sont des proliférations malignes de CS/progéniteurs hématopoïétiques associées à un blocage de maturation à un stade immature. Il en résulte une accumulation de ces cellules immatures, ou blastes, dans la moelle osseuse, le sang, et éventuellement dans d'autres organes, associée à une insuffisance médullaire, liée au déficit de production des cellules sanguines matures, se traduisant par des cytopénies avec leurs conséquences cliniques. L'âge médian des LAM se situe autour de 60 ans. Les SMD ou les LAM peuvent être primaires, ou secondaires résultant de l'effet mutagène des cytotoxiques (chimiothérapie et/ou radiothérapie) utilisés pour le traitement d'un premier cancer (15 % du total des LAM).

qui jouent un rôle majeur dans la différenciation hématopoïétique et qui, modifiés, participent aux processus de transformation [3]. En revanche, bien que la moitié des patients souffrant de SMD présente des anomalies de structure chromosomique, les anomalies génétiques à l'origine ou survenant de façon précoce sont peu connues [4]. La découverte de mutations ponctuelles conférant une activité constitutive à la protéine à activité tyrosine kinase JAK2 a constitué une avancée majeure dans la compréhension du développement des SMP « classiques ». En effet, la mutation JAK2^{V617F} est présente dans pratiquement tous les cas de polyglobulie de Vaquez (PV) et dans la majorité des thrombocytémies essentielles et des myélofibroses primitives [5]. Bien que l'expression de JAK2^{V617F} dans des cellules primaires de souris soit suffisante pour induire une maladie ressemblant à une PV, un faisceau d'arguments suggérait qu'un événement précédant la survenue de JAK2^{V617F} dans l'histoire

naturelle de la maladie existait chez certains patients [6].

Le travail publié récemment par nos équipes a permis d'identifier un gène, *Ten-Eleven-Translocation (TET)2*, muté dans environ 15 % des hémopathies de type myéloïde chez l'homme [7].

Identification des mutations du gène *TET2* dans les hémopathies myéloïdes

Deux approches ont été suivies dans cette étude. L'analyse par cytogénétique moléculaire d'une série de six patients porteurs d'une translocation chromosomique touchant le bras long du chromosome 4 (4q24) a permis d'identifier chez tous les patients une région perdue, qui ne contenait que le gène *TET2*. Chez quatre de ces patients, la perte d'une copie de *TET2* a pu être associée à une anomalie de la région codante de *TET2* sur la copie restante du gène.

L'analyse par hybridation génomique comparative (CGH) et *single nucleotide polymorphism (SNP) array* a été

réalisée chez cinq patients souffrant de SMP, et présentant au diagnostic une dominance du clone JAK2^{V617F} dans les cellules représentatives des phases précoces de la différenciation hématopoïétique plus marquée que chez la majorité des patients atteints de SMP. Cette étude a mis en évidence une perte d'hétérozygotie du bras long du chromosome 4 chez trois patients. Un de ces trois patients présentait une délétion dans la région 4q24 centrée sur le gène *TET2*. Une anomalie de la séquence codante de *TET2* existait chez deux de ces patients. Le caractère acquis des anomalies de séquence ou de structure de *TET2* a pu être montré dans la majorité des cas analysés.

L'analyse de la séquence codante de *TET2* dans une série d'échantillons d'hémopathies myéloïdes a montré des variations par rapport aux séquences de référence dans 15/81 (19 %) des SMD, 5/21 (25 %) des LAM secondaires et 24/198 (12 %) des SMP étudiés. Les anomalies de *TET2* n'apparaissent pas associées de façon préférentielle avec un sous-groupe de SMD ou de SMP. Les mutations observées étaient majoritairement des mutations tronquantes, par perte ou addition de nucléotides dans la séquence codante du gène ou par mutation non-sens, ou bien des mutations faux-sens touchant des acides aminés conservés dans l'évolution. Dans environ la moitié des échantillons, deux mutations étaient observées, ce qui indique une inactivation complète du gène, mais suggère *a contrario* que *TET2* pourrait avoir un effet à l'état hétérozygote (haplo-insuffisance). Ces données indiquent que *TET2* pourrait être un gène de type suppresseur de tumeur muté dans une proportion élevée d'hémopathies humaines de type myéloïde.

Les mutations de *TET2* peuvent précéder les mutations de *JAK2* dans l'évolution des SMP

La présence des mutations de *TET2* dans les progéniteurs hématopoïétiques immatures a ensuite été recherchée.

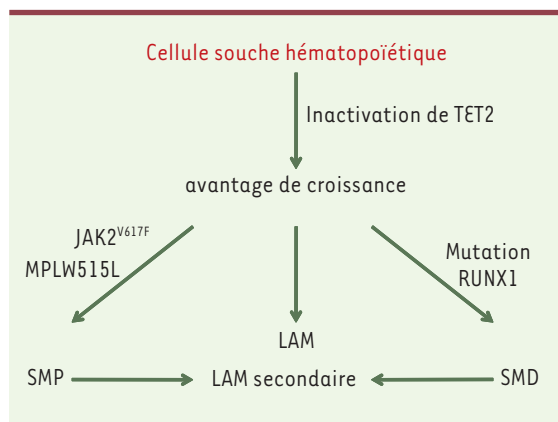


Figure 1. Les mutations de *TET2* prédisposeraient au développement des hémopathies myéloïdes chez l'homme. Le schéma est hypothétique. Les flèches indiquent des événements oncogéniques qui restent largement à identifier.

Dans les SMD, les mutations de *TET2* sont identifiées dans des cellules primaires triées sur l'expression du marqueur de surface CD34, associé ou non au marqueur CD38, les cellules CD34⁺CD38⁻ étant considérées comme plus immatures que les cellules CD34⁺CD38⁺. Les mutations de *TET2* sont détectées dans les cellules progénitrices individuellement amplifiées *in vitro*. Des observations similaires sont faites avec des échantillons de SMP. L'analyse à l'échelon cellulaire a également permis de montrer dans cinq cas de SMP que les mutations *TET2* sont apparues avant la mutation *JAK2*^{V617F} au cours de l'histoire naturelle de la maladie. En effet des cellules mutées pour *TET2* et sauvages pour *JAK2* sont observées chez ces patients tandis qu'aucune cellule sauvage pour *TET2* et mutée pour *JAK2* n'a pu être identifiée.

Pour confirmer que les mutations de *TET2* sont présentes dans des cellules ayant des propriétés de cellule souche, des cellules CD34⁺ isolées chez cinq patients atteints de SMP ont été greffées chez des souris immunodéficientes (NOD-SCID, *non-obese diabetic severe combined immunodeficient*) : deux échantillons de cellules CD34⁺ portaient des mutations de *TET2*, trois avaient un gène *TET2* normal. Seules les cellules issues des patients porteurs de la mutation de *TET2* étaient capables de proliférer et de se développer chez la souris pendant 15 semaines, entraînant une augmentation progressive du chimérisme (homme/souris). De plus,

alors que l'hématopoïèse humaine qui se développe chez les souris greffées avec les échantillons dont le gène *TET2* n'est pas muté ou avec des cellules humaines normales est orientée préférentiellement vers une différenciation lymphoïde, l'hématopoïèse humaine observée avec les échantillons porteurs d'un gène *TET2* muté est majoritairement de type myéloïde. Si toutes les cellules progénitrices humaines qui sont présentes chez la souris après 15 semaines sont porteuses des mutations *TET2*, elles ne sont que rarement porteuses de la mutation *JAK2*^{V617F}. L'ensemble de ces données indique que les mutations de *TET2* sont présentes dans des cellules ayant des propriétés de type cellule souche, et leur confèrent un avantage de croissance par rapport aux cellules normales.

Perspectives physiopathologiques pour les hémopathies myéloïdes

Une fréquence élevée de mutations de *TET2* a maintenant été rapportée dans diverses pathologies malignes myéloïdes humaines [8-14]. La caractérisation d'un événement oncogénique commun à plusieurs hémopathies myéloïdes pourrait permettre une réévaluation de leur classification. Elle indique, du point de vue physiopathologique, une anomalie commune affectant un stade précoce de l'hématopoïèse, la diversité phénotypique étant ensuite générée par la survenue de différents événements oncogéniques, *JAK2*^{V617F} pour les SMP ou des mutations de *RUNX1* pour les SMD ou les LAM (Figure 1).

Trois gènes qui codent pour des protéines apparentées à *TET2* ont été identifiés chez l'homme. Le membre fondateur

TET1 a été isolé lors de la caractérisation d'une protéine de fusion formée avec le produit du gène *MLL* (*myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia*) à la suite de la translocation t(10;11)(q22;q23) observée dans des leucémies aiguës [15, 16]. Les protéines de la famille TET sont apparentées aux oxygénases dépendantes des ions ferreux et du 2-oxoglutarate. *TET1* est expérimentalement capable d'hydroxyler les 5-méthylcytosines [17]. Cette activité n'était pas connue auparavant chez l'homme et la fonction des 5-hydroxyméthylcytosines reste à déterminer. Néanmoins, ces données suggèrent un rôle dans le contrôle épigénétique de la transcription pour les membres de la famille TET. Ces résultats ouvrent un champ entier de recherche qui concerne les mécanismes de réparation, le contrôle de la transcription, de la différenciation hématopoïétique normale et pathologique et éventuellement la réponse au traitement de ces hémopathies myéloïdes. ♦

Mutations in *TET2* in myeloid cancers

REMERCIEMENTS

Le travail présenté ici a été réalisé principalement grâce au soutien de l'INSERM, les universités Paris V et Paris XI, l'INCa, la Ligue nationale contre le cancer et la Fondation de France.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

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

RÉFÉRENCES

- Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 2004 ; 6 : 587-96.
- Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009 ; 8 : 8.

RÉFÉRENCES

3. Frohling S, Dohner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 722-34.
4. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008 ; 111 : 4841-51.
5. Vainchenker W, Dusa A, Constantinescu SN. JAKs in pathology: role of Janus kinases in hematopoietic malignancies and immunodeficiencies. *Semin Cell Dev Biol* 2008 ; 19 : 385-93.
6. Kralovics R. Genetic complexity of myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008 ; 22 : 1841-8.
7. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 2289-301.
8. Tefferi A, Levine RL, Lim KH, et al. Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR α correlates. *Leukemia* 2009 ; 23 : 900-4.
9. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. *Leukemia* 2009 ; 23 : 1343-5.
10. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009 ; 23 : 905-11.
11. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009 ; 114 : 144-7.
12. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009 ; 13 : 13.
13. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009 ; 113 : 6403-10.
14. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 838-42.
15. Lorsch RB, Moore J, Mathew S, et al. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 2003 ; 17 : 637-41.
16. 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.
17. 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.

Glomax[®] Multi + Détection : le nouveau système de Promega Lumineuse simplicité



Rendons la performance toujours + accessible

- + **Multiplexage** : analyse en mode fluorescence et/ou luminescence et/ou absorbance
- + **Précision** : un agitateur (recage orbital ou linéaire), un dispositif de chauffage contrôlé de la T[°]CL, injecteurs en option
- + **Flexibilité** : productivité accrue grâce à des lecteurs de plaques de 6 à 384 puits



Promega
Leader en luminescence

Service client
0 800 487 530