



HAL
open science

Implication de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 dans l'organisation de la chromatine

Claire Vargas

► **To cite this version:**

Claire Vargas. Implication de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 dans l'organisation de la chromatine. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30234 . tel-04551608

HAL Id: tel-04551608

<https://theses.hal.science/tel-04551608v1>

Submitted on 18 Apr 2024

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Claire VARGAS

Le 26 octobre 2023

**Implication de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 dans l'organisation de
la chromatine**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Jérôme TORRISANI

Jury

Mme Sophie POLO, Rapporteur
M. Jérôme DEJARDIN, Rapporteur
Mme Audrey VINCENT, Rapporteur
Mme Gaëlle LEGUBE, Examinatrice
M. David UMLAUF, Examineur
M. Jérôme TORRISANI, Directeur de thèse

À mes parents.

*« Au milieu de l'hiver, j'apprenais enfin
qu'il y avait en moi un été invincible. »*

- Albert Camus

Remerciements

Ce projet de thèse a pu voir le jour grâce à l'ensemble des financements obtenus. Je tiens donc à remercier l'Université Paul Sabatier Toulouse III et La Ligue Nationale Contre le Cancer qui ont financé mes quatre années de thèse.

Je souhaite ensuite remercier les Drs. *Sophie Polo, Audrey Vincent et Jérôme Déjardin*, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je vous remercie d'avoir accordé du temps à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit. Je remercie également Dr. *Gaëlle Legube* d'avoir accepté de faire partie de ce jury et Dr. *David Umlauf* qui a accepté d'être à la fois dans ce jury et dans mon comité de suivi de thèse.

Un grand merci à mes directeurs de thèse, les Drs. *Jérôme Torrisani et Marlène Dufresne* pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce projet. Merci de votre soutien infaillible depuis mon premier jour de stage de Master 1. Merci pour toutes ces heures que vous avez passé à me corriger, relire, et préparer aux différentes présentations. Je suis très reconnaissante de tout ce que j'ai appris à vos côtés.

Jérôme, quelle chance de vous avoir eu comme directeur de thèse ! Malgré une pandémie, une guerre en Europe et un bâtiment qui s'effondre, vous avez fait de cette thèse une expérience sereine et enrichissante grâce à votre pédagogie, votre patience, et votre bonne humeur à toute épreuve. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, de m'avoir canalisée et recentrée quand je partais dans tous les sens, tout en me laissant tester des nouvelles choses et suivre mes idées. Je me souviendrai longtemps des congrès que l'on a fait ensemble où l'on se régalaient avec des soupes Phô et autres délices asiatiques, ainsi que votre génialissime déguisement en Mitch lors de la retraite du CRCT. Enfin, j'espère que vos yeux de lynx ne détecteront pas d'images non alignées le jour de la soutenance !!! Vous allez beaucoup me manquer.

Marlène, je souhaite vous remercier car sans vous TRIP12 et cette thèse n'auraient jamais vu le jour ! Merci pour nos nombreuses discussions scientifiques et personnelles qui m'ont aidée à grandir, et à gagner en assurance. Votre enthousiasme communicatif ainsi que votre incroyable regard critique sur les résultats ont été un vrai moteur pour cette thèse. J'ai énormément appris à vos côtés, merci. Je vous souhaite de profiter le plus possible de votre retraite bien méritée !

Je tiens également à remercier le Dr. *Pierre Cordelier* de m'avoir accueillie dans son équipe dès le Master 1. Merci Pierre de m'avoir challengée et ainsi permis de progresser. Tes conseils ont été d'une grande aide tout au long de cette thèse. Je garderai aussi en mémoire nos nombreuses conversations qualitatives sur le cinéma et la musique, ainsi que les petites friandises que tu ne ramenaes à chaque retour de congrès/vacances, qui disons-le, n'étaient pas toujours gustativement au rendez-vous (par exemple celles du Danemark)!

J'aimerais ensuite remercier l'ensemble de l'équipe 10 en commençant par les anciens TRIP12, *Manon* et *Dorian*. Merci d'avoir pris le temps de me former, et de m'avoir inculquée les valeurs de la team TRIP12 avec les fameuses trois règles d'or, que je continue de me répéter et que j'ai à mon tour transmises. Merci à vous deux de m'avoir intégrée dans l'équipe et de m'y avoir fait me sentir bien. Je suis heureuse d'avoir passé tous ces bons moments avec vous et que vous fassiez parti de ma vie aujourd'hui.

Manon, ma première encadrante de stage TRIP12 ! J'ai trouvé en toi une sœur du labo, à qui j'ai pu me confier toujours dans la bienveillance et sans jugement. Ton soutien a été un pilier dans ma thèse, et m'a permis de prendre confiance en moi. Merci pour tous les bons moments passés

ensemble, pour tous les fous rires partagés, pour ta délicieuse tarte tatin, et pour tes conseils sur des sujets aussi variés que les voitures, la cuisine en passant par la couture !

Dodo, ou la personne m'a fait le plus rigoler au labo... mais qui m'a aussi beaucoup appris toujours dans la joie et la bonne humeur. Comme pour Manon, j'ai trouvé en toi mon grand frère du labo. Nos « Vendredi folie » où l'on était censé faire notre cahier de labo (lol) avec ton imitation du gorille et tes lancers de crayon légendaires me font encore marrer aujourd'hui. Merci pour ces moments de décompression partagés autour de bonnes pressions ;).

Je tiens également à remercier mon petit stagiaire devenu grand, *Alban*. Quelle chance d'avoir pu t'encadrer et te former, tu as été le stagiaire dont beaucoup de personne rêve, à l'écoute, efficace et force de proposition (big up aux Albidi !) ! Je suis très fière de toi et heureuse que tu reprennes le flambeau TRIP12. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse.

Marie, mon bichon ♡. Comme tu le sais, je ne suis pas très forte pour l'écriture des remerciements, alors juste merci, merci pour ton soutien, ton écoute, ta bonne humeur et j'en passe. Merci de m'avoir remontée le moral, reboostée plus d'une fois, et fait pleurer de rire avec tes imitations (notamment celle de Dalida, ma pref). Heureusement que tu as été là car sans toi cette thèse aurait été vraiment plus difficile et morose. Bon courage pour la suite de ta thèse, surtout pense à toi et fais toi confiance, tu vas tout déchirer. Tu vas beaucoup me manquer j'espère que tu viendras me voir en Allemagne !

Nico, mon partenaire de blagues limite-limite ! Je te remercie pour tous les précieux conseils que tu as pu me donner pour les demandes post-doc, et tes questions ultra pertinentes sur le projet, qui nous ont beaucoup aidé. Le diner et la soirée du CFP de Lyon, qui grâce à toi ont été bien arrosés, resteront un de mes meilleurs souvenirs de thèse.

Naima, merci pour tout le soutien que tu m'as apportée durant mes stages et ma thèse. Ta bienveillance, ton altruisme et ton intégrité font de toi une personne en or sur qui on peut toujours compter. Ton thé à la menthe, et les petits plats délicieux que tu m'apportais gentiment quand j'avais un coup de mou ont réchauffé mon cœur plus d'une fois !

Hubert, merci d'avoir veillé sur moi lorsque tu étais encore au labo. Je n'oublierai jamais ta bienveillance et tous les précieux conseils que tu m'as donnés.

Charlotte, ma chirurgienne préférée ! Je me souviendrai longtemps de ton passage au labo avec tes tranches épaisses, notamment celle qui s'était fait la malle par terre et aussi de notre fameuse soirée pré-confinement ! Merci pour le soutien que tu m'as apportée, pour les nombreux conseils lectures et pour toutes les pauses café du vendredi matin. Tu fais partie des femmes fortes que j'admire et à qui j'aimerai ressembler.

Agathe, juste merci pour ce moment (hahaha) ! Plus sérieusement merci pour ton soutien et ta sincérité à toute épreuve. Nos sessions chants et plaisirs coupables musicaux (coucou Demis Roussos) dans le L1 vont beaucoup me manquer. Je te souhaite un bon courage pour cette dernière année et n'oublie pas que tu es une Dancing Queen !

Adèle, merci pour ton soutien et pour tous ces petits moments de décompression notamment en culture, qui me faisaient un bien fou ! Je suis honorée d'avoir pu être parmi les beta testeurs de tes gâteaux ! Je te souhaite de t'épanouir et plein de bonnes choses pour ta nouvelle vie à venir.

Charlène, merci pour ton soutien et ta mignonnerie quotidienne. Je te remercie également pour nos sessions running où l'on se soutenait mutuellement quand on était au bout du rouleau (et que Marie et Adèle nous mettaient 1km dans la vue ahaha), ces moments de décompression ont été précieux pour moi. Sois heureuse, tu le mérites ;) !

Anaïs, tu es la prochaine de l'équipe à soutenir, je te souhaite plein de courage pour cette ultime épreuve. Aie confiance en toi, et n'oublie pas que tu es une femme forte et courageuse ! Je te souhaite tout le meilleur pour la suite.

Nikos, η ηλιοφάνεια της ομάδας μας it was a pleasure to share the office with you. I will miss our conversations about Greece, food and Timothée Chalamet! I wish you good luck for the end of your PhD, and Τα λέμε σύντομα στην Ελλάδα !

Guigui, merci de m'avoir fait déguster pleins de bières aux goûts saugrenus ! Et surtout, merci de m'avoir fait découvrir Alain Damasio et notamment « La Horde du Contrevent ». Ces livres m'ont accompagné tout le long de ma thèse et profondément touché.

Un énorme merci à tous les autres membres de l'équipe, *Damien, Margaux, Jean, Sophie, Laura* pour tout votre soutien au cours de ces années. Je vous souhaite tout le meilleur.

Je voudrais également remercier les anciens membres de l'équipe qui m'ont accompagnée au début de ma thèse *Lulu, Lolo, Audrey et Delphine*. Merci pour ces nombreuses rigolades, raclettes et goûters que l'on a partagés. Vos départs successifs ont laissé un grand vide au labo mais je suis contente qu'on soit toujours en contact aujourd'hui !

Je tiens également à remercier l'ensemble du pôle technologique du CRCT pour leur soutien technique. Et plus particulièrement *Laetitia et Nathalie*, pour leur soutien technique ET moral !!! *Laetitia*, nos séances microscopie/thérapie ont été d'une grande aide pour moi et vont beaucoup me manquer. Merci de venir ce soir et happy birthday !

Kathy, mille mercis pour tout le soutien que tu m'as apportée au cours de ces années. J'ai trouvé en toi une confidente avec qui j'ai pu vider mon sac en toute liberté quand j'en avais ras le bol ! Merci de m'avoir faite beaucoup rire avec ton caractère bien trempé et surtout merci pour ton efficacité incroyable dans la gestion des commandes ! Ah et aussi, merci pour les tonnes de bonbons, chocolats et friandises en tout genre que tu m'as fournis tout au long de cette thèse ;).

David, je reviens à toi plus longuement ici. Je te remercie de m'avoir accompagnée depuis ce fameux stage de L3 qui a littéralement changé ma vie ! Tu as ma reconnaissance éternelle car tu m'as fait ouvrir les yeux sur de nombreuses choses. Tu m'as surtout permis de faire la paix avec moi-même, et ce n'était pas une mince affaire, merci. J'espère que notre synchronicité perdurera longtemps. Merci pour tout, vraiment.

Tout au long de mes études j'ai eu la chance de rencontrer des personnes formidables.

Tout d'abord, la team CODE PIN, *Eve, Thibault, Xavier et Fanny*. De nos nombreuses soirées, parfois même illégales (coucou le confinement), à nos vacances en passant aussi par des moments de stress, vous avez toujours été là et je vous remercie pour tout votre soutien. Je suis heureuse d'avoir pu partager tous ces moments avec des personnes aussi géniales que vous. Je vous aime et j'ai hâte de faire la fête avec vous !

Carine, merci, ces quelques mots ne seront jamais à la hauteur de notre amitié. J'aimerais pouvoir te remercier avec d'aussi jolis mots que les tiens, mais je crains ne pas en être capable, alors je me contenterai de cette citation qui à mon sens résume notre amitié : « *Et je n'ai pas besoin de toi. Et tu n'as pas besoin de moi non plus. Je ne suis pour toi qu'un renard semblable à cent mille renards. Mais, si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre. Tu seras pour moi unique au monde. Je serai pour toi unique au monde.* »

Je remercie également mes copains du lycée, *Nanou (+ le bébé en route !)*, *Elisa, Margaux, Pauline, Vince, Zahir, Antho, Thomas, Raph, et Emilien*. Que de chemin parcouru ensemble, j'ai même partagé avec certains d'entre vous les bancs de la maternelle, c'est dire ! Je suis très contente qu'on soit tous encore en contact et de partager cet évènement avec vous.

Cette thèse m'a également permis de rencontrer mon amoureux, *Mathieu*. Merci de m'avoir accompagnée pour gravir cette montagne qu'est la thèse. Je suis si fière que l'on ait réussi cette ascension tous les deux, toujours dans la bienveillance et l'amour. Merci de croire en moi au quotidien. Être avec toi m'apporte une stabilité et une sérénité qui m'était jusqu'alors assez méconnues, tout me paraît plus facile à tes côtés. J'ai hâte de continuer l'aventure avec toi à Heidelberg mais avant cela j'ai surtout hâte d'aller gravir de nouveaux sommets à La Réunion !
Je t'aime !

Ma belle-famille, *Cathy, Thierry, Justine et Noé*, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre famille à bras ouverts. Merci pour votre soutien et pour tous les bons moments passés ensemble qui m'ont permis de me vider la tête et de profiter du moment présent.

Je souhaite remercier ma toute ma famille présente aujourd'hui, notamment ma Cousinette et mon Tonton (tu ne seras plus le seul docteur de la famille aujourd'hui !) qui ont traversé la France et/ou la Manche pour venir me soutenir aujourd'hui et aussi ceux qui sont loin, mais comme on dit « Loin des yeux, près du cœur ».

Enfin, je voudrais remercier plus particulièrement mes parents, sans qui, bien évidemment, je ne serai pas là aujourd'hui ! Ces quelques mots ne pourront jamais assez arriver à la cheville de votre soutien. Je souhaite vous remercier d'avoir attisé le feu de curiosité qui brûlait en moi dès mon plus jeune âge. Merci d'avoir été et d'être toujours là pour moi dans les bons moments comme dans les plus sombres. Merci de m'avoir soutenue dans tous mes choix, sans jamais de pression et toujours dans la bienveillance.

Mon *Papou*, ma force de la nature, merci de m'avoir encouragé à base de bons petits plats, notamment ton couscous et ta tarte poire-choco. Le petit tigre porte-bonheur en peluche que tu m'as offert la veille de la rentrée en CP me suit encore aujourd'hui dans toutes les épreuves stressantes.

Ma *Mummy*, mon roc, je ne sais pas par où commencer tellement j'ai de choses pour lesquelles j'aimerais te remercier. Je suis tellement fière de tout ce que tu m'as appris et des valeurs que tu m'as transmises. Je voudrais te remercier de m'avoir portée à bout de bras quand je n'allais pas bien, mais aussi te remercier pour tous nos moments de folie, où l'on pleurait de rire pour tout et n'importe quoi. Nos lubies et obsessions culturelles pour des films, des séries (« Rust, buy you a beer ? »), des musiques ou des livres ont apaisé mon stress à de nombreuses reprises et m'ont aidé à être là où je suis aujourd'hui.

Maman, Papa, cette thèse, elle est pour vous et votre amour inconditionnel. Je vous aime.

Table des matières

Remerciements	5
Résumé	15
Abstract	17
Liste des abréviations	19
Liste des figures	21
Liste des tableaux	21
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	23
Partie 1 : L'organisation de la chromatine	25
I. De l'ADN aux territoires chromosomiques	25
a. L'unité de base de l'organisation de la chromatine : les nucléosomes.....	25
b. Les modifications épigénétiques et variants d'histones	26
i. Les modifications épigénétiques	26
ii. Les variants d'histones	27
c. L'euchromatine	27
d. L'hétérochromatine	28
i. Les caractéristiques principales	28
ii. L'hétérochromatine constitutive (HCc)	29
iii. L'hétérochromatine facultative (HCF)	31
e. L'organisation 3D du génome.....	32
i. Les boucles de chromatine	32
ii. Les domaines topologiquement associés (TAD)	32
iii. Les compartiments A et B.....	33
iv. Les territoires chromosomiques.....	33
II. L'importance de la dynamique de l'organisation du génome sur les processus nucléaires	34
a. La réplication	34
b. La transcription	35
c. La réparation des cassures double brin de l'ADN	35
III. Les altérations de l'homéostasie de la chromatine dans une pathologie : l'exemple de l'adénocarcinome pancréatique	38
a. Le cancer du pancréas	39
i. L'épidémiologie et les facteurs de risque	39
ii. Les symptômes, le diagnostic et les traitements	39
iii. Les caractéristiques moléculaires du PDAC	40
iv. Le développement du CP	41
b. Les perturbations de l'organisation de la chromatine dans le CP	42

i.	Via la méthylation de l'ADN.....	42
ii.	Via les modifications post-traductionnelles des histones	43
iii.	Via le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF	43
iv.	Via la modulation de l'organisation 3D du génome	44
Partie 2 :	Les protéines à régions intrinsèquement désordonnées	47
I.	Les protéines à IDR	47
a.	Les caractéristiques des protéines à région intrinsèquement désordonnée	47
b.	Les classes fonctionnelles des protéines à IDR	49
i.	Les chaînes entropiques.....	50
ii.	Les sites de modifications post-traductionnelles.....	50
iii.	Les chaperonnes.....	50
iv.	Les effectrices	50
v.	Les assembleuses.....	50
vi.	Les « scavengers » ou piègeurs moléculaires.....	51
c.	Une propriété biophysique remarquable des protéines à IDR : la séparation de phase 51	
II.	Les fonctions biologiques nucléaires des protéines à IDR via la séparation de phase ...	52
a.	Les fonctions physiologiques des protéines à IDR via la séparation de phase	52
i.	La formation des corps nucléaires.....	52
ii.	L'organisation du génome.....	53
iii.	La régulation de la transcription	54
iv.	La régulation des mécanismes de réparation de l'ADN	56
b.	Les protéines à IDR et pathologies	57
i.	Les altérations des protéines à IDR dans les maladies neurodégénératives.....	57
ii.	Les altérations des protéines à IDR dans les cancers	58
Partie 3 :	L'E3 ubiquitine ligase TRIP12.....	61
I.	Des généralités sur l'E3 ubiquitine ligase TRIP12	61
a.	La découverte.....	61
b.	Le gène Trip12.....	61
c.	La structure et l'expression de l'ARNm de Trip12	62
d.	La structure et l'expression protéique de TRIP12.....	63
i.	Le domaine HECT	64
ii.	Le domaine WWE	64
iii.	Le domaine Armadillo	64
iv.	La région intrinsèquement désordonnée.....	65
v.	La localisation subcellulaire, l'expression protéique et les modifications post- traductionnelles de TRIP12	65
vi.	La conservation de TRIP12 entre les espèces.....	66

II.	Les fonctions de TRIP12 liées à son activité catalytique	67
a.	L'ubiquitination des protéines.....	67
i.	Le système ubiquitine-protéasome.....	68
ii.	Les familles de E3 ubiquitine ligases	69
	♦RING.....	69
	♦HECT et RBR.....	69
iii.	Les différents types d'ubiquitination	69
b.	L'implication de TRIP12 dans le remodelage et l'organisation de la chromatine.....	70
i.	Via le complexe SWI/SNF	70
ii.	Via le complexe Polycomb.....	71
iii.	Via le facteur de transcription YY1.....	72
c.	L'implication de TRIP12 dans la progression du cycle cellulaire l'intégrité génome	72
d.	L'implication de TRIP12 dans les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN ..	74
i.	Via la voie ARF/53.....	74
ii.	Via l'ubiquitination des histones	75
iii.	Via la déubiquitinase USP7	75
iv.	Via PARP1	76
v.	Via le phospho-protéome de Ku70	76
e.	L'implication de TRIP12 dans la différenciation cellulaire	77
III.	L'implications de TRIP12 en physiopathologie.....	78
a.	Dans les cancers.....	78
i.	L'altérations du gène et de l'ARNm	78
i.	Les altérations de la protéine TRIP12.....	79
b.	Dans l'autisme, les déficiences intellectuelles et neurodégénératives	81
i.	Les altérations du gène et de l'ARNm de Trip12	81
ii.	Les altérations de la protéines TRIP12	82
	Chapitre 2 : Résultats expérimentaux	83
	Partie 1 : Les objectifs des travaux de thèse	85
I.	Les rôles de TRIP12 dans l'organisation de la chromatine	85
II.	Les rôles de TRIP12 dans l'initiation et la progression de l'adénocarcinome	
	pancréatique.....	85
III.	La rédaction d'une revue de la littérature sur l'E3 ubiquitine ligase TRIP12	86
	Partie 2 : Les publications et les résultats complémentaires	87
I.	Article n°1: The intrinsically disordered region of the E3 ubiquitin ligase TRIP12	
	induces the formation of chromatin condensates and interferes with DNA damage response.	
	89	
II.	Les résultats complémentaires sur la réparation des dommages à l'ADN.....	138

a.	Le contexte	138
b.	Matériels et méthodes.....	138
i.	Traitement des cellules.....	138
ii.	Quantification d'immunofluorescence.	138
iii.	Analyses statistiques.....	139
c.	Les résultats.....	140
i.	L'expression de TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures endogènes de l'ADN sans modifier son expression protéique.	140
ii.	TRIP12 ne s'accumule pas au niveau des cassures de l'ADN.	140
iii.	La surexpression de TRIP12 modifie les signaux de transduction de la DDR en aval de MDC1.....	141
iv.	Conclusion	141
d.	Figures	142
III.	Article n°2: The E3 ubiquitin ligase TRIP12 is required for pancreatic acinar cell plasticity and pancreatic carcinogenesis.....	146
IV.	Revue n°1: E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions.....	187
	Chapitre 3 : Discussion et conclusion générale	221
	Discussion	223
I.	L'analyse du proxisome de TRIP12	223
II.	L'implication de TRIP12 dans la compaction de la chromatine	223
III.	L'implication de TRIP12 dans la transcription des gènes	226
IV.	L'implication de TRIP12 dans l'organisation 3D du génome	226
V.	L'implication de TRIP12 dans la détection des dommages de l'ADN	227
VI.	L'implication de TRIP12 dans la métaplasie acino-canaulaire	229
	Conclusion générale.....	230
	Annexes.....	231
I.	Annexe 1 : The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability	233
II.	Annexe 2 : ADN : tout n'est pas dans la séquence, bienvenue dans la 3ième dimension ! (Revue de vulgarisation à destination du corps médical)	251
	Références bibliographiques.....	261

Résumé

TRIP12 est une E3 ubiquitine ligase nucléaire de type HECT qui est surexprimée dans de nombreux cancers. TRIP12 est impliquée dans plusieurs fonctions nucléaires via son domaine catalytique HECT. En effet, elle joue un rôle dans la carcinogénèse pancréatique en contrôlant la stabilité de PTF1a, un facteur de transcription essentiel pour l'homéostasie pancréatique. TRIP12 régule les complexes de remodelage de la chromatine SWI/SNF et PRC1 en induisant respectivement la dégradation de BAF57 et ASXL1. De plus, TRIP12 est impliquée dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN en ciblant RNF168 et (par)PARP1. Récemment, nous avons identifié dans l'extrémité N-terminale de TRIP12, une région intrinsèquement désordonnée (IDR) qui lui permet d'interagir avec la chromatine. Les conséquences d'une surexpression de TRIP12 observée dans les cancers sur l'homéostasie de la chromatine et l'implication de son IDR dans ce processus sont méconnues.

Ainsi, les objectifs de ma thèse étaient de caractériser le rôle de TRIP12 dans l'organisation de la chromatine et déterminer les conséquences de l'interaction TRIP12/chromatine sur des processus nucléaires tels que la réponse aux dommages à l'ADN.

Pour cela, j'ai établi le proxisome de TRIP12. J'ai identifié 327 protéines statistiquement enrichies à proximité de TRIP12 dont des substrats déjà connus tels que ASXL1 et BAF57. Via des analyses de réseaux protéiques, j'ai constaté que les partenaires de TRIP12 sont majoritairement impliqués dans l'organisation de la chromatine et les modifications des histones suggérant un rôle de TRIP12 dans ces fonctions. Par des approches de microscopie à haute résolution, j'ai démontré que la surexpression de TRIP12 modifie l'organisation de la chromatine en formant de condensats d'hétérochromatine grâce à son domaine IDR et indépendamment de son activité catalytique. Ces condensats sont dynamiques, réversibles et sont contrôlés par une séparation de phase de type polymère-polymère. En parallèle, j'ai étudié les conséquences fonctionnelles de ces condensats de chromatine sur, entre autre, l'accessibilité du génome et les mécanismes de réparation de l'ADN. J'ai mis en évidence une importante diminution de l'accessibilité globale du génome suite à la surexpression de l'IDR de TRIP12. Par ailleurs, il est connu que le niveau de compaction affecte l'efficacité de mécanismes de réparation de l'ADN. J'ai observé une diminution drastique de la formation des foyers MDC1 après irradiation dans des cellules surexprimant TRIP12 et ce indépendamment de son activité catalytique. Cette inhibition affecte les effecteurs en aval de MDC1 tels que les protéines 53BP1 et BRCA1 en empêchant également la formation de foyers.

L'ensemble de mes résultats révèle ainsi un nouveau rôle dynamique de TRIP12 dans l'homéostasie de la chromatine en induisant la formation de condensats. Le domaine IDR de TRIP12 est responsable de la formation de ces condensats. Ces derniers altèrent des processus biologiques majeurs tel que la réparation des dommages à l'ADN. La surexpression de TRIP12 pourrait drastiquement modifier l'organisation et l'expression du génome de cellules cancéreuses ainsi qu'augmenter leur sensibilité aux chimiothérapies.

Abstract

TRIP12 is a nuclear HECT-type E3 ubiquitin ligase that is overexpressed in numerous cancers. TRIP12 is involved in several nuclear functions via its catalytic domain HECT. Indeed, TRIP12 is implicated in pancreatic carcinogenesis by controlling the stability of PTF1a, an essential transcription factor for pancreatic homeostasis. TRIP12 regulates the chromatin remodeling complexes SWI/SNF and PRC1 by inducing the degradation of BAF57 and ASXL1, respectively. It is also involved in DNA damage repair by targeting RNF168 and parPARP1. Recently, we identified in the N-terminal extremity of TRIP12 an intrinsically disordered region (IDR) that is responsible for TRIP12 interaction with the chromatin. However, the consequences of TRIP12 overexpression observed in cancers on chromatin homeostasis and the involvement of its IDR in this process remain largely unknown.

Thus, my PhD objectives were to characterize TRIP12 role on chromatin organization and to determine the consequences of TRIP12/chromatin interaction on nuclear processes such as DNA damage repair.

To this aim, I established TRIP12 proxisome in which I identified 327 statistically enriched proteins, among them, already known substrates such ASXL1 or BAF57. Functional network analysis revealed that TRIP12 partners are massively involved in chromatin organization and histone modifications which are in favor of a TRIP12 role on these functions. Using high-resolution microscopy, I demonstrated that TRIP12 overexpression modifies chromatin organization by inducing heterochromatin condensates through its IDR and independently of its catalytic activity. These condensates are dynamic, reversible and governed by polymer-polymer phase separation. In parallel, I measured the functional consequences of TRIP12 induced-chromatin condensates on biological processes such as genome accessibility and DNA damage response. I highlighted an important decrease in genome accessibility after TRIP12 overexpression. Besides, it is well known that chromatin compaction is an important parameter in DNA damage repair efficacy. Interestingly, I observed a drastic inhibition of MDC1 foci formation in TRIP12-transfected cells and this independently of its catalytic activity. This inhibition affects downstream effectors of MDC1 such as 53BP1 and BRCA1 by inhibiting their foci formation.

Altogether, my results reveal a new dynamic role of TRIP12 on chromatin homeostasis by inducing chromatin condensates. TRIP12 IDR is responsible of this chromatin condensates formation. Such condensates alter major biological processes such as DNA damage repair. Therefore, TRIP12 overexpression could dramatically modify the genome organization/expression of cancer cells and sensitize them to DNA damage-inducing chemotherapies.

Liste des abréviations

0-100

53BP1 : p53 Binding Protein 1

A

aa : Acides aminés

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARF : Alternative Reading Frame

ARM : Armadillo

ARP2/3 : Actin Related Protein 2/3

ARNm : Acide ribonucléique messenger

APP-BP1 : Amyloid Precursor Protein-Binding Protein1

ASF1 : Alternative Splicing Factor 1

ASXL1 : Additional Sex Combs Like 1

ATM : Ataxia-Telangiectasia-Mutated

ATR : Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related

B

BAF : Brg Associated Factors

BAP : BRCA1 Associated Protein 1

BRCA1 : Breast Cancer 1

BRCT : BRCA1 C-Terminus

BRD4 : Bromodomain-containing protein 4

BRG1 : Brahma-Related Gene 1

BRM : Brahma

C

CAF1 : Chromatin Assembly Factor 1

CagA : Cytotoxin-Associated Gene A

CD : Chromo-Domain

CDK : Cyclin Dependent Kinase 1

CDKN2A : Cyclin Dependent Kinase inhibitor 2A

CENP-A : Centromere Protein A

CHK1 : Checkpoint Kinase 1

CKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

CP : Cancer du Pancréas

CSD : Chromo-Sadow Domain

CTCF : CCCTC-binding factor

CTRIP : Circadian TRIP

D

DAXX : Dead domain associated protein

DDR: DNA Damage Response

DI : Déficiences Intellectuelles

DNA-PK : DNA Dependent protein Kinase

DNMT : DNA Methyl Transferase

DSB : Double Strand Breaks

DUB : Deubiquitinases

E

EED : Embryonic Ectoderm Development

EWS : Ewing Sarcoma

EZH2 : Enhancer of Zeste Homologue 2

F

FACT : FACilitates Chromatin Transcription

FBW7 : F-Box And WD Repeat Domain Containing 7

FBXO36 : F-Box Only protein 36

FET proteins : FUS EWS & TAF15 protein

FLI1 : Friend Leukemia Integration 1 transcription factor

FUS : FUsed in Sarcoma

G

G₁ : Gap 1

G₂ : Gap 2

GCase : GlucoCerebrosidase

H

HCc : Hétérochromatine Constitutive

HCf : Hétérochromatine Facultative

HDAC : Histone Deacetylase

HECT : Homologous to the E6-AP Carboxyl-Terminus

HIRA : Histone cell cycle Regulatory

HOXA9 : Homeobox protein A9

HNF4α : Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha

HR : Homologous Recombination

HP1 : Heterochromatin protein

HPV : Human Papilloma Virus

I

IDP : Intrinsically Disordered Protein

IDR : Intrinsically Disordered Region

IPMN : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm

IRM : Imagerie à Résonance Magnétique

ISWI : Imitation SWItch

J

JARID2 : Jumonji And AT-Rich Interaction Domain Containing 2

L

LLPS : Liquid-Liquid Phase Separation

M

MAC : Métaplasie Acino-Canalaire

MDC1 : Mediator of DNA Checkpoint 1

MDM2 : Mouse Double Minute 2

MED1 : Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1

MEF : Murine Embryonic Fibroblast

MND : Maladies NeuroDégénératives

MRN complex : Mre11, Rad50, Nbs1 complex

mTORC : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

N

N-WASP : Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

NCK : Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1

NHEJ : Non-Homologous End Joining

NLS : Nuclear Localization Signal

NPM : Nucleophosmin 1
NS : Nucleostemin
NUP98 : Nucleoporin 98

O

Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

P

PAS : Polyadenylation signal
PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PDAC : Pancreatic Ductal Adenocarcinoma
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
PP1 : Protein Phosphatase 1
PPM1G : Protein phosphatase 1G
PPPS : Polymer-Polymer Phase Separation
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog deleted on Chromosome 10
PTF1a : Pancreatic Transcription Factor 1a
PTM : Post Translational Modifications
PRC : Polycomb Repressive Complex
PR-DUB : Polycomb Repressive Deubiquitinase

R

RBR : Ring1 Between Ring2
RING : Really Interesting New Gene
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RNF8 : Ring Finger protein 8
RNF168 : Ring Finger protein 168
RPA70 : Replication Protein A 70

S

SAXS : Small Angle X-rays Scattering
SB : SPOP binding
SCF : Skp, Cullin, F-box containing complex
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
smFRET : single -molecule Fluorescence Resonance

Energy

SOX6 : SRY-Box transcription factor 6
SP : Séparation de Phase
SPOP : Speckles-Type POZ Protein
SSB : Single Strand Break
SUZ12 : Suppressor Of Zeste 12 Protein Homolog
SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-fermentable

T

TAD : Topologically Associated Domain
TEAD4 : TEA domain transcription factor 4
TAF15 : TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15
TAZ : Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
TRADD : Tumour necrosis factor Receptor-Associated Death Domain
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TRβ1 : Thyroid hormone Receptor beta 1
TRIP12 : Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12

U

ULF : Ubiquitin Ligase For ARF
UFD4 : Ubiquitin Fusion Degradation 4
USP7 : Ubiquitin Specific Protease 7
UTR : Untranslated region

W

WWE : Tryptophan-Tryptophan-Glutamate

Y

YY1 : Ying Yang 1

Z

ZEB1/2 : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

Liste des figures

L'ensemble des figures ont été réalisées et/ou éditées par mes soins avec le site BioRender.com.

Figure 1 : Représentation schématique d'un chromosome et d'une fibre de chromatine.	25
Figure 2 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de la queue N-terminale des histones (Adaptée de Millan-Zambrano et al.)	26
Figure 3 : Photo d'un noyau d'une cellule humaine prise en microscopie électronique à transmission (Source : Yale university).	27
Figure 4 : Représentation schématique de la répartition de l'hétérochromatine.	29
Figure 5 : Représentation schématique de l'établissement d'hétérochromatine constitutive.	30
Figure 6 : Représentation schématique de l'établissement d'hétérochromatine facultative.	32
Figure 7 : Représentation schématique de l'organisation 3D du génome et preuves expérimentales associées.	33
Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes de détection d'une cassure de l'ADN.	37
Figure 9 : Représentation schématique de la localisation du pancréas et de sa forme (Gauche, adaptée de la fondation -ARC.org). Coupe histologique du pancréas exocrine et endocrine (Droite, image de l'équipe).	38
Figure 10 : Les différents sous-types de PDAC en fonction de leur signature transcriptomique. (Adapté de Thakur et al.)	41
Figure 11 : Modèle linéaire de progression des acini en PanIN aboutissant à l'adénocarcinome pancréatique. Adapté de Storz 2017.	42
Figure 12 : Représentation schématique des principales altérations de l'organisation de la chromatine dans le CP.	46
Figure 13 : Représentation schématique du concept du "disorder to order"	47
Figure 14 : Illustration du concept d'ensemble conformationnel des protéines à IDR.	48
Figure 15 : Diagramme circulaire représentant les classes fonctionnelles des protéines à IDR.	49
Figure 16 : Représentation schématique d'un diagramme de phase.	51
Figure 17 : Modèle schématique de la formation d'hétérochromatine via la séparation de phase. Adapté de Larson et al.	53
Figure 18 : Modèle schématique de formation de compartiments sous chromatiniens par séparation de phase. (Adapté de Erdel et Rippe ¹⁴⁷).....	54
Figure 19 : Représentation schématique d'un condensat transcriptionnel formé via séparation de phase. (Adapté de Sabari et al. ¹⁵¹)	55
Figure 20 : Représentation schématique des différents condensats de réparation observés lors de cassures à l'ADN. (Adapté de Spegg et Altmeyer ⁵⁷).....	56
Figure 21 : Modèle de l'impact des altérations des protéines à IDR sur le développement de maladies neurodégénératives. (Inspirée de Patel et al. ¹⁶² et Zbinden et al. ¹⁶³).....	58
Figure 22 : Représentation schématique de l'implication de la protéine de fusion EWS-FLI1 dans la carcinogénèse.....	59
Figure 23 : Représentation schématique de la position du gène Trip12 sur le chromosome 2 et de l'organisation du promoteur bidirectionnel.....	62
Figure 24 : Représentation schématique de la structure de l'ARNm et de la protéine TRIP12.	62
Figure 25 : Histogramme du niveau d'expression de l'ARNm de Trip12 dans les tissus humains.	63
Figure 26 : Domaines protéiques de TRIP12	64
Figure 27 : Modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12.....	66
Figure 28 : Représentation schématique des domaines de la protéine TRIP12 dans différentes espèces.	67
Figure 29 : Représentation schématique du mécanisme d'ubiquitination des protéines.	69
Figure 30 : Représentation schématique des différents types d'ubiquitination.....	70
Figure 31 : Représentation schématique de la relation entre TRIP12 et BAF57.	71
Figure 32 : Représentation schématique de la relation entre TRIP12 et ASXL1.....	72
Figure 33 : Représentation schématique de la régulation de la voie ARF/P53 par TRIP12.	74
Figure 34 : Représentation schématique de la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN par TRIP12	77
Figure 35 : Représentation schématique des mutations et des variations du nombre de copies du gène Trip12 dans les cancers humains. (sources : cBioPortal)	78
Figure 36 : Histogramme du niveau d'expression de la protéine TRIP12 dans différents types de cancers.	80
Figure 37 : Représentation schématique des mutations non-sens répertoriées dans les déficiences intellectuelles, autisme et syndrome de Clark-Baraitser. (Adapté de Aeder et al. 2023).	82
Figure 38 : Modèle hypothétique de l'induction de la compaction par l'IDR de TRIP12	224
Figure 39 : Représentation schématique du mécanisme de "monkey-bar" appliquée à TRIP12	225
Figure 40 : Représentation schématique des mécanismes d'action possibles de TRIP12 sur l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures de l'ADN.....	228
Figure 41 : Western Blot représentant l'hétérogénéité d'expression de TRIP12 dans des lignées cancéreuses et graphique représentant la sensibilité de différentes lignées cellulaires à des agents inducteurs de cassures (source : Cancerxgenes).	229
Figure 42 : Viabilité cellulaire en réponse à la doxorubicine en fonction de différents shARN ciblant TRIP12.....	229

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques de l'euchromatine, l'hétérochromatine constitutive et facultative.	28
Tableau 2 : Principales altérations génétiques retrouvées dans l'adénocarcinome pancréatique.	40
Tableau 3 : Principaux outils expérimentaux et bioinformatiques pour l'identification de protéines à régions intrinsèquement désordonnées.	49
Tableau 4 : Liste des substrats identifiés de TRIP12.	68
Tableau 5 : Mutations du gène Trip12 & cancers associés.....	79

Chapitre 1 : Introduction bibliographique

Partie 1 : L'organisation de la chromatine

L'ADN est une macromolécule qui constitue la base de l'information génétique. Environ deux mètres d'ADN sont contenus dans le noyau de nos cellules qui mesure une dizaine de micromètres. Pour s'y organiser, l'ADN s'associe à des protéines pour former la chromatine. De remarquables mécanismes de compaction et d'organisation spatiale sont nécessaires pour contenir l'ADN dans les noyaux et en maintenir son intégrité.

I. De l'ADN aux territoires chromosomiques

a. L'unité de base de l'organisation de la chromatine : les nucléosomes

Chez tous les Eucaryotes, l'ADN s'enroule autour d'octamères de petites protéines appelées histones pour former les nucléosomes. Ils représentent l'unité de base de l'organisation de la chromatine.

Les octamères d'histones canoniques sont composés de deux copies des quatre histones : H2A, H2B, H3 et H4. Elles sont composées d'un domaine globulaire dans leur partie C-terminale, l'« histone fold » et d'une région intrinsèquement désordonnée dans leur partie N-terminale, la queue. Les histones s'agencent entre elles pour former le cœur (ou core) du nucléosome. Les deux paires de H3/H4 se tétramérisent et sont flanquées par deux dimères de H2A/H2B. L'ensemble constitue un octamère d'histones. Autour d'un octamère s'enroulent environ 146 paires de bases (pb) d'ADN pour former un nucléosome^{1,2}. Il existe également l'histone H1, ou « histone linker », capable d'interagir avec le nucléosome pour former le chromatosome (**Figure 1**). Elle interagit également avec l'ADN situé entre les nucléosomes (ADN linker) et participe à la stabilisation du nucléosome³.

L'enchainement des nucléosomes forme une fibre de chromatine de 11 nm en « collier de perle » et représente le premier niveau d'organisation de la chromatine. Grâce à l'histone H1, ces filaments s'empilent et forment une nouvelle fibre de forme solénoïde de 30 nm de diamètre (**Figure 1**).

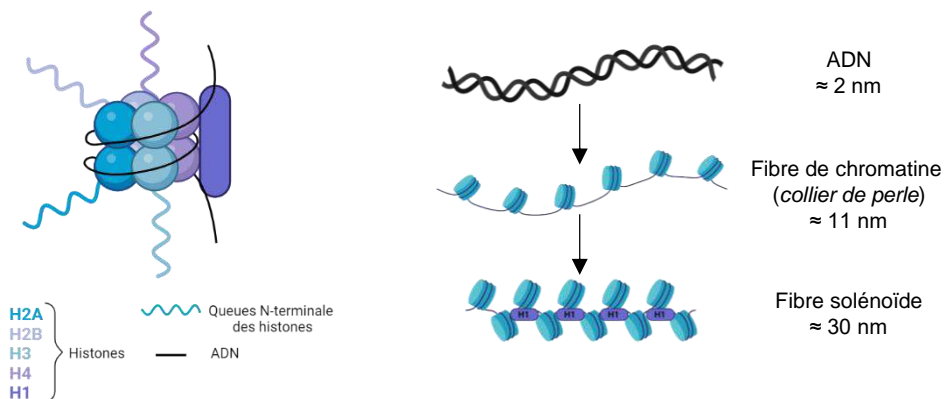


Figure 1 : Représentation schématique d'un chromatosome et d'une fibre de chromatine.

b. Les modifications épigénétiques et variants d'histones

La chromatine est une structure dynamique. Ses différents niveaux de compaction et d'organisation sont finement contrôlés par de nombreux mécanismes. En effet, les histones et l'ADN sont modifiés de façon réversible, héritable au cours des divisions cellulaires, et sans altération de la séquence de l'ADN par l'ajout de groupements chimiques : on parle de modifications épigénétiques.

i. Les modifications épigénétiques

♦ La méthylation de l'ADN

Les bases nucléiques qui composent l'ADN peuvent être modifiées par méthylation. A ce jour, deux types de méthylation de l'ADN ont été identifiés chez les Eucaryotes : la 5-méthylcytosine (5mC), et la N4-méthylcytosine (4mC). Cette modification est associée à la répression transcriptionnelle.

♦ Les modifications post-traductionnelles des histones

Les histones subissent une pléiotropie de modifications post-traductionnelles (PTM pour Post-Translational Modifications). Ces marques sont apposées par des protéines spécifiques, les « writers », elles se retrouvent principalement au niveau de la queue des histones et dans une moindre mesure au niveau de leur domaine globulaire. Les principales sont la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination (**Figure 1**)⁴. Ces modifications peuvent conduire, de par leur nature biochimique, à la déstabilisation de l'interaction entre l'ADN et les histones entraînant une modification de l'état de compaction de la chromatine⁵. Par exemple, l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine K16 (H4K16) déstabilise le nucléosome et favorise la décompaction de la chromatine⁶. Elles peuvent aussi servir de plateforme de recrutement pour des protéines « readers » qui assurent l'accumulation de protéines effectrices. En effet, en présence de cassures de l'ADN, la phosphorylation de l'histone H2A.X sur la sérine S139 (γ H2AX) est reconnue par la protéine Mediator of DNA Checkpoint 1 (MDC1) et permet le bon déroulement des mécanismes de réparation (cf *Chapitre 1 Partie 1.II.c*). Les protéines « readers » sont capables de reconnaître ces PTM grâce à des domaines protéiques spécifiques tels que les bromodomains, les chromodomains et les répétitions BRCT.

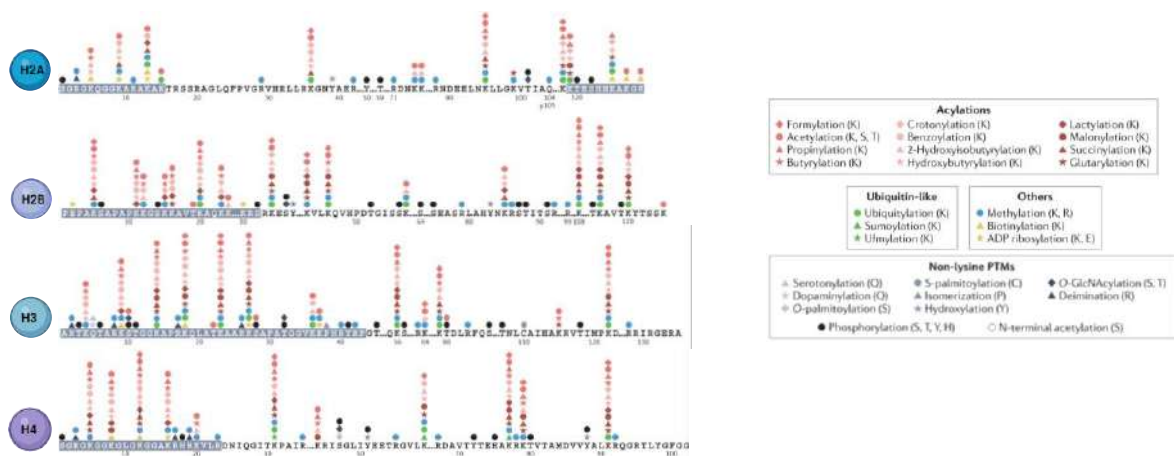


Figure 2 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de la queue N-terminale des histones (Adaptée de Millan-Zambrano et al.).

L'ensemble de ces modifications sont dynamiques, réversibles et peuvent être retirées par des protéines « erasers ». Les PTM des histones sont impliquées dans l'homéostasie de la chromatine et de par conséquent de nombreuses altérations sont retrouvées dans ses protéines lors de pathologies telles que les cancers.

ii. Les variants d'histones

En plus des PTM, il existe des variants d'histones distincts des histones canoniques. Contrairement aux histones canoniques, les gènes codant pour ces variants ne sont pas regroupés en « clusters », ils sont exprimés pendant tout le cycle cellulaire et possèdent une structure génique composée d'exons et d'introns. Leur incorporation aux nucléosomes a un impact sur les propriétés intrinsèques de la chromatine en modifiant sa compaction et/ou sa dynamique. Elle permet également le recrutement de protéines propres à chaque variant conférant des propriétés et fonctionnelles spécifiques⁷. Certains variants sont répartis uniformément sur tout le génome et présents dans tous les tissus tandis que d'autres sont retrouvés uniquement sur des régions génomiques précises et sont tissus-spécifiques. Par exemple, l'incorporation du variant d'histone H3, CENP-A (Centromeric Protein A) via HJURP (Holliday Junction Recognition Protein), est déterminante pour définir les régions centromériques. CENP-A interagit avec le kinétochore et est essentiel pour assurer une bonne ségrégation des chromosomes en mitose⁸. Ces rôles en font un acteur du maintien de l'intégrité du génome. Le variant d'histone H2A.Z, quant à lui, a un rôle ambivalent. Il est à la fois impliqué dans l'activation de la transcription⁹ et dans l'établissement d'hétérochromatine en augmentant les interactions entre le nucléosomes et l'hétérochromatine protéine 1a (HP1 α)¹⁰. De par leur importance dans le maintien de l'intégrité du génome, les dérégulations de l'expression et de l'incorporation de ces variants d'histones sont communément retrouvées dans les cancers et les troubles développementaux⁷.

L'ensemble de ces modifications définit l'état de compaction de la chromatine. Elle peut être sous forme d'euchromatine décondensée ou sous forme d'hétérochromatine compactée. Ces différents états de compaction sont observables en microscopie électronique à transmission sur des noyaux interphasiques (**Figure 2**)^{11,12}.

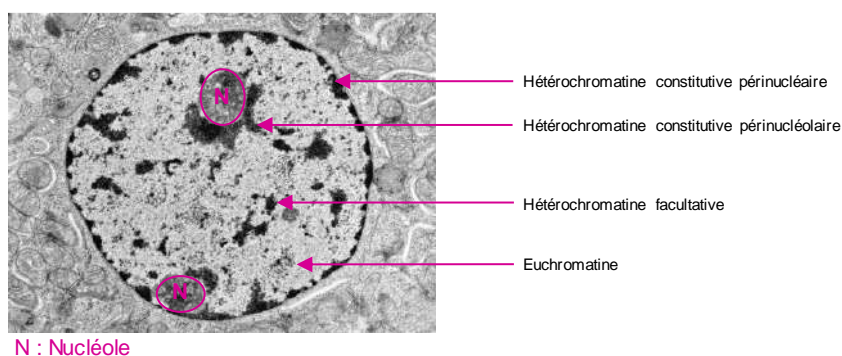


Figure 3 : Photo d'un noyau d'une cellule humaine prise en microscopie électronique à transmission (Source : Yale university).

c. L'euchromatine

L'euchromatine est caractérisée par un faible état de compaction et elle apparaît peu dense aux électrons en microscopie électronique à transmission (**Figure 2**). Au sein du noyau, l'euchromatine est localisée en position centrale et est exclue des régions périnucléaires et

périnucléolaires. L'euchromatine est également caractérisée par un espacement plus important entre les nucléosomes entraînant une plus grande accessibilité aux différents facteurs se fixant sur l'ADN tels que la machinerie transcriptionnelle. L'euchromatine est enrichie en gènes transcriptionnellement actifs et en éléments régulateurs tels que les promoteurs et « enhancers ». L'euchromatine est également associée à des modifications post-traductionnelles et des variants d'histones spécifiques qui sont résumés dans le **Tableau 1**. L'établissement et la maintenance de l'euchromatine sont assurés par de nombreux complexes protéiques. Les histones sont incorporées à l'ADN grâce à différentes chaperonnes d'histones de façon indépendante ou dépendante de la réplication de l'ADN. La restructuration des nucléosomes sur l'ADN (éviction, glissement, échange) est, elle, assurée par des complexes de remodelage de la chromatine ¹³ (**Tableau 1**).

	Euchromatine	Hétérochromatine constitutive	Hétérochromatine facultative
Statut	Accessible	Non-accessible	Accessibilité variable
Position dans le noyau	Centrale	Périnucléaire Périnucléolaire	Centrale Corpuscule de Barr
Séquences présentes	Promoteurs Éléments régulateurs Gènes actifs	Télomériques Péricentromériques ADN satellites Éléments transposables	Gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et le développement Chromosome X chez les femelles
Marques épigénétiques associées	H3K4me3 H3K27ac H3K26me H3K9ac	H3K9me2/3 H4K20me3 ADN 5mC	H2AK119Ub H3K27me3 H3K9me3 ADN 5mC
Variants d'histones	H2A.Z, H3.3	CENP-A	macroH2A
Protéines et complexes associés	Asf1, CAF-1, HIRA, NAP1, FACT	Ga9, Suv39H1/2, HP1, KAP1, HJURP	Complexes répresseurs Polycomb 1 et 2
Complexe de remodelage	SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80	NuRD NoRC ISWI SWI/SNF	-

Tableau 1 : Principales caractéristiques de l'euchromatine, l'hétérochromatine constitutive et facultative.

d. L'hétérochromatine

i. Les caractéristiques principales

Le terme hétérochromatine a été défini pour la première fois en 1928 par le généticien allemand E. Heitz¹¹ comme des régions chromosomiques qui ne se décondensent pas après la

la méthylation de l'ADN (5mC) est liée à l'hyperméthylation sur H3K9 et est également une caractéristique majeure de l'hétérochromatine.

Une fois initiée, les domaines d'hétérochromatine sont propagés. L'hétérochromatine protéine 1 alpha (HP1 α ou CBX5) interagit avec l'histone méthylée H3K9me₃ via son chromo-domaine (CD) et s'homodimérise via son chromo-shadow domaine (CSD). Cette homodimérisation induit un rapprochement des nucléosomes et participe à la compaction de la chromatine. HP1 induit le recrutement de protéines lesquelles assurent le maintien et la propagation des domaines (DNMT : DNA Methyl Transferase, HMT : Histone Methyl Transferase). De plus, différents complexes de remodelage de la chromatine sont impliqués dans la formation et la maintenance des régions d'HCC¹⁶(Figure 4).

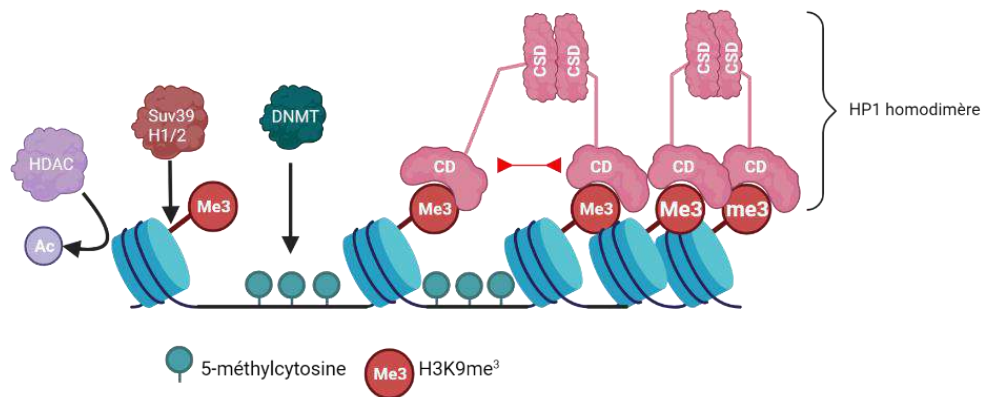


Figure 5 : Représentation schématique de l'établissement d'hétérochromatine constitutive.

La maintenance et le rétablissement de l'HCC a lieu après les événements disruptifs de sa structure comme la mitose et la réplication de l'ADN. En effet, lors de la réplication, les histones parentales H3K9me₃ sont aléatoirement dispatchées sur les brins néo-synthétisés. En fin de phase S, la protéine KAP1 (KRAB-Associated Protein 1) est phosphorylée et s'associe à la fourche de réplication. KAP1 entraîne le recrutement de Suv39h1 laquelle entraîne la triméthylation sur la lysine K9 des histones nouvellement incorporées et le recrutement d'HP1 restaurant la structure de l'hétérochromatine¹⁷.

Depuis quelques années, plusieurs études suggèrent que la formation d'hétérochromatine serait également initiée par un mécanisme biophysique de séparation de phase, ce processus sera détaillé dans la partie 2.II.a.ii.^{18,19}.

♦ Les rôles de l'hétérochromatine constitutive

L'HCC joue un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome. Par exemple, chez *Saccharomyces pombe*, l'hétérochromatine péricentromérique est essentielle à l'incorporation du variant d'histone CENP-A, lequel est primordial pour l'attachement du kinétochore avec les microtubules lors de la mitose²⁰. Elle participe au bon déroulement de ségrégation des chromosomes en mitose. Chez *Drosophila melanogaster* et *Saccharomyces pombe*, la déplétion des méthyltransférases (G9a, Suv39) sur H3K9 ou d'HP1 entraînent des erreurs de ségrégation des chromosomes augmentant l'instabilité chromosomique. Par ailleurs, l'HCC participe à la répression transcriptionnelle des séquences d'ADN répétées. La surexpression d'ARN correspondant aux répétitions d'hétérochromatine entraîne la formation d'hybrides ADN:ARN capables de causer un effondrement de la fourche de réplication et de générer des cassures de

l'ADN¹⁴. L'hétérochromatine constitutive permet également le « silencing » (mise sous silence) des transposons, elle freine leur sauts/déplacements empêchant l'altération de régions codantes du génome. Enfin, lors de la réparation de dommages à l'ADN, l'hétérochromatine permet de limiter la recombinaison entre des séquences répétées sur des chromosomes non-homologues et maintient l'intégrité du génome en réduisant la formation de translocations chromosomiques. Des altérations de l'HCC sont communément retrouvées dans des cancers mais également lors du vieillissement physiologique et pathologique. Par exemple, une perte drastique de régions d'HCC est observée dans les cancers ce qui contribue à la progression et à l'hétérogénéité tumorale¹⁴.

iii. L'hétérochromatine facultative (HCf)

Le développement et la différenciation cellulaire nécessitent l'expression de gènes spécifiques. En dehors de ces étapes, via l'action de protéines spécifiques et l'absence de signaux activateurs, ces gènes sont silencieux et forment l'HCf. Les régions d'HCf regroupent les gènes soumis à l'empreinte parentale, les gènes Hox impliqués dans la mise en place des structures cellulaires le long de l'axe antéro-postérieur, des régions régulatrices (promoteur/ « enhancer ») et le chromosome X inactivé chez les individus femelles²¹. Compte tenu du rôle des gènes contenus dans l'HCf lors de la différenciation cellulaire, les régions d'HCf varient en fonction du type cellulaire et de l'étape du développement. Ces régions présentent toutefois des caractéristiques communes. Elles arborent une large déacétylation des histones H3 et H4, une incorporation accrue du variant d'histone macro H2A, une hyperméthylation de l'ADN (5mC) au niveau des régions promotrices et la présence des complexes répresseurs Polycomb (PrC) 1 et 2 (PRC1 et PRC2). Ces deux complexes modifient post-traductionnellement les histones en apposant respectivement les marques H2AK119Ub et H3K27me3²². A noter que ces marques ne sont pas exclusives à l'HCf, elles sont partagées avec les régions d'HCC.

♦ La formation de l'hétérochromatine facultative

L'établissement de l'HCf varie en fonction du type de gènes/éléments. Par soucis de concision, seul l'exemple de l'inactivation du chromosome X sera abordé (pour les autres mécanismes, se référer à la référence n°22). Il consiste en l'extinction quasi-totale des gènes portés par l'un des deux chromosomes X chez une femme. Le chromosome X inactivé est visualisé en microscopie sous la forme d'une région dense au DAPI, appelée le corpuscule de Barr. L'inactivation du chromosome X s'initie lorsqu'une des deux copies commence à fortement exprimer le long ARN non codant Xist (17kb). Xist recouvre le chromosome entier, et induit une répression génique. Il conduit également au recrutement d'histones déacétylases et des complexes PrC. A ce jour, il est décrit que le complexe PRC1 est recruté dans un premier temps et ubiquitine l'histone H2A sur la lysine K119 via l'E3 ubiquitine ligase RING1b présente dans ce complexe. Dans un deuxième temps, le complexe PRC2 est recruté via l'intermédiaire du co-facteur JARID2 et tri-méthyle l'histone H3 sur la lysine K27 via l'activité méthyltransférase d'EZH2 (composant du complexe PRC2). Via cette tri-méthylation, PRC2 participe également à la maintenance de l'inactivation du chromosome X ainsi qu'au maintien du motif de méthylation de l'ADN (**Figure 5**).

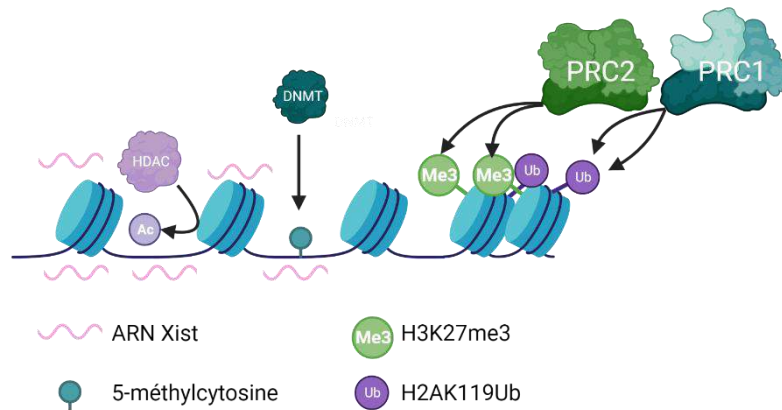


Figure 6 : Représentation schématique de l'établissement d'hétérochromatine facultative.

Des altérations de l'inactivation du chromosome X sont retrouvées dans des pathologies comme les lupus érythémateux²³ et le cancer du sein²⁴.

e. L'organisation 3D du génome

La répartition euchromatine/hétérochromatine et les modifications épigénétiques associées forment un niveau d'organisation en 2D du génome. De récentes avancées technologiques majeures ont mis en évidence que le génome se structure également de façon tridimensionnelle. Ces dernières années, le développement de techniques de microscopie à super résolution²⁵ et de capture de conformation des chromosomes (3C, 4C, 5C, et Hi-C²⁶) a permis d'appréhender des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine.

i. Les boucles de chromatine

Une des caractéristiques du génome des Vertébrés est la présence d'éléments cis-régulateurs (CRE pour Cis Regulatory Elements). Parmi ces CRE, les enhanceurs sont de petites régions d'ADN non-codantes (50-1500 pb) qui régulent la transcription de gènes. Elles peuvent se situer à plusieurs milliers paires de base en amont ou aval²⁷. Le rapprochement spatial de l'« enhanceur » vers le promoteur du gène forme une boucle de chromatine qui constitue le premier niveau d'organisation 3D²⁸ (**Figure 6**). La formation de ces boucles de chromatine serait en partie due à l'association des cohésines et du complexe co-activateur de la polymérase de l'ARN II, Mediator. L'exemple le plus connu est celui du « locus control region » du cluster de gènes de la β -globuline²⁹. Cependant, ces contacts ne sont pas limités aux interactions « enhanceurs »/promoteurs. Ils sont également décrits pour des gènes mis sous silence par le complexe PRC2²⁸.

ii. Les domaines topologiquement associés (TAD)

Les expériences d'Hi-C menées en 2012 par le groupe de Ren³⁰ et Cavali³¹ suggèrent que les génomes se partitionnent en domaines topologiquement associés (TAD pour topologically associated domain). Il s'agit de domaines de chromatine qui interagissent préférentiellement entre eux au sein d'un même TAD. Les différents TAD sont séparés grâce à la présence de séquences « insultrices » qui inhibent l'interaction entre deux TAD adjacents (**Figure 6**). Chez

les Mammifères, leur taille varie de quelques centaines de kilobases à quelques mégabases. Au sein d'une même espèce, les TAD sont relativement conservés selon les différents types cellulaires mais les contacts entre les différentes régions génomiques d'un même TAD dépendent du type cellulaire. Les TAD sont des domaines dynamiques. Lors de la différenciation cellulaire, un certain nombre de TAD subit une réorganisation de leur interaction intra-TAD³².

Le modèle actuel de formation de TAD est celui de la « loop extrusion ». Un complexe de cohésines forme un anneau encerclant l'ADN pour former un début de boucle qui s'agrandit jusqu'à la rencontre de deux sites convergents de la protéine « isolante » (insulator) CTCF (CCCTC-binding factor) (**Figure 6**). Ainsi, grâce aux propriétés d'« isolement » de cette protéine, les gènes et éléments régulateurs appartenant à un TAD donné n'influencent pas ceux présent dans un TAD à proximité. Ce modèle est dynamique grâce à la protéine WAPL (Wings apart-like protein homolog) qui déstabilise le complexe de cohésines.

iii. Les compartiments A et B

Les différents TAD effectuent des interactions longues distances pour former les compartiments A et B. Globalement, ils sont constitués respectivement de chromatine active (euchromatine) et inactive (hétérochromatine) et interagissent préférentiellement avec le compartiment de même nature (**Figure 6**). Tout comme les TAD, les compartiments sont dynamiques, des changements de compartiments A vers B ou B vers A sont observés notamment lors de la différenciation cellulaire.

iv. Les territoires chromosomiques

La coalescence des compartiments de nature identique appartenant au même chromosome forme les territoires chromosomiques³³. Ils représentent le volume qu'occupe chaque chromosome dans le noyau des cellules et sont le niveau le plus haut d'organisation de la chromatine 3D (**Figure 6**). Plusieurs études démontrent que des altérations de cette organisation tridimensionnelle sont retrouvées dans de nombreuses pathologies, notamment dans les cancers³⁴.

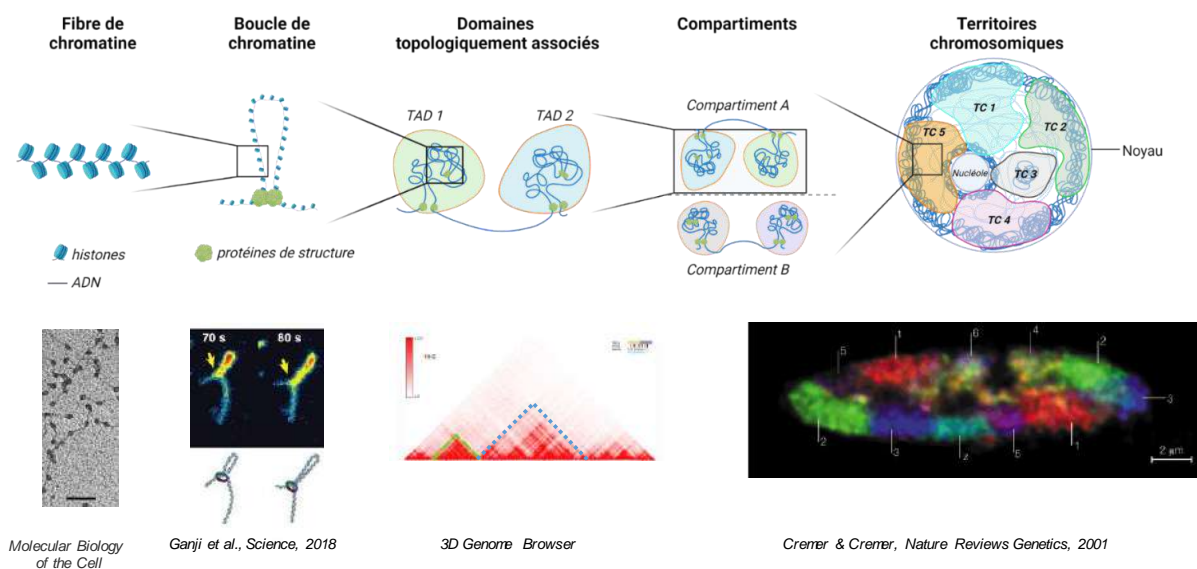


Figure 7 : Représentation schématique de l'organisation 3D du génome et preuves expérimentales associées.

II. L'importance de la dynamique de l'organisation du génome sur les processus nucléaires

Pour assurer un bon déroulement de la réplication de l'ADN, de la transcription ou encore des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, une réorganisation de la chromatine est nécessaire. Ces modifications sont transitoires et participent au maintien de l'intégrité du génome. La dynamique de l'organisation de la chromatine est donc primordiale pour ces processus nucléaires.

a. La réplication

La réplication fidèle de l'ADN est un processus-clé pour assurer le partage du matériel génétique de la cellule-mère aux cellules filles. Elle se déroule durant la phase S (synthèse) du cycle cellulaire. Des facteurs de réplication sont recrutés au niveau de milliers d'origines de réplication lors de la phase G₁. Au cours de phase S, d'autres facteurs sont recrutés au niveau des origines de réplication et permettent l'initiation de la réplication. Chacune des origines initiées forme une fourche de réplication bidirectionnelle³⁵. L'ADN est répliqué par bloc chromosomique d'environ un mégabase appelé « domaine de réplication ». Les différentes régions du génome ne sont pas répliquées en même temps lors de la phase S, certaines le sont en début de fin phase S, d'autres en fin de phase S, on parle du « timing de réplication ».

La réplication de l'ADN se déroule dans un contexte d'organisation spatiale du génome. Une modification transitoire des marques épigénétiques des histones et une réorganisation spatiale sont observées au cours de cette phase³⁶. En effet, lors de la réplication, la chromatine subit cinq grandes étapes de remodelage. La première est le désassemblage des nucléosomes en amont de la machinerie de réplication. Vient ensuite le recyclage des histones parentales dans les brins d'ADN néo synthétisés ainsi que l'incorporation d'histones nouvellement synthétisées. Ces deux types d'histone s'assemblent pour former les nucléosomes une fois la machinerie de réplication passée. La dernière étape consiste en la restauration des marques épigénétiques des histones et de l'ADN afin de restaurer la structure de la chromatine une fois la réplication terminée. Ces étapes sont principalement contrôlées par des complexes de protéines chaperonnes d'histones (FACT, ASF1, CAF1, HIRA) et des complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (ISWI, INO80).

Les niveaux supérieurs d'organisation du génome sont déterminants pour le timing de réplication. La répartition entre les compartiments A et B corrèle avec les régions répliquées en début de phase S ou en fin de phase S. Les régions répliquées précocement sont situées vers le centre du noyau, comme l'euchromatine/compartiment A et les régions tardives sont situées en périphérie nucléaire/nucléolaire, comme l'hétérochromatine/compartiment B. La position spatiale des régions génomiques influe de cette façon le timing de réplication³⁷⁻³⁹. De plus, Pope et al. ont démontré que les extrémités des domaines de réplication correspondent à des frontières de TAD⁴⁰. Plus récemment, il a été mis en évidence que les limites des boucles de chromatine délimitées par CTCF définissent la localisation des origines de réplication en phase S chez l'Homme⁴¹. Enfin, la protéine RIF1 (Replication timing regulatory Factor 1) recouvre les régions tardivement répliquées et limite les interactions physiques entre les domaines de réplication

ayant un timing de réplication différent. RIF1 fait lien moléculaire entre l'architecture nucléaire et le contrôle du timing de réplication⁴².

b. La transcription

A l'instar de la réplication de l'ADN, la transcription entraîne une modification de l'organisation de la chromatine. Lors de la transcription, la chromatine subit des modifications transitoires de sa structure pour permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Cette ouverture est permise grâce à plusieurs étapes. Les modifications post-traductionnelles des histones apposées par des enzymes modificatrices d'histones spécifiques permettent non seulement de relâcher l'interaction ADN/histones mais servent également de plateforme de recrutement pour des protéines effectrices. Ces modifications participent également à la mise en place des niveaux d'organisation supérieurs du génome. Des complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP tels que SWI/SNF, accompagnés d'histones chaperonnes modulent l'espacement des nucléosomes sur l'ADN pouvant même conduire à l'éviction des nucléosomes. Enfin, l'incorporation de variants d'histones tels que H3.3 favorise l'activation de la transcription⁴³.

Plusieurs études soulignent la participation de la transcription à la structuration dynamique du génome. Il a été proposé que, lors de la transcription, le complexe Mediator (co-facteur de l'ARN polymérase II) interagit avec les cohésines et participe à la formation des boucles « enhancer »/promoteur⁴⁴. La déplétion par ARN interférent du complexe Mediator conduit à une diminution de la formation des boucles de chromatine⁴⁵. D'autres études mettent en évidence le lien entre transcription et organisation de la chromatine via le phénomène de séparation de phase et seront abordés dans la partie 2.II.a.iii.

Par ailleurs, les zones transcriptionnellement actives se regroupent en « cluster » pour former des usines à transcription (ou « transcription factories ») et mettent en évidence la grande dynamique de la chromatine ainsi que l'importance de la transcription dans l'organisation en compartiments A/B du génome⁴⁶. Par exemple, lors de la différenciation cellulaire neurale, un programme transcriptionnel propre au tissu est mis en place. Il est concomitant à la réorganisation des frontières de TAD contenant les gènes impliqués dans la différenciation. Ces données mettent en lumière l'étroite relation entre les différents niveaux d'organisation supérieurs du génome et la transcription.

c. La réparation des cassures double brin de l'ADN

Tout au long de leur vie, les cellules sont constamment exposées à des agents inducteurs de dommages à l'ADN. Ces dommages peuvent être d'origine endogène (stress réplicatif, espèces réactives de l'oxygène) ou exogène (radiations ionisantes, tabac, chimiothérapies, composés chimiques)⁴⁷. Les agents inducteurs de dommages conduisent à la formation de différents types de lésions de l'ADN dont les cassures simple et double brin (respectivement SSB et DSB). Par soucis de concision, uniquement les DSB seront abordées ici.

Les DSB sont les dommages les plus génotoxiques. Une seule cassure non ou incorrectement réparée peut être mutagène ou létale pour la cellule. Les cassures dans le génome entraînent la mise en place d'une réponse aux dommages de l'ADN ou DDR (DNA Damage Response) qui se divise en trois étapes : la détection, la signalisation et la réparation. Chez les

Mammifères, il existe principalement deux voies de réparation pour les DSB : la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ pour non homologous-end joining), un mécanisme non conservatif et la recombinaison homologue (HR pour homologous recombination), un mécanisme conservatif qui nécessite une matrice d'ADN ou « template ». Au cours de ces mécanismes, la chromatine et sa dynamique sont grandement modifiées pour assurer l'efficacité de la réparation.

Les DSB sont reconnues par des protéines senseurs (PARP1-2 (Poly(ADP-Ribose)Polymerase)/ complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1)/dimère Ku70-80). Cette reconnaissance entraîne le recrutement de protéines de la famille des PI3K-related kinase impliquée dans la signalisation de la DDR : ATM/ATR/DNA-PK (Ataxia-Telangiectasia-Mutated/Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related/DNA-dependent Protein Kinase). Ces protéines, via leur activité kinase, entraînent l'arrêt du cycle cellulaire pour laisser le temps à la cellule de réparer la cassure. Elles phosphorylent le variant d'histone H2A.X pour former γ H2A.X au niveau de la cassure. Cette phosphorylation se propage très rapidement sur de grands domaines (1-2 mégabases de part et d'autre de la cassure) par ATM. La protéine MDC1 (Mediator of DNA checkpoint 1) reconnaît γ H2A.X. L'E3 ubiquitine ligase RNF8 est recrutée via MDC1 et ubiquitine l'histone H1⁴⁸. Cette ubiquitination est reconnue par une autre ubiquitine ligase RNF168 qui, à son tour, polyubiquitine en chaîne K63 (*Chapitre 1 Partie 3.II.a*) les histones H2A et γ H2AX sur leur lysine K13 ou K15⁴⁹. L'ensemble de la signalisation permet d'amplifier le signal de la cassure et de recruter les effecteurs de la réparation (**Figure 7**). Le choix du mécanisme de réparation NHEJ vs HR se fait en fonction de l'étape du cycle cellulaire dans lequel se trouve la cellule, de la nécessité de résection des extrémités de la DSB mais également en fonction du contexte chromatinien dans lequel se trouve la cassure (euchromatine ou hétérochromatine). En effet, l'organisation nucléaire joue un rôle critique sur la maintenance de la stabilité génomique⁵⁰. Outre ces modifications post-traductionnelles de signalisation des DSB, une réorganisation physique des histones est décrite^{51,52}. Une décondensation de la chromatine est observée au niveau des cassures suite à l'action de complexe de remodelage de la chromatine (ISWI, FACT) qui, comme pour la transcription, participe à l'éviction des histones pour permettre le recrutement des effecteurs.

Les modifications que subit la chromatine lors d'une DSB dépend du contexte chromatinien dans lequel elle se trouve. En effet, lors d'une cassure dans une zone d'hétérochromatine, une relocalisation de la cassure dans une région plus accessible et décondensée est nécessaire pour qu'elle soit réparée efficacement. Cette cassure est relocalisée dans une région nucléaire où la réparation sera plus facile. Il a été démontré que cette relocalisation fait intervenir le réseau d'actine F, de myosine nucléaire ainsi que le complexe de nucléation de l'actine ARP2/3 (Actin related protein 2/3)^{53,54}. De plus, une décondensation est observée au niveau de ces zones. Elle est possible grâce à la protéine KAP1 (KRAB Associated Protein 1). En effet, lors de l'activation de la DDR, ATM phosphoryle KAP1. Ceci résulte en une dissociation de CHD3 (chromodomain helicase DNA binding protein 3) (action de compaction) et permet le recrutement de ISWI (Imitation Switch) qui entraîne une relaxation de la chromatine pour favoriser la réparation.

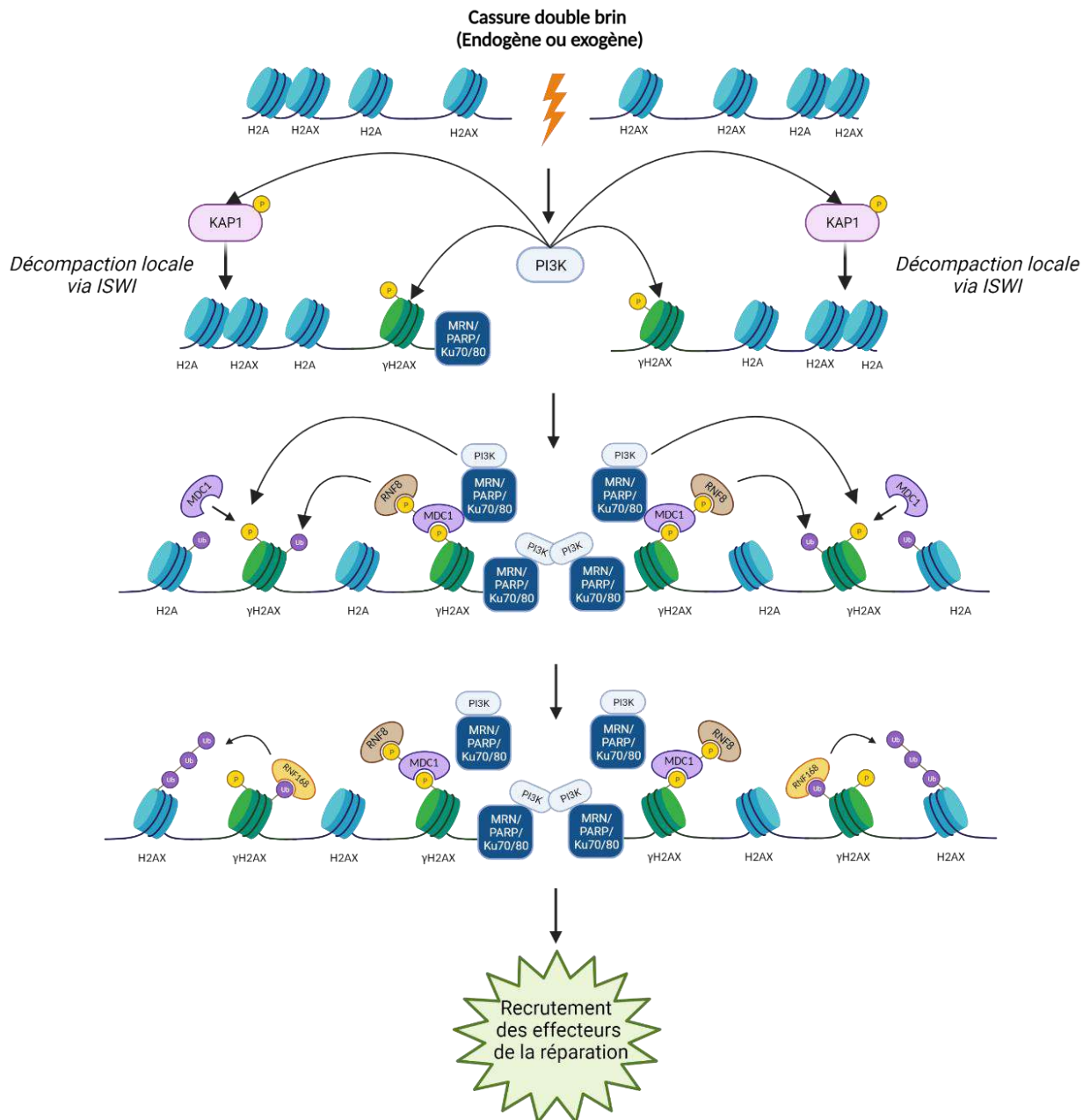


Figure 8 : Représentation schématique des mécanismes de détection d'une cassure de l'ADN.

Enfin, l'organisation tridimensionnelle du génome est primordiale pour le bon déroulement de la DDR⁵⁵. L'équipe de G. Legube a récemment démontré que, suite à une DSB, la propagation de la phosphorylation de H2AX est dépendante de la formation de boucle de chromatine selon le mécanisme de « loop-extrusion » et est limitée aux frontières des TAD⁵⁶. Cette étude souligne le lien étroit entre l'organisation de la chromatine et les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN.

La séparation de phase est également requise pour une réparation des dommages à l'ADN efficace notamment via la protéine FUS (Fused-in Sarcoma)⁵⁷. FUS est recrutée aux DSB via PARP1, elle permet le recrutement de la déacétylase d'histone HDAC1, laquelle est essentielle à la réparation des cassures⁵⁸. FUS est capable d'induire une séparation de phase via une région intrinsèquement désordonnée (*Chapitre 1 Partie 2.II.a.iv*) au niveau de la cassure qui participe au recrutement des acteurs de la DDR⁵⁹.

L'ensemble de ces études met en avant la primordialité de l'organisation de la chromatine dans les processus nucléaires-clés que sont la réplication, la transcription et la réparation des dommages à l'ADN. Des altérations de ces mécanismes sont communément retrouvées dans les pathologies, notamment les cancers. Mieux décrypter les altérations de l'organisation s'avère essentiel pour une meilleure compréhension de ces maladies^{32,60}.

III. Les altérations de l'homéostasie de la chromatine dans une pathologie : l'exemple de l'adénocarcinome pancréatique

Le pancréas est un organe glandulaire du système digestif d'environ 18 cm de long. Il est divisé en trois grandes portions : la tête située à proximité du duodénum, le corps et la queue située à proximité de la rate. Le pancréas est une glande amphicrine c'est-à-dire qu'elle possède à la fois une activité endocrine et une activité exocrine. L'activité endocrine est assurée par les îlots de Langerhans qui représentent 1 à 2% du volume du pancréas (**Figure 8**). Les différentes hormones sécrétées telles que l'insuline et le glucagon participent à la régulation du métabolisme glucidique⁶¹. L'activité exocrine est assurée par les cellules acineuses ou acini et les canaux pancréatiques qui constituent 95% du volume du pancréas. Les acini permettent la synthèse et la sécrétion des enzymes digestives telles que l'amylase et la carboxypeptidase. Elles sont amenées des acini au tractus digestif via les cellules canalaire (ou ductales) qui forment les canaux pancréatiques. La quantité de protéines produite n'est égalée par aucun autre type cellulaire. Cette synthèse protéique intense engendre du stress cellulaire qui peut être accentué par des facteurs extérieurs (alcool, tabac, pancréatite). L'homéostasie de ce tissu est maintenue grâce une grande plasticité cellulaire permise grâce au processus de métaplasie acino-canaire (MAC). En effet, les cellules acineuses ont la capacité de se différencier et se transdifférencier en cellules ressemblant à des progéniteurs exprimant des marqueurs de cellules canalaire. La MAC permet la régénération des tissus pancréatiques exocrines après un stress. Cependant, dans un contexte oncogénique (activation d'oncogènes), ce processus devient irréversible et peut être à l'origine de l'initiation du cancer du pancréas (CP) (*Chapitre 1 Partie 1.3.a.iv*).

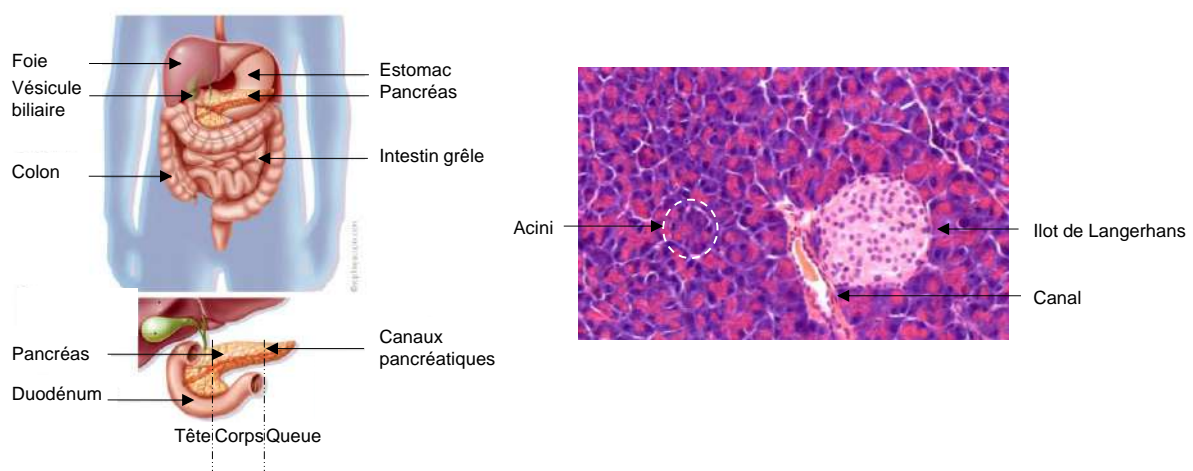


Figure 9 : Représentation schématique de la localisation du pancréas et de sa forme (Gauche, adaptée de la fondation-ARC.org). Coupe histologique du pancréas exocrine et endocrine (Droite, image de l'équipe).

a. Le cancer du pancréas

i. L'épidémiologie et les facteurs de risque

D'après le Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr/>) en 2020, 496 000 nouveaux cas de cancer du pancréas ont été recensés dans le monde tout âge et sexe confondu avec un nombre de décès de 466 000 par an. Le CP est classé 12^{ème} cancer le plus fréquent et 7^{ème} plus mortel. Au sein de l'Union Européenne, un modèle de prédiction estime que le CP deviendra la 3^{ème} cause décès par cancer d'ici à 2025⁶². De par l'absence de symptômes spécifique et de traitements réellement efficaces, le taux de survie à 5 ans pour le CP n'est seulement que de 12%⁶³. Il existe différents types de CP mais l'adénocarcinome canalaire pancréatique (PDAC pour Pancreatic Ductal Adenocarcinoma) représente plus de 90% des cas. L'apparition de ce cancer est influencée par divers facteurs de risque. Ils peuvent se scinder en deux catégories : les facteurs modifiables et environnementaux tels que le tabac, l'obésité, l'alcool et la pancréatite aiguë/chronique ; et les facteurs non modifiables qui regroupent l'âge, le diabète de type II et les facteurs héréditaires⁶⁴.

ii. Les symptômes, le diagnostic et les traitements

♦ Les symptômes

Une des caractéristiques du CP est l'absence de symptômes spécifiques de la maladie. Les patients présentent dans la majorité des cas des douleurs abdominales et/ou dorsales, une perte d'appétit et de poids, un changement de la consistance des selles ; une jaunisse peut également survenir. Ces symptômes peuvent être interprétés comme bénins et retarder le diagnostic de la maladie ainsi que la prise en charge des patients⁶⁵. Près de 80% des cas sont diagnostiqués à des stades avancés, métastatiques et par conséquent plus agressifs. Les métastases sont retrouvées majoritairement au niveau des tissus hépatiques et pulmonaires.

♦ Le diagnostic

A ce jour, il n'existe pas de marqueur sanguin spécifique du CP. Le diagnostic se fait par la détection d'une tumeur via des méthodes d'imagerie médicale telles que l'échographie abdominale, les scanners ou l'imagerie à résonance magnétique (IRM). Une fois la présence de la tumeur confirmée, une biopsie suivie d'un diagnostic anatomopathologique sont réalisées afin de caractériser et stratifier la tumeur dans différents stades en fonction de trois critères : la taille de la tumeur, l'invasion des ganglions lymphatiques et la présence de métastase⁶⁶. Une grande diversité interindividuelle et intratumorale est observée.

♦ Les traitements

La chirurgie combinée à de la chimiothérapie est le traitement le plus efficace et le seul à visée curative. Toutefois, à cause du diagnostic tardif souvent à des stades avancés et métastatiques, la chirurgie ne concerne que ~20% des patients. Pour la majorité des patients, il existe des traitements palliatifs chimiothérapeutiques.

La gemcitabine ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine (dFdC) et le FOLFIRONIX sont les deux chimiothérapies les plus utilisées dans le traitement du CP. La Gemcitabine est un analogue de la désoxycytidine appartenant à la famille des anti-métabolites. Le métabolite final de la gemcitabine, le dFdCTP entre en compétition avec la désoxycytidine pour la synthèse d'ADN et

bloque la progression de la réplication de l'ADN par terminaison de chaîne masquée et induit l'apoptose des cellules⁶⁷. Approuvée en 1997 par la FDA, la gemcitabine est utilisée depuis comme le traitement standard du CP.

Le FOLFIRINOX est un régime de chimiothérapies. Il est proposé aux patients avec peu de signes d'affaiblissement. Il est composé d'acide folinique, de fluorouracile (5-FU), d'irinotécan et d'oxaliplatine. Comme la gemcitabine, le 5-FU est un analogue de la thymidine de la famille des anti-métabolites, il inhibe la réplication de l'ADN. L'acide folinique potentialise l'action du 5-FU. L'irinotécan est un inhibiteur de la topoisomérase de l'ADN I qui est essentielle à la réplication de l'ADN. Il est responsable de l'activité cytotoxique du FOLFIRINOX⁶⁸. L'oxaliplatine est un dérivé du cisplatine appartenant à la famille des sels de platine. Ils forment des liaisons entre les purines sur les brins d'ADN et génèrent des adduits (complexe platine/ADN). Ces adduits entraînent des distorsions de la double hélice d'ADN qui créent des cassures et conduisent à la mort cellulaire⁶⁹. Malgré de réels progrès dans la prise en charge des patients, ces traitements restent peu efficaces et des phénomènes de résistance aux chimiothérapies surviennent dans la majorité des cas^{70,71}. Cette résistance est due, entre autres, à de multiples altérations génétiques et épigénétiques, à l'hétérogénéité des tumeurs, à la redondance et à la compensation des voies de signalisation. De plus, le microenvironnement du CP est très fibrotique. Il forme une barrière physique aux chimiothérapies et limite la biodisponibilité des traitements⁷².

Pour pallier à ces résistances, des nombreux essais cliniques sont en cours pour développer des thérapies ciblées et/ou des immunothérapies. Aujourd'hui, une seule thérapie ciblée (Olaparib) ciblant PARP1 est autorisée dans le CP chez des patients avec des mutations germinales sur les gènes BRCA traitées au FOLFIRINOX. Ces patients représentent environ 5% à 7% des cas. Ils possèdent une réparation par recombinaison homologue déficiente⁷³. En inhibant PARP1 via l'Olaparib, une létalité synthétique est induite. L'essai clinique POLO (Pancreas Cancer Olaparib Ongoing, NTC02184195) démontre le doublement statistiquement significatif de la survie sans progression de la maladie après traitement à l'Olaparib pour ces patients et une amélioration non statistiquement significative pour la survie globale⁷⁴⁻⁷⁶. Ces données mettent en lumière l'importance de mieux comprendre les mécanismes moléculaires du PDAC pour permettre le développement de nouvelles thérapies efficaces contre ce cancer mortel.

iii. Les caractéristiques moléculaires du PDAC

Le CP est caractérisé par la présence de mutations. Plus de 90% des cas possèdent une mutation sur l'oncogène Kras, lequel est considéré comme un oncogène « driver » essentiel pour le développement de la pathologie. D'autres mutations inactivatrices sur des gènes suppresseurs de tumeur sont retrouvées entre 50% et 90% des cas (**Tableau 2**). L'ensemble de ces altérations conduit à une prolifération incontrôlée et au développement de la pathologie.

Gènes	Fonction	Altération	Incidence	Réf.
Kras	Prolifération cellulaire <i>Oncogène</i>	Substitution dans l'exon 12 (G12D, G12V, G12R)	>90%	Wood et al. ⁷⁷
p16/CdknA	Régulation du cycle cellulaire <i>Suppresseur de tumeur</i>	Délétion homozygote Mutation non-sens Hyperméthylation du promoteur	90%	
TP53	Point de contrôle cellulaire <i>Suppresseur de tumeur</i>	Mutation non-sens	75%	
Smad4/Dpc4	Régulation de la voie TGFβ <i>Suppresseur de tumeur</i>	Délétion homozygote Mutation non-sens	50%	

Tableau 2 : Principales altérations génétiques retrouvées dans l'adénocarcinome pancréatique.

En plus de ces mutations caractéristiques, l'analyse de bases de données génétiques, montrent qu'environ 20% de gènes mutés chez les patients atteints de CP sont impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN, faisant de la DDR une des voies de signalisation les plus altérées dans ce cancer^{78,79}.

Les mécanismes qui contrôlent les modifications de la chromatine font également partie des voies les plus fréquemment altérées dans le PDAC⁸⁰. De nombreuses altérations dans l'organisation de la chromatine sont décrites dans le CP et seront développées dans la partie 1.III.b⁸¹.

Une grande hétérogénéité intra-tumorale et inter-individus est retrouvée chez des patients atteints de CP. Grâce à l'essor des techniques de séquençage à haut débit de l'ARNm, plusieurs études ont stratifié les tumeurs pancréatiques selon des caractéristiques épithéliales, immunogènes ou encore métaboliques^{80,82-86}. Ces grandes classifications sont résumées dans la **Figure 9**, les différents sous-types sont corrélés au pronostic.

Classique		Basal	Moffit <i>et al.</i> ⁷⁹
Exocrine	Classique		Quasi-mésenchymateux Collisson <i>et al.</i> ⁷⁸
ADEX	Progé-niteur	Immuno-génique	Squameux Bailey <i>et al.</i> ⁷⁶
Epithélium normal	Classique pur	Classique immun	"Basal-like" Puleo <i>et al.</i> ⁸⁰
Cholestero-génique	Mixte	Quiescent	Glycolytique Karasinska <i>et al.</i> ⁸¹

Figure 10 : Les différents sous-types de PDAC en fonction de leur signature transcriptomique. (Adapté de Thakur *et al.*)

iv. Le développement du CP

L'identification des cellules à l'origine du CP a longtemps été débattue. Grâce au développement de divers modèles murins. Il est aujourd'hui admis que les cellules acineuses et canalaire peuvent être à l'origine de ce cancer⁸⁷. Toutefois, les acini sont environ 100 fois plus sensibles à une transformation oncogénique par Kras^{G12D}⁸⁸. Par soucis de concision, seul le cas du développement du CP à partir des cellules acineuses sera abordé ci-dessous.

Comme mentionné précédemment, la métaplasie acino-canaire (MAC) est garante du maintien de l'homéostasie du compartiment exocrine du pancréas. Au cours d'une inflammation du pancréas (pancréatite) et en présence de la mutation oncogénique Kras^{G12D}, la MAC devient irréversible et est considérée comme une étape initiatrice de la carcinogénèse pancréatique. Elle se caractérise par une mise sous silence des gènes acinaires, une induction de gènes canalaire tels que la cytokératine 19 et par une augmentation de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans le développement du pancréas⁸⁹. La mutation Kras^{G12D} entraîne une activation de la voie EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), conduisant à la formation de lésions préneoplasiques de type PanIN-1 (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia). L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p16/Cdkn2A, l'accumulation de mutations supplémentaires (TP53,

Smad4/Dpc4) induit la progression vers des lésions de haut grade PanIN-2/PanIN-3 et le développement de l'adénocarcinome pancréatique in situ et métastatique^{89,90}. Ces différentes étapes s'accompagnent de modifications à la fois de la structure du tissu (métaplasie) et du microenvironnement qui devient fibrotique et immunosuppresseur (desmoplasie)⁹¹ (**Figure 10**).

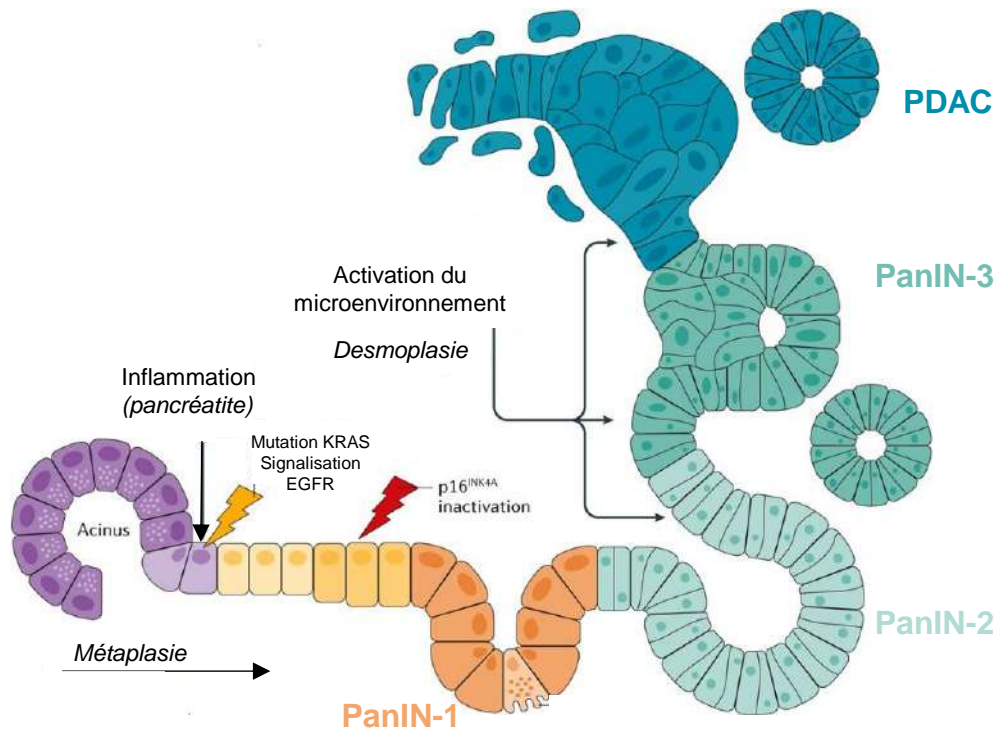


Figure 11 : Modèle linéaire de progression des acini en PanIN aboutissant à l'adénocarcinome pancréatique. Adapté de Storz 2017.

b. Les perturbations de l'organisation de la chromatine dans le CP

Depuis quelques années, de nombreuses études mettent en avant l'altération des modifications épigénétiques, des complexes de remodelage et de la réorganisation de la structure de la chromatine dans les étapes de la carcinogénèse pancréatique soulignant l'importance de l'organisation de la chromatine dans le développement des cancers.

i. Via la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus communément altéré dans les cancers⁹². Il est connu depuis les années 80 que les cellules tumorales présentent une hypométhylation globale de leur génome qui déstabilise les régions d'hétérochromatine et augmente l'instabilité génétique⁹³. Paradoxalement, une hyperméthylation très localisée au niveau des promoteurs de gènes, notamment les suppresseurs de tumeur, est décrite⁹⁴. Dans le CP, une augmentation de l'expression des méthyltransférases de l'ADN (ou DNMT pour DNA methyltransferase) est associée à un mauvais pronostic⁹⁵. En effet, l'analyse de tumeurs de pancréas réséquées révèle des aberrations dans les profils de méthylation caractérisés par une hypométhylation globale de l'ADN notamment au niveau de régions d'HC. Ces altérations entraînent une désorganisation de ces régions associées à une hyperméthylation localisée de gènes codant pour des suppresseurs de tumeur tels que p16/CDKN2A, favorisant ainsi la carcinogénèse⁹⁶⁻⁹⁸.

ii. Via les modifications post-traductionnelles des histones

L'implication des enzymes modificateuses d'histones dans la carcinogénèse pancréatique est illustrée par de nombreuses études. Shibata et al. observent une répression épigénétique transitoire des gènes impliqués dans l'identité acinaire (Ptf1a, Amylase, Mist) lors de la MAC. Toutefois, les auteurs ne s'intéressent pas aux acteurs responsables de cette inhibition⁹⁹. L'exemple des complexes répresseurs Polycomb 1 et 2 sera détaillé ci-dessous. Il est important de noter que d'autres régulateurs épigénétiques possèdent des fonctions dans ces processus ; les plus décrits sont regroupés dans la revue de Silverman et Chi⁹⁵.

Les complexes Polycomb PRC1 et PRC2 sont capables de réguler la MAC via le contrôle l'expression des gènes. D'une part, via RING1b, l'E3 ubiquitine ligase du complexe PRC1 responsable de l'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine K119 (H2AK119Ub) (*Chapitre 1 Partie 1.1.d.iii*). Les travaux de Benitz et al. mettent en évidence une surexpression de RING1b dans les cas de CP. De plus, ils démontrent que RING1b catalyse la mise sous silence épigénétique des gènes garants de l'identité acinaire tel que Ptf1a (Pancreatic Transcription Factor 1a). Ceci favorise le processus de MAC et de carcinogénèse pancréatique¹⁰⁰. Quelques années plus tard, le développement d'un modèle murin leur a permis de confirmer ces données en montrant qu'en présence de la mutation Kras^{G12D} (condition oncogénique), l'invalidation du gène Ring1b dans les acini prévient la MAC et le développement du CP via la persistance de l'expression de gènes acinaires. Ainsi, ces études soulignent le rôle pro-tumoral de RING1b et montrent que la régulation épigénétique via PRC1 est un prérequis essentiel lors de la carcinogénèse pancréatique¹⁰¹ (**Figure 13**).

D'autre part, les complexes PRC régulent la MAC via EZH2, la méthyltransférase d'histone du complexe PRC2 qui appose les marques répressives H3K27me3 et participe à la formation d'HCf lors du développement/différenciation cellulaire. EZH2 est surexprimée dans les cas de CP et est associée à une agressivité des tumeurs¹⁰². Plusieurs études révèlent un rôle d'EZH2 dépendant du contexte dans la carcinogénèse pancréatique (**Figure 13**). Par exemple, dans un contexte d'inflammation (pancréatite), Mallen-St Clair et al. démontrent que la surexpression transitoire d'EZH2 est nécessaire à la régénération du compartiment exocrine. EZH2 conduit à la répression transcriptionnelle de l'inhibiteur du cycle cellulaire p16/Ink4a entraînant ainsi une prolifération et une redifférenciation en acini. EZH2 permet, de ce fait, de limiter la persistance des lésions suite à une pancréatite. En revanche, dans un contexte à la fois inflammatoire (pancréatite) et oncogénique (via Kras^{G12D}), il a été démontré que EZH2 possède une activité pro-tumorale. En effet, EZH2 inhibe l'expression des microARN, mir128 et mir34a. Ces micro-ARN possèdent des propriétés anti-proliférative et anti-métastatique et sont sous exprimés dans les cas de CP. EZH2 induit leur répression transcriptionnelle via une hétérochromatinisation de leur promoteur^{103,104} (**Figure 13**). De plus, dans des modèles murins de CP exprimant l'oncogène muté Kras^{G12D}, une étude a prouvé que l'expression d'EZH2 favorise l'expression d'un facteur de transcription oncogénique NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells) par un mécanisme non décrit¹⁰⁵.

iii. Via le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF

Alonso-Curbelo et al. ont mis en évidence que la MAC (en condition oncogénique ou non) s'accompagne de variations drastiques de l'accessibilité de la chromatine, lesquelles se traduisent par une perte d'expression des gènes acinaires et par une induction des gènes canaux¹⁰⁶. Dans

cette étude, les auteurs ne s'intéressent pas aux mécanismes globaux de cette réorganisation mais plusieurs études évoquent l'implication du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF dans le CP. En effet, SWI/SNF fait partie des voies les plus altérées dans les cas de PDAC avec près de 14% de mutations inactivatrices des différentes protéines qui composent ce complexe⁸⁰. La sous unité ATPasique BRG1 (Brahma related gene 1) de SWI/SNF possède un rôle complexe qui dépend à la fois de la cellule à l'origine du CP (acini ou canal) mais également de l'étape de la carcinogénèse¹⁰⁷. En effet, l'équipe de H. Seno démontre que l'inactivation du gène Brg1 dans des acini adultes (porteurs du gène *Kras*^{G12D}) atténue la MAC via la protéine SOX9. BRG1 se fixe sur sa région promotrice, induit l'expression de cette protéine oncogénique connue pour favoriser la MAC. Cette étude montre que BRG1 est requis pour la formation et la persistance des lésions préneoplasiques de type PanIN (**Figure 11**). En revanche, l'inactivation du gène Brg1 dans des cellules canalaire (porteuses du gène *Kras*^{G12D}) sensibilise les cellules à la transformation oncogénique soulignant le rôle suppresseur de tumeur de BRG1 dans ce contexte¹⁰⁸. Enfin, la restauration de l'expression de BRG1 dans une tumeur pancréatique déjà établie induite à partir de cellules canalaire entraîne une augmentation de la tumorigénicité. Ce phénotype agressif s'établit via l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse, laquelle favorise la dissémination métastatique¹⁰⁹ (**Figure 11**). Le rôle ambivalent de BRG1 dépendant à la fois du type cellulaire et de l'étape de la carcinogénèse souligne la complexité du remodelage de la chromatine dans le développement de pathologie.

ARID1a (AT-Rich Interaction Domain 1a) est une sous-unité du complexe SWI/SNF. Elle permet son recrutement au niveau des promoteurs et garantit son bon fonctionnement¹¹⁰. ARID1a est la protéine la plus mutée du complexe SWI/SNF dans les cas de CP (6 à 10%). Sa perte d'expression et/ou mutation inactivatrice sont corrélées à un mauvais pronostic¹⁰⁷. Plusieurs études soulignent le rôle suppresseur de tumeur d'ARID1a indépendamment du type cellulaire à l'origine du CP. Il existe un autre type de lésions préneoplasiques, les néoplasmes mucineux papillaires intraductaux (IPMN pour Intraductal Papillary Mucinous Neoplasmes) qui ont pour origine les cellules canalaire du pancréas. Ces lésions peuvent conduire dans une moindre mesure au développement d'un CP¹¹¹. Dans le compartiment canalaire, Kimura et al. démontrent qu'ARID1a inhibe la formation d'IPMN et leur dégénérescence en CP. Comme pour BRG1, cette action passe par l'inhibition de la dédifférenciation des cellules pancréatiques canalaire via la régulation négative de l'expression de la protéine oncogénique SOX9¹¹² (**Figure 11**). Dans le compartiment acineux, le groupe de A.F. Hezel conclut qu'ARID1a est nécessaire à sa régénération via la MAC après une inflammation¹¹³. De même, en présence de l'oncogène *Kras*^{G12D}, ARID1a a pour rôle de limiter la MAC ainsi que l'apparition des lésions préneoplasiques PanIN et leur dégénérescence en CP. ARID1a facilite l'accessibilité à la machinerie de transcription au niveau des gènes spécifiques des acini et prévient ainsi une perte d'identité acinaire¹¹⁴ (**Figure 11**).

L'ensemble de ces données soutient l'idée que lors de la carcinogénèse pancréatique, les modifications épigénétiques et le remodelage de la chromatine sont des processus-clés aux actions pouvant être ambivalentes en fonction du contexte cellulaire.

iv. Via la modulation de l'organisation 3D du génome

A ce jour, très peu d'études se sont intéressées aux altérations de l'organisation 3D du génome dans l'établissement et la progression du CP. En 2021, Li et al. constatent que lors de l'étape initiatrice du CP, la mutation oncogénique *Kras*^{G12D} entraîne la mise en place d'un programme transcriptionnel via les contacts « enhancers »/promoteurs. En effet, la signalisation

Kras^{G12D} induit l'expression des facteurs de transcription JUN-B et FOS-L1. Ces derniers, en association avec d'autres facteurs de transcription spécifiques de la cellule à l'origine du cancer, verrouillent les contacts et participent à la carcinogénèse pancréatique¹¹⁵. Cependant, les auteurs n'ont pas réalisé à proprement parler d'étude de capture de conformation des chromosomes ; ils tirent leur conclusion à partir d'approches d'immunoprécipitation de chromatine.

Par la suite, deux groupes ont réalisé des expériences d'Hi-C sur des lignées cancéreuses pancréatiques de référence (Panc-1, Capan-1, BxPC3). Ren et al. mettent en évidence une différence d'organisation 3D du génome entre une lignée cellulaire cancéreuse primaire (Panc-1) et une lignée cellulaire cancéreuse issues d'une métastase hépatique (Capan-1) via une approche de capture de conformation des chromosomes « genome wide » (Hi-C). La réorganisation observée se traduit par un changement de compartiment A/B, la fusion, la formation de nouveaux TAD et une augmentation des contacts « enhancer » /promoteur. Ces modifications entraînent l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale et facilitent l'adaptation de la cellule métastatique à son nouvel environnement¹¹⁶. Ainsi, la reprogrammation 3D du génome participe à la mise place de l'invasion métastatique du CP (**Figure 11**). Ces résultats ont été confirmés, en partie, par un autre groupe qui a étudié l'impact des variations de structure (SV) sur l'organisation 3D du génome de lignées dérivées de CP (BxPC3 et Panc-1). Les SV contribuent à la carcinogénèse¹¹⁷. Dans ces lignées, les insertions et les délétions sont les principales SV, elles sont majoritairement localisées dans les régions intergéniques et introniques. Ces SV entraînent un changement de compartiment ($A \rightarrow B$ et $B \rightarrow A$), une perturbation des frontières des TAD et une augmentation des contacts « enhancer »/promoteur. Des délétions génomiques sont observées au niveau des gènes CdknA et Smad4/Dpc4. La délétion de ces régions entraîne une altération/fusion des TAD avoisinants, ce qui conduit respectivement à l'expression d'un microARN pro-tumoral (mir31HG) ou à des réarrangements très importants de chromosomes appelés chromothripsis¹¹⁸ (**Figure 11**).

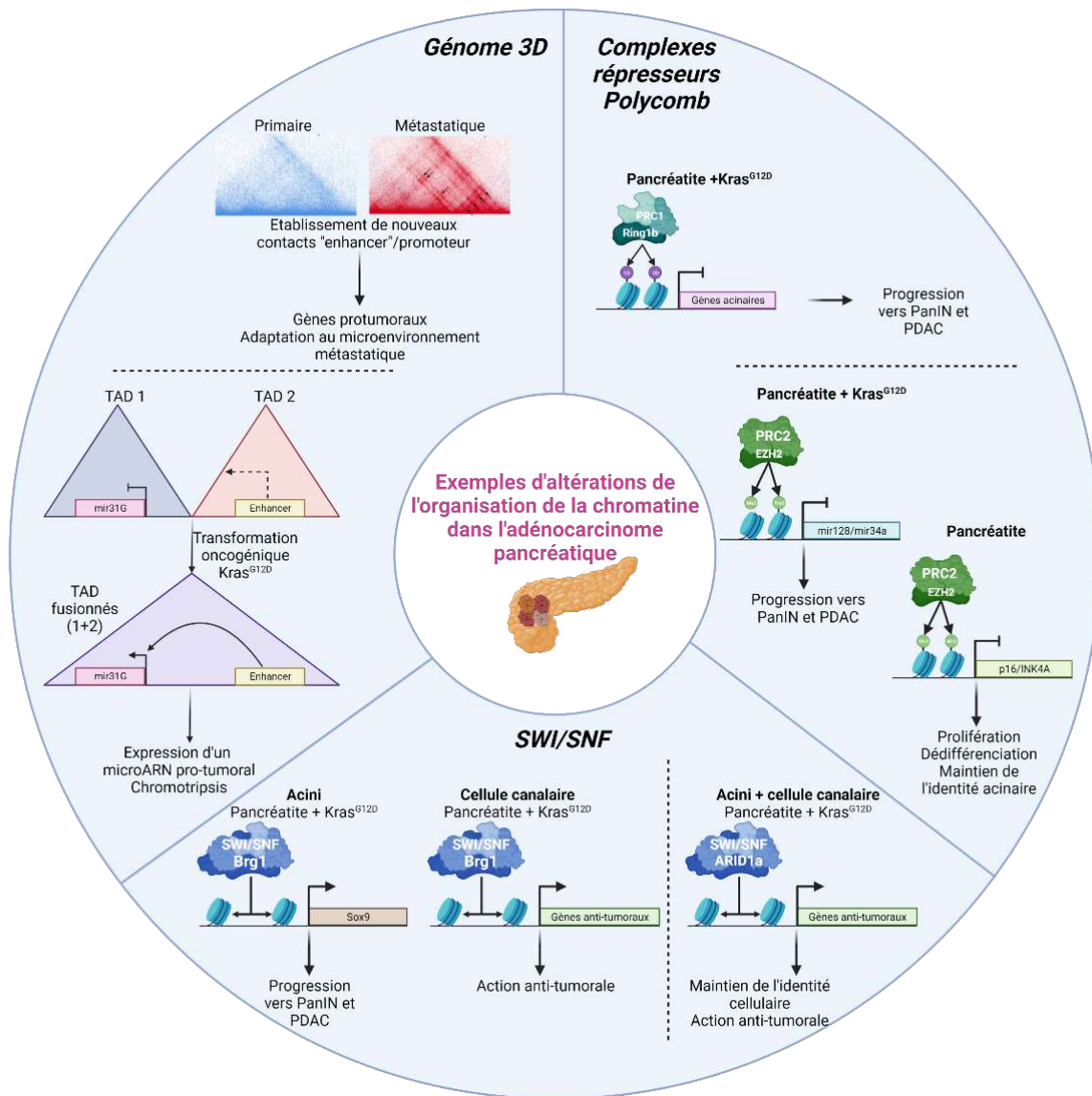


Figure 12 : Représentation schématique des principales altérations de l'organisation de la chromatine dans le CP.

Bien que pionnières dans l'analyse des altérations du génome 3D dans le CP, ces deux études sont réalisées sur des lignées cancéreuses pancréatiques de référence. Elles ne tiennent pas compte de la forte hétérogénéité retrouvée les tumeurs et ne décryptent pas les altérations lors de l'initiation de la carcinogénèse.

L'ensemble de ces études illustre l'importance de l'organisation spatiale de la chromatine au sein des noyaux. Elle est primordiale pour le bon déroulement de processus nucléaires physiologiques tels que la réplication de l'ADN, la transcription ou la réparation des dommages à l'ADN. De nombreuses données mettent en évidence que des altérations de cette organisation sont impliquées dans la carcinogénèse pancréatique.

Partie 2 : Les protéines à régions intrinsèquement désordonnées

Au cours de ces dernières années, les protéines à IDR (pour intrinsically disordered regions) ont émergé comme des actrices importantes de l'organisation de la chromatine via notamment des mécanismes de séparation de phase. De plus en plus d'études démontrent leur implication dans des pathologies.

I. Les protéines à IDR

En 1973, C. Anfinsen postule que la fonction d'une protéine est due à la structure tridimensionnelle qu'elle adopte, elle-même définie par sa séquence primaire en acides aminés ; on parle du paradigme « structure=fonction »¹¹⁹. La majorité des protéines s'organisent en structures tridimensionnelles bien définies. Cependant, depuis les deux dernières décennies, de nombreuses protéines sont décrites comme possédant des séquences protéiques qui n'adoptent pas de structure tertiaire. Selon une étude, ~40% des protéines possèdent des régions désordonnées bousculant ainsi le postulat d'Anfinsen¹²⁰.

a. Les caractéristiques des protéines à région intrinsèquement désordonnée

Les régions intrinsèquement désordonnées (IDR) sont des séquences de faible complexité enrichies en résidus basiques, chargés positivement, hydrophiles (lysine, arginine, histidine, sérine) et appauvries en résidus hydrophobes (leucine, alanine, valine, isoleucine...) qui ne forment pas de structure tertiaire. Les IDR peuvent représenter l'entièreté de la séquence, comme la protéine P27, ou des régions plus ou moins grandes (de quelques acides aminés à plusieurs centaines) comme par exemple la queue N-terminale des histones. Les protéines qui possèdent une ou plusieurs IDR sont appelées IDP pour « intrinsically disordered proteins »¹²¹.

La faible complexité de séquence des IDP leur permet de fournir des sites d'interactions multiples avec des protéines et/ou des acides nucléiques. Au contact de leur partenaire, certaines IDR adoptent une structure tridimensionnelle, on parle du concept de « disorder-to-order » via le couplage de l'interaction et de la structuration¹²² (**Figure 12**). Par exemple, la protéine P53 contient une IDR dans son domaine d'interaction avec MDM2. Cette IDR possède une prédisposition à former des structures hélicoïdales. Lorsque P53 interagit avec MDM2, l'IDR se stabilise et forme une hélice alpha amphiphile augmentant l'affinité d'interaction entre ces deux protéines¹²³.

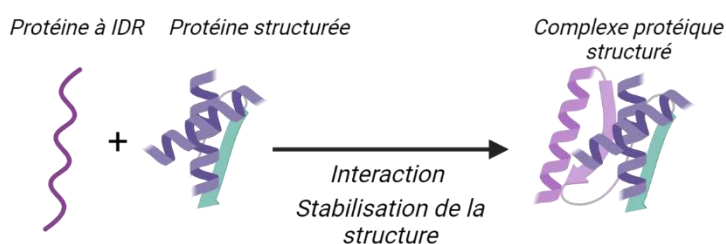


Figure 13 : Représentation schématique du concept du "disorder to order".

D'autres IDR restent sous forme désordonnée après liaison avec leur partenaire, elles forment des complexes « fuzzy »¹²². Ces IDR apportent à la structure macromoléculaire de la flexibilité et de la dynamique. Ainsi grâce aux IDP, les complexes protéiques peuvent exister sous différents états structurels dynamiques et interchangeables définies par le terme d'ensemble conformationnel^{124,125} (**Figure 13**). Ce continuum de structure augmente les capacités d'interaction et module la formation de complexe protéique tertiaire.

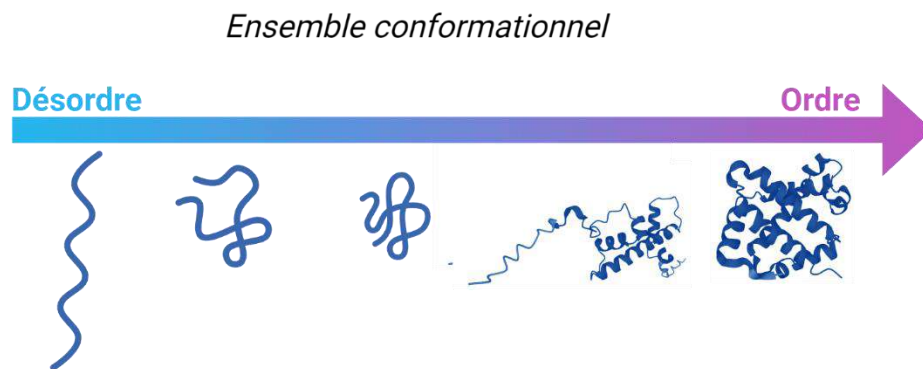


Figure 14 : Illustration du concept d'ensemble conformationnel des protéines à IDR.

Les protéines à IDR sont présentes dans tout le règne du vivant et chez les virus. Elles présentent une évolution rapide. Les IDR hautement conservées au cours de l'évolution sont impliquées dans la régulation de la transcription et/ou l'interaction avec les acides nucléiques¹²¹.

Plusieurs approches sont possibles pour identifier des régions intrinsèquement désordonnées (**Tableau 3**). Tout d'abord, des outils de prédiction bioinformatiques sont capables d'estimer le « désordre » d'une région en analysant la composition et les propriétés biochimiques d'une séquence peptidique. Expérimentalement, il existe trois techniques principales pour identifier les protéines à IDR : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour Small Angle X-rays Scattering) et le transfert d'énergie entre molécules uniques fluorescentes (smFRET pour single-molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer). Le principe de ces techniques est résumé dans le Tableau 3. D'autres méthodes sont également utilisées. Elles sont regroupées dans une revue de référence¹²⁶. Il existe également des bases de données en ligne (D²P², IDEAL, DisProt) qui collectent l'ensemble des régions et des protéines validées expérimentalement.

	Nom	Principe	Sites web Références
Prédiction	IUPred	Energie totale d'interaction	Site web 127
	PONDR	Composition en acides aminés	Site web 128
	PrDOS		Site web 129
	ESpritz	Composition en acides aminés + machine learning	Site web 130
Technique	RMN	Spectroscopie basée sur les propriétés magnétiques des atomes des molécules	131
	SAXS	Analyse basée sur l'intensité des rayons X diffusés par les molécules	132
	smFRET	Analyse basée sur le transfert de fluorescence au sein d'une même molécule pour évaluer son repliement	133
Base de données	D ² P ²	Démonstrations/preuves expérimentales + compilation de neuf sites de prédiction	Site web 134
	IDEAL	Démonstrations/preuves expérimentales + spécialisés dans le concept de « disorder to order »	Site web 135
	DisProt	Démonstrations/preuves expérimentales + fonctions biologiques	Site web 136

Tableau 3 : Principaux outils expérimentaux et bioinformatiques pour l'identification de protéines à régions intrinsèquement désordonnées.

b. Les classes fonctionnelles des protéines à IDR

Les protéines à IDR sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques (Chapitre 1 Partie 2. II.). Ces fonctions sont regroupées en 6 classes décrites ci-dessous¹²¹ (**Figure 14**).

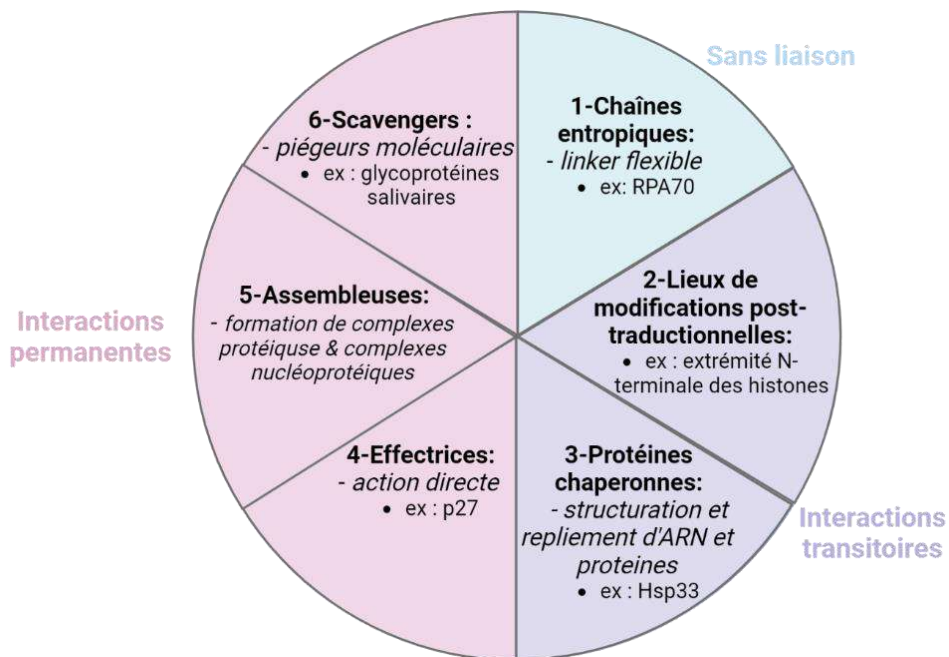


Figure 15 : Diagramme circulaire représentant les classes fonctionnelles des protéines à IDR.

i. Les chaînes entropiques

Les chaînes entropiques (ou chaînes désordonnées) regroupent les IDR qui tirent bénéfice de leur absence de conformation en jouant le rôle de « linker » flexible entre deux domaines protéiques structurés ou encore le rôle d'« espaceur » pour réguler la distance entre deux régions de la protéine. Par exemple, la protéine RPA70 (Replication Protein A 70) possède trois « linkers » désordonnés qui relient ces quatre domaines globulaires. Ces « linkers » sont impliqués dans l'interaction de RPA70 avec l'ADN et contrôlent la fonctionnalité de RPA70¹³⁷.

ii. Les sites de modifications post-traductionnelles

Les IDR sont des lieux préférentiels de modifications post-traductionnelles. De par leur absence de structure, les IDR possèdent une flexibilité et une accessibilité qui facilitent non seulement les interactions transitoires spécifiques avec les enzymes responsables de PTM mais également la reconnaissance de ces modifications par les protéines effectrices¹³⁸. De plus, les IDR sont enrichies en résidus lysine, arginine, et histidine connus pour être des cibles de PTM. L'exemple le plus documenté est celui de la queue N-terminale des histones (*Chapitre 1 Partie 1.1.a*). Elle est la cible de nombreuses PTM qui jouent sur l'homéostasie de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes.

iii. Les chaperonnes

Les protéines chaperonnes facilitent la structuration d'ARN ou de protéines pour assurer leur fonctionnalité. Plus de la moitié des protéines chaperonnes d'ARN et plus d'un tiers des protéines chaperonnes de protéines possèdent une ou plusieurs IDR. Toujours grâce à leur flexibilité, les IDR s'adaptent à de nombreux partenaires. De plus, les régions désordonnées permettent des interactions macromoléculaires rapides qui facilitent le repliement et l'organisation tertiaire des protéines et des ARN¹²¹.

iv. Les effectrices

Comme décrit précédemment, les protéines à IDR peuvent adopter une structure via leur interaction avec un partenaire (« disorder to order »). Ces deux paramètres (interaction et structuration) entraînent une modification de son activité ou de l'activité de son interactant. Par exemple, la protéine P27 (une kinase inactivatrice des cyclines) adopte une structure tertiaire lorsqu'elle interagit avec son partenaire CDKN2A. Leur interaction et la structuration de P27 déclenche par ce biais son activité inhibitrice¹³⁹.

v. Les assembleuses

Les IDR ont la capacité de rassembler des partenaires et de participer à la formation de complexe protéiques et nucléo/protéiques tels que la chromatine¹³⁸. Deux modèles de participation des IDR à ce processus sont admis. Un premier selon lequel les IDR aident à stabiliser les complexes qu'elles forment ; un deuxième dans lequel elles servent d'échafaudage pour réguler spatio-temporellement l'assemblage du complexe protéique¹²¹.

vi. Les « scavengers » ou piègeurs moléculaires

Les protéines à IDR peuvent servir de piège moléculaire. Grâce à leur capacité d'interaction multivalente, certaines IDP peuvent stocker et neutraliser des petits interactants. C'est le cas pour les glycoprotéines salivaires qui retiennent et séquestrent les tanins dans le tube digestif¹²¹.

c. Une propriété biophysique remarquable des protéines à IDR : la séparation de phase

Les protéines à IDR possèdent une propriété biophysique notable : elles sont capables d'induire une séparation de phase (SP). La SP est un processus par lequel une solution de macromolécules (protéines ou acides nucléiques) homogène se sépare spontanément en deux phases distinctes : une phase dense fortement enrichie en un ensemble de protéines données et une phase diluée. La forte concentration en protéine de la phase dense lui permet de fonctionner comme un compartiment à part entière sans nécessité d'une barrière physique du reste de la cellule : on parle de condensat biomoléculaire¹⁴⁰. En fonction des protéines présentes, la phase dense se comporte comme un liquide ou comme un hydrogel¹⁴¹. Ce processus est régi par les lois thermodynamiques¹⁴⁰.

Les IDR induisent une SP grâce à leur séquence de faible complexité, enrichies en acides aminés chargés et non structurée qui permet la formation d'interactions faibles et multivalentes avec des protéines et/ou des acides nucléiques. Les liaisons qui régissent la SP sont non covalentes faibles de type électrostatiques (charge/charge ; π - π ; π -cation)^{142,143}. Par conséquent, les condensats formés par SP sont sensibles aux inhibiteurs d'interactions faibles tel que le 1,6-hexanediol. De plus, les condensats biomoléculaires formés via la SP sont caractérisés par les propriétés biophysiques suivantes (**Figure 15**) :

- ✚ Leur taille dépend de la concentration de la protéine à l'origine de la SP.
- ✚ Leur formation est régie par les PTM et la valence des protéines qui les composent.
- ✚ Des facteurs extérieurs (température, pH, pression...) modulent leur formation.
- ✚ Leur composition diffère du nucléoplasme environnant.
- ✚ Leur cinétique d'assemblage et de dissolution est très dynamique.
- ✚ Des échanges rapides entre le condensat et le nucléoplasme s'effectuent.

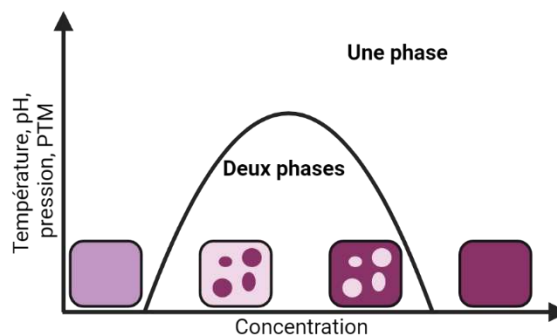


Figure 16 : Représentation schématique d'un diagramme de phase.

Ces condensats présentent des fonctionnalités qui permettent de réguler l'environnement biochimique de la cellule. Tout d'abord, ils augmentent la concentration locale en protéine donnée, augmentant ainsi la cinétique de réaction biochimique. Ils favorisent également la spécificité de réaction en regroupant des acteurs impliqués dans une même fonction biologique. Ils ont la capacité de séquestrer des protéines du reste du nucléoplasme pour inhiber leur action. Enfin, grâce à leur dynamique, ils assurent une modulation très rapide des processus biochimiques via leur assemblage/dissolution¹⁴⁰. La première étude de SP remonte à 2012 quand Li et al. démontrent que le complexe protéique néphrine/NCK/N-WASP (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1/Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) induit la formation d'un condensat biomoléculaire fonctionnel par SP via des interactions multivalentes entre les régions de faible complexité des protéines NCK et N-WASP. La formation de ce condensat est contrôlée par le statut de phosphorylation de l'IDR de la néphrine, ce qui souligne l'importance des PTM dans la régulation de la SP¹⁴⁴.

II. Les fonctions biologiques nucléaires des protéines à IDR via la séparation de phase

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont mis en évidence des rôles fonctionnels de la SP et des condensats biomoléculaires dans les processus physiologiques. Des altérations de ce phénomène sont de plus en plus décrites dans certaines pathologies comme les maladies neurodégénératives et les cancers. Par soucis de concision, seules les grandes fonctions physiologiques nucléaires seront décrites dans le prochain paragraphe. Les rôles cytoplasmiques des IDR sont passés en revue dans les références ^{122,145}.

a. Les fonctions physiologiques des protéines à IDR via la séparation de phase

i. La formation des corps nucléaires

Dans le noyau, le nucléole, les corps de Cajal ou encore les « paraspeckles » sont des compartiments non délimités par des membranes. Ces corps nucléaires sont définis par leur capacité à regrouper des protéines et des acides nucléiques impliqués dans des fonctions précises comme la maturation d'ARN, la réparation des dommages à l'ADN ou l'induction de l'apoptose. La formation de ces compartiments nucléaires passe, entre autre, par le processus de SP grâce à la présence de protéines à IDR. Ils sont induits à partir d'une certaine concentration. Leur taille dépend de la concentration en protéine, ils sont dynamiques et peuvent fusionner entre eux¹⁴⁰. Par exemple, la SP est le moteur principal de formation du nucléole. Les protéines nucléolaires que sont fibrillarine et la nucléophosmine possèdent plusieurs IDR dans leur séquence. En condition de transcription active d'ARN ribosomiques et de concentration suffisante en fibrillarine et nucléophosmine, ces trois composés interagissent de façon multivalente et induisent une SP liquide-liquide. Par la suite, d'autres protéines nucléolaires à IDR rejoignent cette phase dense jusqu'à aboutir à la formation d'un nucléole¹⁴⁶. Cette compartimentalisation permet de regrouper les acteurs de la maturation des ARN ribosomiques et de faciliter la production de ribosomes fonctionnels.

ii. L'organisation du génome

Comme mentionné précédemment, la formation de domaines de chromatine peut être contrôlée par un mécanisme biophysique de SP^{18,19}. Par exemple, les régions d'HCC peuvent être initiées par ce processus. Les groupes de G. Karpen¹⁹ et de G.J. Narlikar¹⁸ relatent que les orthologues de HP1 α chez les Mammifères et la Drosophile sont capables d'induire une SP via la phosphorylation de l'IDR d'HP1. Cette induction de SP permet le recrutement, l'accumulation et la séquestration des acteurs impliqués dans l'homéostasie de l'HC (**Figure 16**). Cependant, les travaux de F. Erdel chez la Souris sont en désaccord avec les études précédentes ; ils proposent que les capacités de la forme murine d'HP1 d'induire de la SP sont limitées^{147,148}.

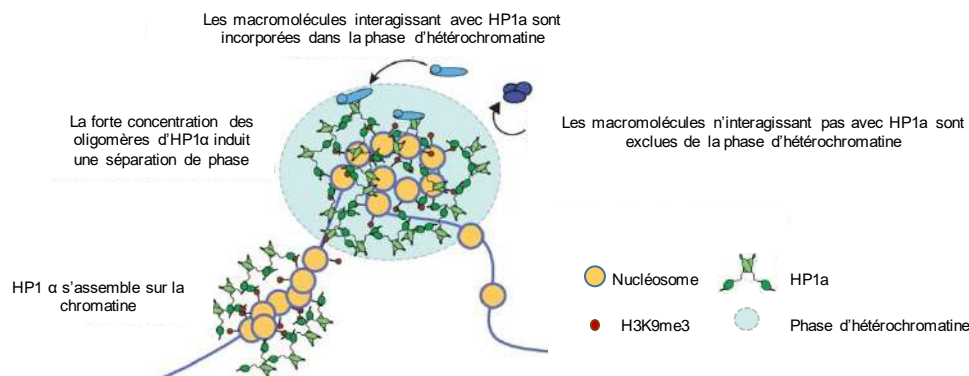


Figure 17 : Modèle schématique de la formation d'hétérochromatine via la séparation de phase. Adapté de Larson et al.

A ce jour, Erdel et Rippe proposent que deux mécanismes non-exclusifs de SP soient à l'origine de la formation de sous-ensemble de chromatine : la SP liquide-liquide (LLPS) et la SP polymère-polymère (PPPS) (**Figure 17**). Ces deux processus sont réalisés par des protéines à IDR.

Comme pour la formation des corps nucléaires, des protéines associées à la chromatine (ex : HP1 α) peuvent induire une LLPS grâce à leur capacité d'interactions électrostatiques multivalentes. Ceci résulte en la formation de gouttelettes liquides enrichies en protéines spécifiques qui peuvent favoriser ou inhiber des réactions biochimiques. Par conséquent, la composition de la phase dense diffère de celle du nucléoplasme. La phase dense reste stable même en l'absence de la composante chromatine. La formation de condensats de chromatine par LLPS dépend de la concentration des protéines les composant. Plus la concentration augmente, plus le condensat de chromatine est grand. Par conséquent la région de chromatine contenue dans le condensat varie (plus compacte ou région plus grande) pour s'ajuster à la taille de la gouttelette.

La PPPS est induite par la fixation de protéines de pontage (bridging) sur la chromatine. Ceci induit le rapprochement physique de la chromatine formant un réseau de chromatine. La composition au sein du compartiment ne diffère pas de celle du nucléoplasme. La stabilité du réseau dépend de la présence de chromatine. Ce type de condensat ne dépend pas de la concentration des protéines de pontage, si leur concentration augmente, la taille n'observera aucun changement ; le domaine et l'état de compaction ne seront pas affectés par ces variations de concentration¹⁴⁹.

La LLPS et la PPPS peuvent promouvoir la formation de sous-ensembles chromatiniens bien que reposant sur des propriétés moléculaires différentes. Il est encore compliqué de

distinguer, via des approches expérimentales, par lequel de ces mécanismes sont régis les sous-ensembles chromatinien. Cependant, ces deux types de SP peuvent être induits par des protéines à IDR et renforcent l'importance de ce type de protéine dans l'organisation nucléaire.

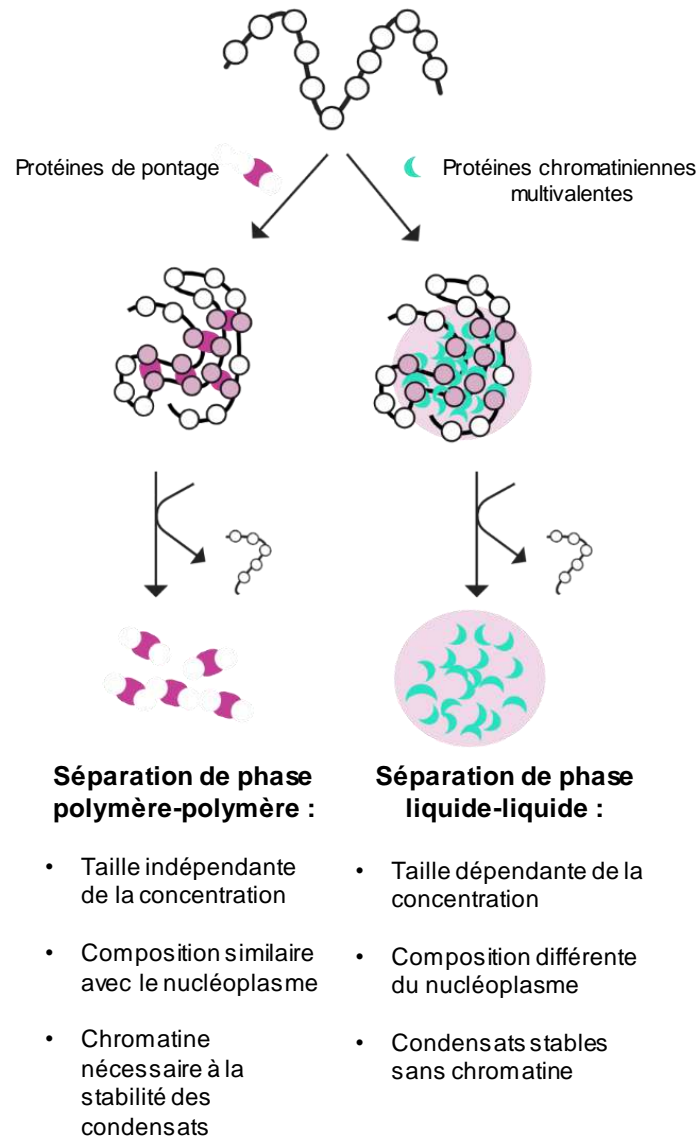


Figure 18 : Modèle schématique de formation de compartiments sous chromatinien par séparation de phase. (Adapté de Erdel et Rippe¹⁴⁹)

De plus, outre le modèle de « loop extrusion », il est proposé que la formation/réorganisation des TAD requiert un processus de SP¹⁵⁰. Une étude récente démontre que la réorganisation des TAD observée lors de la reprogrammation de cellules pluripotentes murines est, en partie, due à la capacité du facteur de transcription OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) d'induire une SP via son IDR¹⁵¹.

iii. La régulation de la transcription

De plus en plus d'études reportent l'importance de la SP induite par IDP dans la régulation

de la transcription¹⁵². Les IDP peuvent réguler la transcription via la formation de condensats transcriptionnels (*Chapitre 1 Partie 1.II.b*). Une étude pionnière de l'équipe de R. Young a démontré que les co-activateurs de l'ARN polymérase II, MED1 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1) et BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) induisent la formation de condensats transcriptionnels au niveau de « super-enhancers » via la SP¹⁵³ (**Figure 18**). La condensation de MED1 et BRD4 entraîne le recrutement des acteurs essentiels de la transcription. Les condensats ainsi formés répondent aux propriétés de SP : ils dépendent de la concentration de MED1 et BRD4, sont hautement dynamiques et sont sensibles à l'1,6-hexanediol ainsi qu'aux variations de pH. Les auteurs ont identifié l'IDR de MED1 comme responsable de l'induction de la SP et plus particulièrement l'importance des résidus sérine dans ce processus. In cellulo, l'induction de l'IDR seule de MED1 est capable de former les condensats transcriptionnels au niveau des « super-enhancers ». En revanche, l'IDR muté sur les résidus sérines de MED1 n'induit pas de SP soulignant la nécessité de cet acide aminé. Cette étude relie pour la première fois la régulation de la transcription, l'organisation 3D du génome et le processus de SP.

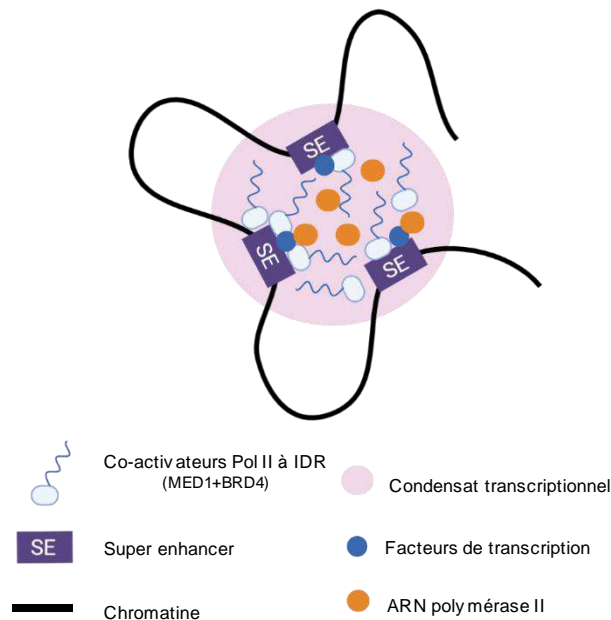


Figure 19 : Représentation schématique d'un condensat transcriptionnel formé via séparation de phase. (Adapté de Sabari et al.¹⁵³)

Plus tard, Lu et al. ont également mis en évidence un lien entre transcription et SP. Ils ont démontré que le co-régulateur transcriptionnel TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif) est capable grâce à différents domaines IDR, d'induire in vitro et in cellulo des condensats via SP. Ces condensats répondent aux différentes propriétés de la SP et sont enrichis en protéines impliquées dans la transcription comme l'ARN polymérase II, ses co-activateurs MED1 et BRD4 et en facteur de transcription (TEAD4 (TEA domain transcription factor 4)). La capacité d'induction de SP de TAZ est contrôlée par son état de phosphorylation. La déplétion du domaine responsable de la SP de TAZ conduit à la disparition des condensats transcriptionnels ainsi qu'à une altération du profil d'expression des gènes¹⁵⁴.

iv. La régulation des mécanismes de réparation de l'ADN

Brièvement abordée en partie 1.2.c., la SP est un processus qui garantit l'efficacité de réparation de dommages à l'ADN. Les DSB sont reconnues par les protéines PARP. Celles-ci ajoutent des résidus PAR (pour poly(ADP)-ribose) sur elles-mêmes, sur des protéines impliquées dans la réparation et sur les histones situées aux extrémités de la cassure. Il s'agit du processus de parylation. Ces motifs PAR sont très chargés négativement et recrutent les protéines à IDR FUS, EWS et TAF15 (protéines FET) via des interactions électrostatiques multivalentes¹⁵⁵. Grâce à leur IDR, ces protéines induisent la formation de gouttelettes via SP. Cela permet le recrutement, la concentration et la compartimentalisation des acteurs de la DDR assurant l'efficacité de réparation des DSB⁵⁷ (**Figure 19**). Du reste, les gouttelettes induites sont dynamiquement régulées par l'état de phosphorylation de FUS¹⁵⁵.

D'autres acteurs en aval de la signalisation de la cassure sont tout autant capables d'induire une SP. C'est le cas de la protéine 53BP1 (p53 binding protein 1) qui possède à son extrémité C-terminale une région enrichie en acides aminés impliqués dans la SP. 53BP1 est premièrement recrutée au niveau des cassures via des interactions protéine/protéine spécifiques, puis s'oligomérise pour induire une SP (**Figure 19**). La formation de condensats de 53BP1 entraîne le recrutement et l'activation de P53 pour permettre l'activation des points de contrôle de réparation suite à la cassure. Lorsque la SP induite par 53BP1 est inhibée, une déficience de l'activation de P53 et une réparation altérée des dommages de l'ADN sont observées¹⁵⁶.

De façon indirecte, la SP est également importante pour la réparation des cassures dans l'HC. Pour être réparées, ces DSB sont relocalisées hors de l'HC dans un contexte chromatinien plus relâché et accessible aux acteurs de la réparation. La relocalisation s'effectue grâce aux réseaux nucléaires d'actine-F et de myosine et dépend du complexe ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3). L'assemblage d'ARP2/3 et, par conséquent, la nucléation des filaments nucléaires d'actine sont contrôlés par la SP, illustrant une fois de plus le rôle crucial de la SP dans la réparation des dommages à l'ADN^{53,54,57,157} (**Figure 19**).

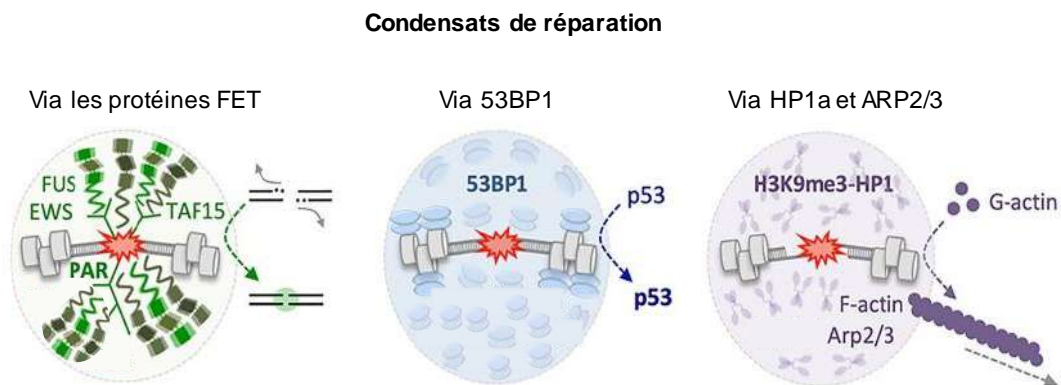


Figure 20 : Représentation schématique des différents condensats de réparation observés lors de cassures à l'ADN. (Adapté de Spegg et Altmeyer⁵⁷)

b. Les protéines à IDR et pathologies

Les protéines à IDR sont impliquées dans la régulation de processus biologiques-clés. De ce fait, leur dysfonctionnement est retrouvé dans des pathologies comme les cancers et les maladies neurodégénératives. L'altération des protéines à IDR affecte le mécanisme de SP dont le rôle pathologique est de plus en plus décrit.

i. Les altérations des protéines à IDR dans les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives (MND) sont caractérisées, entre autre, par une inclusion d'agrégats de protéines mal conformées au sein des neurones qui conduit à leur perte de fonction progressive et à leur mort. Le mauvais repliement et l'agrégation des protéines à IDR sont particulièrement retrouvés dans ce type de pathologies¹⁵⁸. C'est le cas pour les synucléinopathies. Il s'agit d'un groupe de maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson (PD pour Parkinson Disease), démence à corps de Lewy, atrophie multisystématisée) caractérisé par la présence d'agrégats fibrillaires d' α -synucléine dans le cytoplasme d'une catégorie de neurones et de cellules gliales. L' α -synucléine est le prototype d'une IDP, elle contient une IDR dans sa partie C-terminale et son ensemble conformationnel dépend de l'environnement. En fonction des conditions, la protéine change d'état structural et se bloque dans un certain état. Dans les cas de maladie de Parkinson, un fort stress oxydatif est observé¹⁵⁸. Dans ces conditions, l' α -synucléine est bloquée sous sa forme fibrillaire et entraîne la formation d'agrégat (**Figure 20**). Il a récemment été démontré que l' α -synucléine conduit à la formation de gouttelettes liquides via SP et que cette SP précède la formation d'agrégats. De plus, des mutations retrouvées chez les patients atteints de PD augmentent la capacité de SP et accélèrent l'agrégation de la protéine¹⁵⁹. Leur accumulation dans ces agrégats conduit à la mort des neurones^{160,161}.

La maladie d'Alzheimer se caractérise, elle aussi, par la présence d'agrégats protéiques, notamment de la protéine tau. Cette protéine ne possède pas de structure 3D stable, elle est considérée comme entièrement désordonnée. Elle est le lieu de nombreuses PTM et des formes mutées sont décrites dans la maladie d'Alzheimer. Dans des conditions encore mal définies, des modifications de ses PTM conduisent à son agrégation sous forme d'enchevêtrement fibrillaire. Ces amas entraînent une neurotoxicité et la mort cellulaire¹⁶². Comme pour l' α -synucléine, Kanaan et al. reportent que tau induit la formation de gouttelettes liquides via la SP en conditions physiologiques. Les auteurs démontrent ensuite que des formes mutées ou hyperphosphorylées (les deux retrouvées chez les patients) augmentent les capacités de formation de gouttelettes de la protéine (**Figure 20**). Cette SP augmentée conduit à la formation d'agrégats pathogéniques de la protéine tau¹⁶³.

Dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA ou maladie de Charcot), la protéine FUS est mutée dans sa partie intrinsèquement désordonnée. Comme précédemment mentionné (*Chapitre Partie 2.II.a.iv*), FUS induit la formation de gouttelettes via SP. Patel et al. mettent en évidence qu'au cours du vieillissement, ces compartiments liquides induits par FUS tendent à changer de nature et devenir des agrégats solides fibreux (**Figure 20**). Chez les patients atteints de SLA, ce changement d'état est accéléré par les mutations de FUS¹⁶⁴.

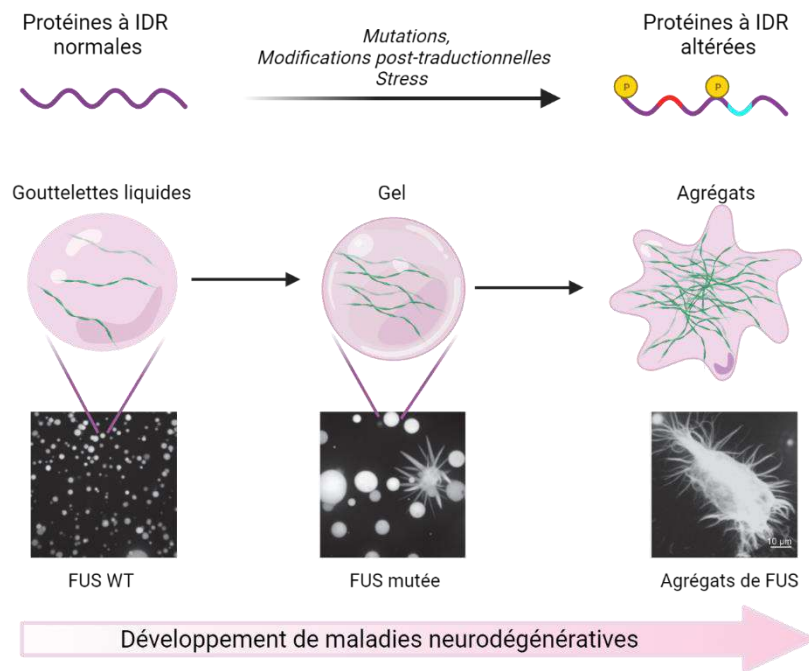


Figure 21 : Modèle de l'impact des altérations des protéines à IDR sur le développement de maladies neurodégénératives. (Inspirée de Patel et al.¹⁶⁴ et Zbinden et al.¹⁶⁵)

L'ensemble de ces données souligne le rôle-clé des protéines à IDR dans les MND. Leurs altérations (mutations, fusion...) peuvent conduire à des phénomènes de SP aberrants entraînant la formation d'agrégats de protéines, au centre du développement de bon nombre de ces maladies neurodégénératives¹⁶⁵.

ii. Les altérations des protéines à IDR dans les cancers

De plus en plus d'études s'intéressent aux fonctions des protéines à IDR et à la SP dans le processus de carcinogénèse¹⁴³. Par exemple, SPOP (Speckles-Type POZ Protein) est une protéine adaptatrice d'E3 ubiquitine ligase nucléaire impliquée dans la dégradation d'oncogène (entre autres c-MYC et PTEN)¹⁶⁶. Les régions d'interaction avec ses substrats sont localisées dans des IDR. De plus, SPOP est capable de s'oligomériser. DAXX (Dead domain associated protein) est une protéine-substrat de SPOP, ils interagissent par des interactions multivalentes faibles. Bouchard, Otero et al. ont démontré que leur interaction entraîne la formation de gouttelettes via la SP transmise à la fois par les interactions multivalentes faibles entre SPOP et DAXX et par l'oligomérisation de SPOP. Ces gouttelettes sont fonctionnelles et regroupent les acteurs nécessaires à l'ubiquitination de DAXX. Par ailleurs, les auteurs soulignent que les mutations de SPOP dans le domaine d'interaction avec ses substrats sont communément retrouvées dans les cancers de la prostate (entre 6-15% selon les cohortes¹⁶⁷) et du sein (environ 16%¹⁶⁸). Ces mutations perturbent la formation des gouttelettes SPOP/DAXX et conduisent à l'accumulation d'oncogènes¹⁶⁹.

Dans les cancers, notamment les sarcomes et les leucémies, les gènes codant pour les protéines FET (FUS/EWS/TAF15) présentent fréquemment des translocations (de quelques pourcents à plus de 85% selon le type de translocations) qui affectent particulièrement leurs régions intrinsèquement désordonnées¹⁷⁰. Ces régions sont impliquées dans la formation des condensats de réparation des cassures et dans la reconnaissance des motifs de phosphorylation.

Altmeyer et al. proposent que cette absence de SP entraîne une moins bonne reconnaissance et réparation des cassures qui favorise par conséquent l'instabilité génétique des cancers concernés¹⁵⁵.

Des translocations de la protéine EWS (Ewing Sarcoma) sont également décrites chez des patients atteints de sarcome d'Ewing. L'une des plus caractérisées résulte de la fusion entre le facteur de transcription FLI1 (Friend leukemia integration 1 transcription factor) et l'IDR N-terminale de la protéine EWS¹⁷¹. La protéine de fusion résultante EWS-FLI1 est oncogénique et est souvent la seule altération génétique retrouvée dans ce sarcome. Boulay et al. ont mis en évidence le rôle fonctionnel de cette translocation. EWS-FLI1 se lie avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et le recrute sur des répétitions GGAA_(n) présentes au niveau d'« enhancer ». Sur ces régions, l'IDR d'EWS de la protéine fusion EWS-FLI1 entraîne une SP qui permet l'activation de l'« enhancer » et conduit à l'expression de gènes oncogéniques impliqués dans le développement du sarcome d'Ewing¹⁷² (**Figure 21**).

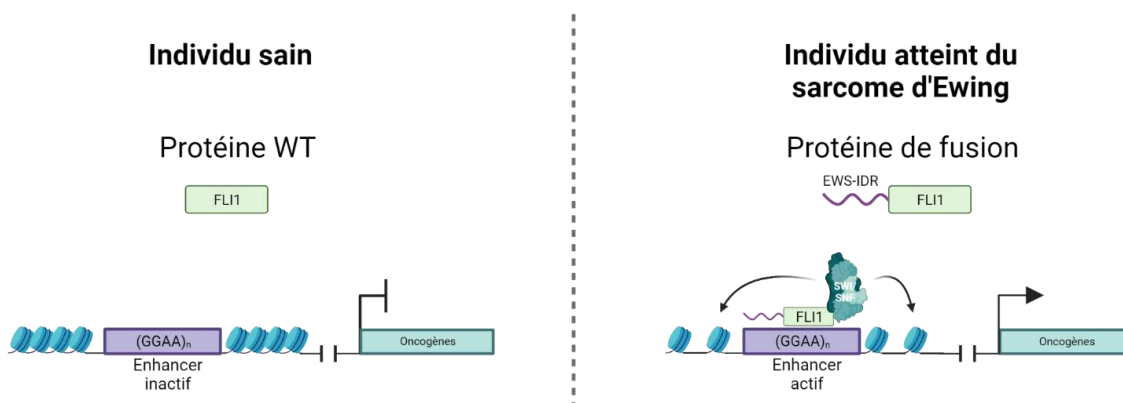


Figure 22 : Représentation schématique de l'implication de la protéine de fusion EWS-FLI1 dans la carcinogénèse.

Enfin, une étude récente met en évidence pour la première fois le lien entre SP, organisation 3D du génome et carcinogénèse. De nombreux cancers sont caractérisés par la fusion entre un gène codant pour une IDR et une protéine interagissant avec la chromatine. Dans les hémopathies malignes humaines, la translocation du gène codant pour l'IDR de la nucléoporine NUP98 et le facteur de transcription HOXA9 est retrouvée de façon récurrente (quelques pourcents à 35% selon les cohortes étudiées)¹⁷³. Ahn et al. démontrent que l'expression de la protéine de fusion NUP98_{IDR}/HOXA9 induit la formation de gouttelettes via SP et qu'elle est suffisante pour induire la transformation oncogénique de cellules hématopoïétiques saines. La SP induite augmente l'interaction de NUP98_{IDR}/HOXA9 avec la chromatine au niveau de « super-enhancer » et active un réseau transcriptionnel oncogénique. De plus, les auteurs mettent en évidence que la SP induite par l'IDR de NUP98 dans la protéine de fusion NUP98_{IDR}/HOXA9 entraîne la formation de boucle de chromatine (« enhancer »/promoteur) de manière indépendante de CTCF¹⁷⁴. Cette étude est la première preuve de concept du lien entre translocation oncogénique, IDR, SP et organisation 3D du génome.

La compréhension des protéines à IDR et des condensats biomoléculaires est primordiale pour apporter de nouvelles connaissances sur le développement de certaines maladies. Grâce à leur multitude de fonctions et leur implication dans des pathologies, les protéines à IDR émergent

comme des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Malgré leur abondance dans le génome humain, aucune drogue ciblant les protéines à IDR n'est, à ce jour, approuvée par les autorités sanitaires. En effet, l'absence de structure 3D complexifie le design de potentiels composés ciblant les IDR. De plus, les IDP sont difficiles à cibler car l'interaction avec leur partenaire se fait via des interactions faibles et transitoires¹⁶⁰. Néanmoins, de nombreux essais pré-cliniques et cliniques ciblant ces protéines via des composés chimiques, anticorps intra-cellulaires ou immunothérapies sont en cours de développement¹⁶⁰ et certaines start-up se spécialisent dans le ciblage des condensats biomoléculaires¹⁷⁵.

Partie 3 : L'E3 ubiquitine ligase TRIP12

I. Des généralités sur l'E3 ubiquitine ligase TRIP12

a. La découverte

L'ADNc de TRIP12 (Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12) a été identifié initialement en 1994 dans une lignée cellulaire humaine de leucémie myéloïde aiguë KG-1. Cette étude avait pour objectif d'identifier de nouveaux gènes humains et ne comprenait pas d'étude fonctionnelle. Une homologie partielle de séquence fût retrouvée chez *Saccharomyces cerevisiae* avec la protéine UFD4 (Ubiquitin Fusion Degradation 4). UFD4 n'étant pas encore identifiée dans la base de données GenBank, les auteurs nommèrent arbitrairement la séquence de l'ADNc de TRIP12, KIAA0045 (numéro d'accèsion GenBank : D28476)¹⁷⁶. Un an plus tard, dans une étude qui visait à identifier des partenaires du récepteur à l'hormone thyroïdienne T3 (TR β 1), Lee et al. mentionnent pour la première fois TRIP12¹⁷⁷. En effet, ils identifient, chez le Rat, 15 protéines non-apparentées appelées les Thyroid hormone Receptor Interacting Proteins (TRIP1-15). Parmi les TRIP identifiées, des homologies de séquence avec des protéines connues sont trouvées. TRIP12 est la douzième protéine de la liste et présente notamment une homologie de séquence avec la partie carboxy-terminale de la protéine E6-AP (E6-associated protein), une oncoprotéine à activité E3 ubiquitine ligase¹⁷⁸. De plus, les auteurs décrivent que TRIP12 interagit avec TR β 1 en l'absence de l'hormone thyroïdienne T3 et qu'elle n'affecte pas son activité. D'autres travaux de 1995 relatent une homologie de séquence de 55% entre TRIP12 et le domaine Homologue à l'Extrémité Carboxy-Terminale (domaine HECT) de l'E3 ubiquitine ligase oncogénique E6-AP la définissant comme une E3 ubiquitine ligase¹⁷⁹. Ce n'est que plusieurs années après son identification, en 2008, que Park et al. démontreront, pour la première fois, l'activité E3 ubiquitine ligase de TRIP12¹⁸⁰.

b. Le gène Trip12

Sur le génome humain, le gène codant pour l'ARNm Trip12 est situé sur le bras long du chromosome 2 locus q36.3 (Chr2q36.3) et s'étend sur près de 168 kb. L'expression de l'ARNm de Trip12 est contrôlée par un promoteur bidirectionnel qui régule également l'expression de l'ARNm de FbxO36 (F-Box Only protein 36) en direction opposée (**Figure 22**). La fonction exacte de la protéine FBXO36 n'est à ce jour pas connue. Elle fait partie de la famille des protéines à domaine F-Box, motif d'environ 50 acides aminés, décrits pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine. La première protéine à F-Box identifiée, FBP, fait partie du complexe SCF (SKP, CULLIN, F-BOX containing complex) qui dirige l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S de protéines impliquées dans le cycle cellulaire.

Les promoteurs bidirectionnels sont représentés à hauteur de ~10% dans le génome humain et sont retrouvés dans de nombreuses espèces. La plupart des gènes contrôlés par un promoteur bidirectionnel partagent une fonction similaire (réparation des dommages à l'ADN, régulation du cycle cellulaire ou métabolisme)¹⁸¹. La présence d'un promoteur bidirectionnel permettrait une co-régulation des gènes concernés, ici TRIP12 et FBXO36. Le promoteur de Trip12 contient 555 paires de base et est situé au cœur d'une région riche en dinucléotides CG (cytosine-guanosine), également appelée îlot CpG (Cytosine-phosphate-Guanosine), de 1753

paires de base. La régulation et le niveau de méthylation de ce promoteur TRIP12/FBXO36 restent à ce jour peu connus.

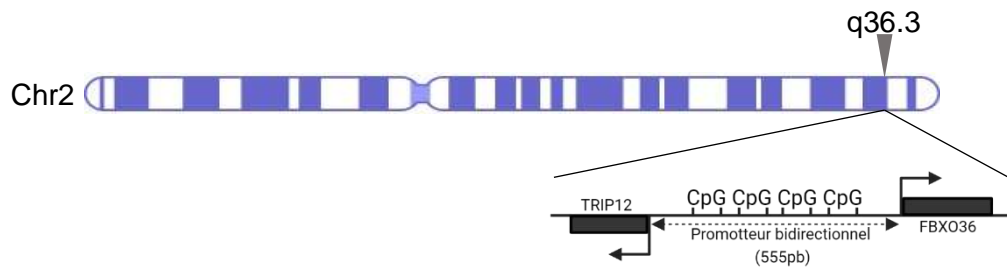


Figure 23 : Représentation schématique de la position du gène Trip12 sur le chromosome 2 et de l'organisation du promoteur bidirectionnel.

c. La structure et l'expression de l'ARNm de Trip12

Il a été identifié 26 variants d'épissage de l'ARNm de Trip12. Leur taille varie entre 9 065 nucléotides à 10 492 nucléotides. Ils sont composés de 41 à 43 exons. Le niveau d'expression et les fonctions spécifiques de ces variants ne sont pas connues. L'ARNm de Trip12 possède une région 5'-non traduite (5'-UTR) d'environ 180 nucléotides. Il existe deux formes de la région 3'-UTR de l'ARNm de TRIP12, une forme courte de 340 nucléotides et une forme longue de 3 717 nucléotides dus à la présence de deux signaux de poly-adénylation (PAS) (**Figure 23**). Ces deux variants possèdent une efficacité de traduction différente. En effet, lors d'une activation de la voie de signalisation mTORC (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), la forme courte est traduite plus efficacement que la forme longue¹⁸².

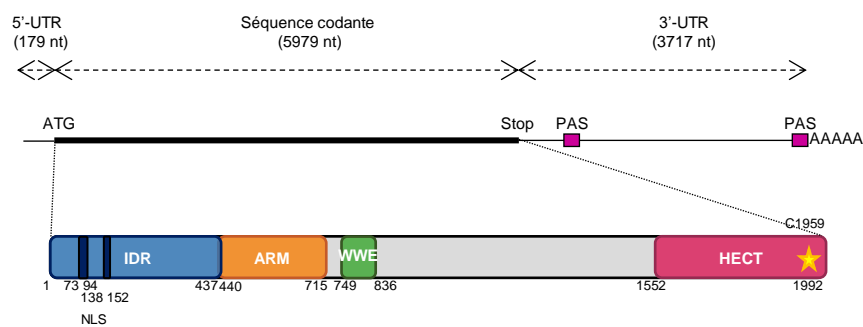


Figure 24 : Représentation schématique de la structure de l'ARNm et de la protéine TRIP12.

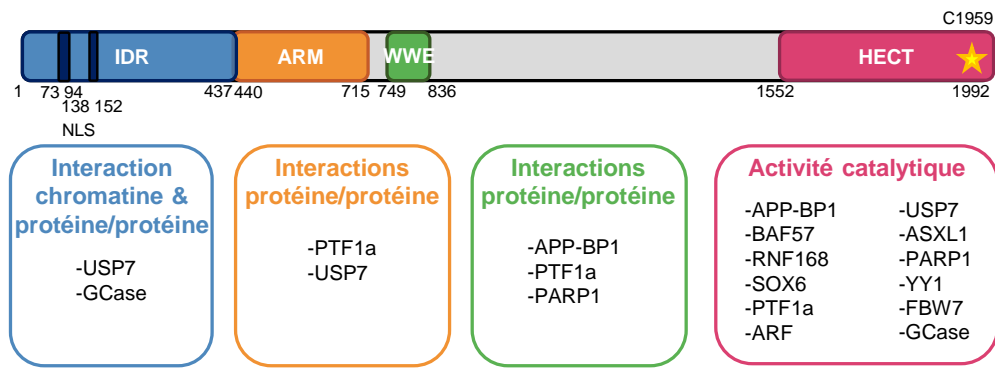


Figure 26 : Domaines protéiques de TRIP12

i. Le domaine HECT

Le domaine HECT (~40kDa) est situé à l'extrémité C-terminale entre les acides aminés 1552 et 1992¹⁷⁹. Il s'agit du domaine d'activité catalytique qui permet de classer TRIP12 dans la famille des 28 E3 ubiquitine ligases de type HECT. Ce domaine confère à TRIP12 la capacité d'ubiquitiner des protéines^{180,186} (cf Chapitre 1 - Partie 3.2). Le résidu cystéine localisé en position 1959 est crucial. Son échange avec un résidu alanine abolit l'activité catalytique de TRIP12¹⁸⁵. Ce domaine permet à TRIP12 d'être impliquée dans de nombreux processus cellulaires qui seront détaillés dans la partie 3. 2.

ii. Le domaine WWE

Le domaine WWE est situé entre les acides aminés 749 et 836. Cette région est caractérisée par la présence d'acides aminés hydrophobes, aromatiques et par la conservation de deux résidus glutamate (WW) et d'un résidu tryptophane (E). Il est requis pour les interactions protéines/protéines. Il est notamment essentiel pour la famille des E3 ubiquitine ligases et les poly-ADP ribose polymérase (PARP). Le domaine WWE permet l'interaction de TRIP12 avec les protéines APP-BP1¹⁸⁰ (Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1), PTF1a¹⁸⁷ et la forme parylée de PARP1¹⁸⁸ afin d'en assurer leur adressage au protéasome via une polyubiquitination.

iii. Le domaine Armadillo

Le domaine Armadillo (ARM) est situé entre les acides aminés 437 et 715. Ce domaine est caractérisé par la présence de répétitions en tandem d'environ 42 résidus d'acides aminés hydrophobes. Ces répétitions sont fortement impliquées dans les interactions protéine/protéine. Les protéines avec des répétitions Armadillo interviennent dans une multitude de processus biologiques tels que l'adhésion cellule/cellule, la signalisation cellulaire, l'organisation du cytosquelette, le trafic nucléaire et l'ubiquitination¹⁸⁹. Une étude a démontré qu'au sein de la protéine UFD4 (homologue de TRIP12 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Chapitre 1 Partie 3 I.d.vi)), le domaine ARM permet la reconnaissance du signal de dégradation des substrats par fusion de l'ubiquitine¹⁸³. De plus, le domaine ARM permet à TRIP12 d'interagir avec les protéines PTF1a¹⁸⁷ et USP7¹⁹⁰ (Ubiquitin Specific Protease 7).

iv. La région intrinsèquement désordonnée

Une région intrinsèquement désordonnée (IDR) est située à l'extrémité N-terminale entre les acides aminés 1 et 440¹⁸⁵. Comme mentionné dans la partie 2, les IDR sont des séquences enrichies en acides aminés basiques, chargés positivement, et hydrophiles tels que la lysine, l'arginine, la sérine et l'histidine. Elles sont caractérisées par une absence de structure 3D et sont présentes dans environ 40% du protéome¹²¹. En dépit de leur absence de structure, de plus en plus d'études mettent en avant une fonction de ces régions protéiques, allant ainsi à l'encontre du paradigme « structure = fonction ». Les protéines à IDR sont impliquées dans les interactions avec les protéines mais aussi avec les acides nucléiques (ARN+ADN)^{191,192}. En effet, la présence d'IDR à l'extrémité N-terminale d'une protéine favorise une interaction avec l'ADN¹⁹³. Nous avons démontré que TRIP12 interagit avec la chromatine via son domaine IDR¹⁸⁵. L'IDR de TRIP12 est également nécessaire mais pas suffisante pour l'interaction avec la déubiquitineuse USP7 et pour l'interaction avec la glucocerebrosidase (GCase)¹⁹⁴.

v. La localisation subcellulaire, l'expression protéique et les modifications post-traductionnelles de TRIP12

♦ La localisation subcellulaire et l'expression protéique

En accord avec le Human Protein Atlas, nos travaux et ceux de nos collègues décrivent une localisation nucléaire de la protéine TRIP12¹⁹⁵. Cette localisation dans le noyau des cellules s'explique très probablement par la présence de deux séquences prédites (acides aminés 73 à 94 et 136 à 152) de localisation nucléaire (NLS) retrouvées au sein de l'IDR. Nos travaux soulignent également que, dans un modèle cellulaire HeLaS3, la présence de TRIP12 varie au cours du cycle cellulaire : TRIP12 est induite en fin de phase S, perdue en phase G₂ pour atteindre son maximum d'expression en mitose et disparaître en début de phase G₁.

La protéine TRIP12 est exprimée de façon ubiquitaire et à des niveaux comparables (faible à moyen) dans la plupart des tissus humains. Les testicules sont le tissu où TRIP12 est la plus exprimée. Son expression n'est cependant pas détectée dans le foie, les tissus mous et adipeux et dans la rate¹⁹⁶. Il est intéressant de noter qu'une étude décrit une localisation et une action au niveau du réticulum endoplasmique de TRIP12 au niveau de cellules neuronales dopaminergiques de la *substantia nigra pars compacta* (Chapitre 1 Partie 3 III.b.) chez des patients atteints de la maladie de Parkinson¹⁹⁴.

♦ Les modifications post-traductionnelles

Comme une vaste majorité de protéines, TRIP12 est post-traductionnellement modifiée. La base de données PhosphoSitePlus^{®197} recense les acides aminés modifiés identifiés lors d'études expérimentales. Pour TRIP12, elle dénombre 83 sites de phosphorylation, 40 sites d'ubiquitination, 5 sites de mono-méthylation et 4 sites d'acétylation (**Figure 26**). Ces modifications sont le plus souvent retrouvées dans son IDR de par ses propriétés intrinsèques (Chapitre 1 Partie 2.I.c.). Parmi les nombreuses phosphorylations identifiées, seulement trois ont été attribuées à des kinases : la sérine S424 par la kinase CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1), la sérine S1078 par la kinase CHK1 (Checkpoint Kinase 1) et la sérine S1577 par les kinases ATM/ATR (Ataxia-Telangiectasia-Mutated/Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related). Deux études fonctionnelles mettent en évidence la poly-ubiquitination de TRIP12 sans pour autant identifier

l'E3 ubiquitine ligase impliquée^{198,199}. De plus, il n'est pas exclu que TRIP12 puisse s'auto-ubiquitiner. Une de ces études reporte également qu'USP7 stabilise TRIP12 grâce à son activité déubiquitinase. De surcroît, Liu et al.¹⁹⁰ démontrent que TRIP12 interagit et poly-ubiquitine USP7 entraînant sa dégradation par le protéasome. De ce fait, il existe une boucle de régulation entre TRIP12 et USP7 via le contrôle des modifications post-traductionnelles. Malgré les nombreuses études sur TRIP12, aucune ne montre l'effet de ces modifications PTM sur la régulation de son activité catalytique, de sa capacité d'interaction ou de sa localisation subcellulaire.

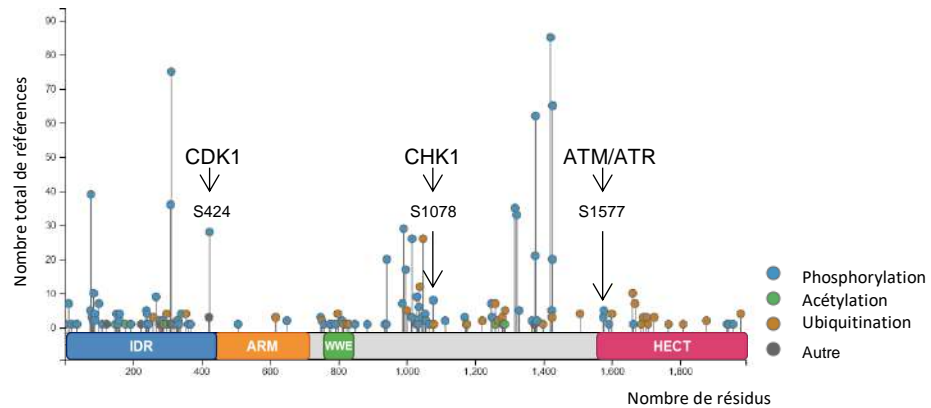


Figure 27 : Modifications post-traductionnelles de la protéine TRIP12.

vi. La conservation de TRIP12 entre les espèces

La protéine TRIP12 possède de nombreux orthologues dans différentes espèces. Certains orthologues de TRIP12 portent un nom différent par exemple, CTRIP (Circadian TRIP) chez *Drosophila melanogaster*, KAKTUS (KAK ou UPL3) chez *Arabidopsis thaliana* et UFD4 (Ubiquitin Fusion Degradation 4) chez *Saccharomyces cerevisiae*¹⁹⁵. La taille des orthologues de TRIP12 varie de 3 140 acides aminés pour CTRIP à 1 483 acides aminés pour UFD4 (**Figure 27**). La séquence d'acides aminés de TRIP12 est très conservée chez les Vertébrés variant de 82% d'identité chez *Danio rerio* à 97.7% pour *Mus musculus* comparativement à la séquence de l'Homme. Ce pourcentage diminue fortement chez les Invertébrés avec 38% d'identité pour *Drosophila melanogaster* et seulement 27.2% pour *Saccharomyces cerevisiae* (**Figure 27**).

A l'exception du domaine WWE qui est présent chez tous les Vertébrés et *Schmidtea mediterranea* mais pas chez *Arabidopsis thaliana* et *Saccharomyces cerevisiae*; l'IDR, les répétitions ARM et le domaine HECT sont présents chez tous les orthologues. Due à l'absence de structure 3D, il est décrit que le taux d'évolution des IDR est plus élevé que les domaines structurés¹²¹. Cependant, et en accord avec nos résultats précédents, les régions IDR avec une forte conservation au cours de l'évolution sont souvent retrouvées dans des protéines impliquées dans la régulation de la transcription et l'interaction avec l'ADN¹²¹. La grande conservation des domaines de TRIP12 au cours de l'évolution souligne l'importance des fonctions de cette protéine dans le monde vivant.

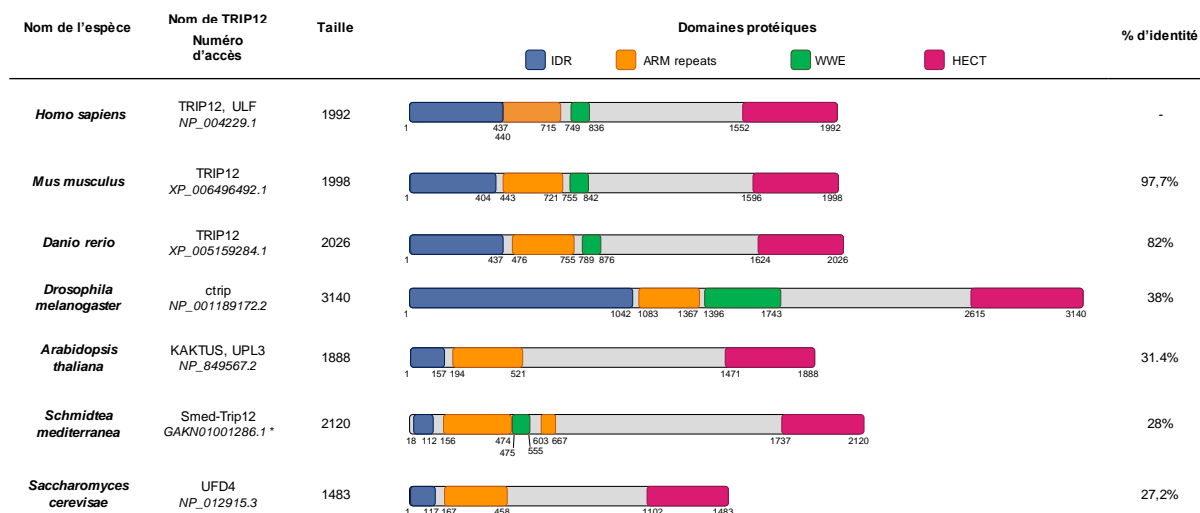


Figure 28 : Représentation schématique des domaines de la protéine TRIP12 dans différentes espèces.

II. Les fonctions de TRIP12 liées à son activité catalytique

a. L'ubiquitination des protéines

Grâce à son domaine catalytique HECT, TRIP12 fait partie du système d'ubiquitination des protéines. Découverte en 1978²⁰⁰ et depuis récompensée par un prix Nobel en 2004, l'ubiquitination est un processus biologique dépendant de l'ATP qui permet la modification post-traductionnelle d'une protéine-cible par liaison covalente d'ubiquitine. L'ubiquitine est un peptide de 76 acides aminés (8,5 kDa) très conservé au cours de l'évolution. Cette liaison se fait entre le résidu glycine 76 (G76) de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et une lysine du groupement amine latéral du substrat protéique. La fonction la plus décrite de l'ubiquitination est l'adressage des protéines au protéasome 26S pour y être dégradées. Ce processus est retrouvé dans une grande partie des fonctions cellulaires telles que la réparation des dommages à l'ADN, l'endocytose, le contrôle de la localisation subcellulaire, les interactions protéine/protéine et l'apoptose²⁰¹.

Selon la base de données BioGrid²⁰², TRIP12 compte 215 interactants. Les données proviennent de différentes approches expérimentales comme la spectrométrie de masse, l'immunoprécipitation suivie de Western blot ou le double hybride. Dans la vaste majorité des études (193), TRIP12 est retrouvée dans l'interactome de protéines. Les données de la littérature mettent en évidence que TRIP12 régule la stabilité et induit la protéolyse d'uniquement 12 protéines répertoriées dans le **Tableau 4**. Il est intéressant de noter qu'à ce jour, aucune étude protéomique à large échelle se focalisant sur TRIP12 n'a été réalisée.

Noms Dénominations	Fonctions biologiques	Références
APP-BP1 <i>Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1</i>	Neddylation	180
BAF57 BRG1-Associated Factor 57	Remodelage de la chromatine	203
p14/ARF p14/Alternative Reading Frame	Régulation du cycle cellulaire	198,204
RNF168 Ring Finger Protein 168	Réparation des dommages à l'ADN	205
Sox6 SRY-Box transcription factor 6	Différenciation cellulaire	206
PTF1a Pancreas Transcription Factor 1a	Différenciation cellulaire	187
USP7 Ubiquitin Specific Peptidase 7	Régulation du cycle cellulaire Réparation des dommages à l'ADN	190
ASXL1 Additional Sex Combs Like 1	Remodelage de la chromatine	207
PARP1 Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1	Réparation des dommages à l'ADN	188
YY1 Ying Yang 1	Organisation 3D du génome	208
FBW7 F-Box and WD Repeat Domain Containing 7	Différenciation cellulaire	209
GCase Glucocerebrosidase	Métabolisme glycolipidique	194

Tableau 4 : Liste des substrats identifiés de TRIP12.

i. Le système ubiquitine-protéasome

La réaction d'ubiquitination se fait en trois étapes et nécessite une machinerie enzymatique composée d'enzymes E1 (ou ubiquitin-activating enzyme), E2 (ou ubiquitin-conjugating enzyme) et E3 (ou ubiquitine ligase). A ce jour, on dénombre deux E1, 37 E2²¹⁰ et plus de 600 E3²¹¹. La première étape dite « d'activation de l'ubiquitine » est réalisée par l'E1 et requiert de l'ATP. Elle consiste en la formation d'une liaison thioester entre le résidu G76 de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'E1²¹². Lors de la deuxième étape dite « de conjugaison », l'ubiquitine est transférée sur un résidu cystéine de l'E2. Enfin, lors de la dernière étape dite « de ligation », l'E2 chargée de l'ubiquitine interagit avec une E3 ubiquitine ligase et qui reconnaît et/ou catalyse le transfert de l'ubiquitine sur la protéine-cible. La reconnaissance des substrats par les E3 ubiquitine ligases se fait via une séquence spécifique, présente sur les protéines cibles, appelée degron²¹³. De plus, la réaction d'ubiquitination est réversible grâce à aux déubiquitinases (DUB)²¹⁴ (Figure 28).

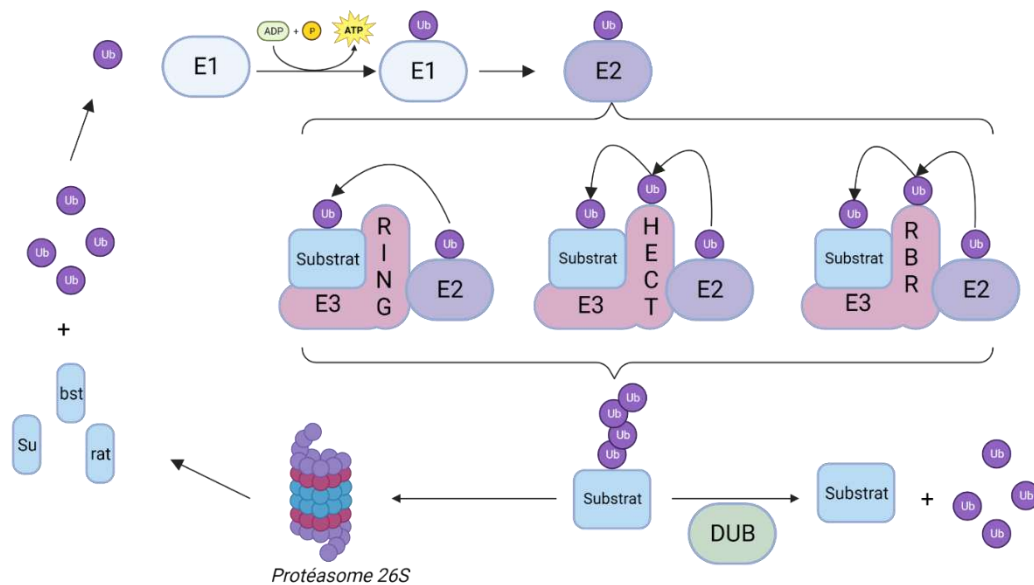


Figure 29 : Représentation schématique du mécanisme d'ubiquitination des protéines.

ii. Les familles de E3 ubiquitine ligases

Dans le système d'ubiquitination, les E3 ubiquitine ligases apportent la spécificité de substrat. Elles sont classées en trois grandes familles (RING, HECT, RBR) en fonction de leur capacité de liaison avec le complexe E2-Ubiquitine²¹¹.

♦RING

La famille des RING (Really Interesting New Gene) est la plus grande famille et compte plus de 600 membres. Les E3 RING interagissent avec le complexe E2/Ub via un domaine RING et l'ubiquitine est directement transférée de l'E2 au substrat sans passer par un complexe intermédiaire E3/Ub. Les protéines RING1b et RNF168 respectivement mentionnées dans les parties 1.III.b.ii et 1.II.c font partie de cette famille.

♦HECT et RBR

A contrario, pour les E3 de la famille HECT (environ 30 membres), dont fait partie TRIP12 et RBR (Ring1 Between Ring2, ~10 membres), l'ubiquitine est transférée de l'E2 sur une cystéine conservée du domaine HECT ou Ring2 de l'E2 via une liaison thioester avant d'être ajoutée sur le substrat.

iii. Les différents types d'ubiquitination

Les substrats peuvent être mono-ubiquitinés (une ubiquitine sur un site), multi-mono-ubiquitinés (une ubiquitine sur plusieurs sites) ou poly-ubiquitinés (plusieurs ubiquitines sur un site) (**Figure 29**)²¹⁵. Les chaînes de poly-ubiquitination se font entre les résidus lysine K6, K11, K27, K29, K48 ou K63 de l'ubiquitine précédente. Elles peuvent être de longueurs et de topologies différentes (homotypique/hétérotypique) ce qui affectent le devenir de la protéine ubiquitinée. Par exemple, la poly-ubiquitination par chaînes liées en K48 induit l'adressage et la dégradation par le protéasome 26S de la protéine concernée alors que des chaînes non-K48 sont impliquées dans des processus de signalisation (endocytose, réparation des dommages à l'ADN, signalisation intracellulaire²¹⁶). Les mono- et multi-mono-ubiquitinations jouent uniquement un rôle dans la

régulation de fonctions biologiques telles que la transcription, l'apoptose et la réparation des dommages de l'ADN.

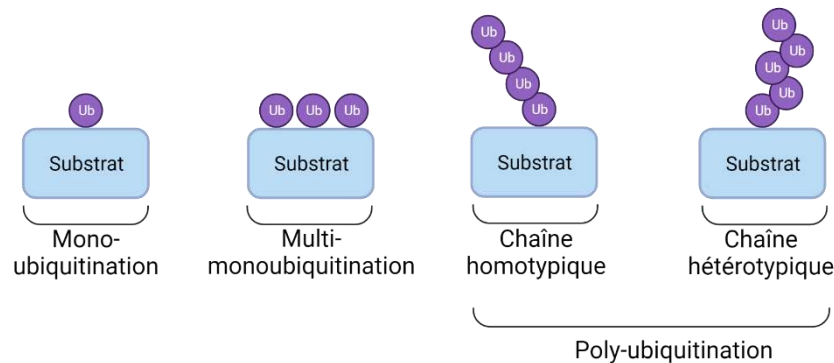


Figure 30 : Représentation schématique des différents types d'ubiquitination

b. L'implication de TRIP12 dans le remodelage et l'organisation de la chromatine

i. Via le complexe SWI/SNF

Les deux mètres d'ADN contenus dans le noyau de nos cellules s'organisent en s'enroulant par portion de 146 pb autour d'octamères d'histones formant une structure appelée nucléosome. Leur positionnement a un rôle central dans de nombreux processus nucléaires comme la transcription et les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (*Chapitre 1 Partie 1*). Les complexes protéiques SWI/SNF (Switch/Sucrose Non-fermentable) sont des régulateurs-clés du positionnement des nucléosomes. Ils peuvent déplacer, insérer ou éjecter des octamères d'histones le long de l'ADN via l'hydrolyse d'ATP. Ils sont composés d'une douzaine de protéines et l'activité ATPasique est portée par les protéines BRG1 (Brahma Related Gene 1) et BRM (Brahma). Pour être complètement fonctionnels, les complexes requièrent la présence des protéines BRG1-Associated Factors (BAF). Ces protéines sont dégradées lorsqu'elles ne sont pas associées au complexe SWI/SNF. Le contrôle de l'assemblage via la stœchiométrie des différents acteurs de tels complexes protéiques est essentiel à leur bon fonctionnement. Une dérégulation de la stœchiométrie de ces facteurs est fréquemment observée dans les cancers et entraîne une altération du fonctionnement du complexe (accessibilité et expression des gènes)²¹⁷. Ainsi, la régulation de la stabilité de ces protéines contrôlées par le protéasome est cruciale pour le bon fonctionnement des complexes SWI/SNF. A titre d'exemple, la protéine BAF57 est stabilisée par sa liaison avec BAF155. Keppler & Archer démontrent que TRIP12 poly-ubiquitine le « pool » nucléaire libre de BAF57 (SMARCE1) (**Figure 30**)²⁰³. TRIP12 est ainsi impliquée dans le contrôle de la stœchiométrie des protéines du complexe SWI/SNF.

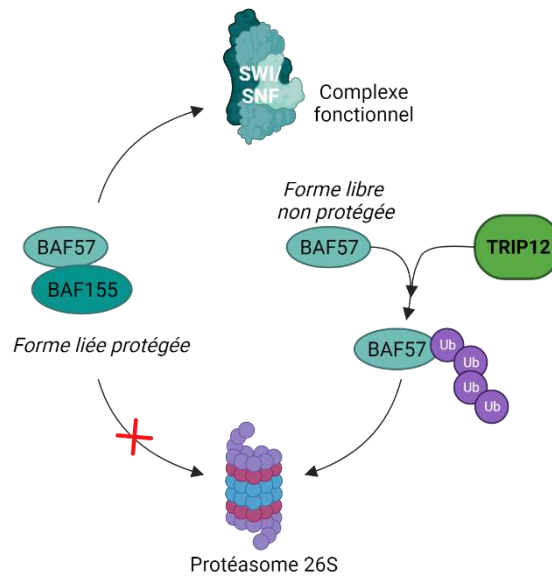


Figure 31 : Représentation schématique de la relation entre TRIP12 et BAF57.

ii. Via le complexe Polycomb

Les modifications épigénétiques des bases de l'ADN et des histones jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes (*Chapitre 1 Partie 1*). Les histones peuvent être méthylées, acétylées, phosphorylées, ubiquitinées et sumoylées. L'ADN, quant à lui, peut être méthylé sur trois résidus nucléotidiques : la 5-méthylcytosine (5mC)²¹⁸, la N4-méthylcytosine (4mC)²¹⁹ et la N6-méthyladenosine (6mA)²²⁰. Chez les Eucaryotes et les Vertébrés, il a récemment été démontré que la 6mA est associée aux marques épigénétiques répressives²⁰⁷ telles que H2AK119Ub et H3K27me3. Elles sont déposées de façon réversible par les complexes répresseurs Polycomb 1 (PRC1) et 2 (PRC2) et permettent la répression de gènes lors de la différenciation cellulaire, par exemple. L'ubiquitination de H2A sur la lysine K119 est réversible grâce au complexe Polycomb Repressive Deubiquitinase complexe (PR-DUB) formé les protéines BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1) et ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1). BAP1 porte l'activité déubiquitinase et est stabilisée par ASXL1. En 2019, Kweon et al. démontrent que les 6mA situées au niveau des gènes réprimés par PRC1/2 sont reconnues par le PR-DUB et que TRIP12 participe au maintien de ses marques répressives en induisant la déstabilisation du complexe PR DUB via la poly-ubiquitination et la dégradation d'ASXL1 (**Figure 31**).

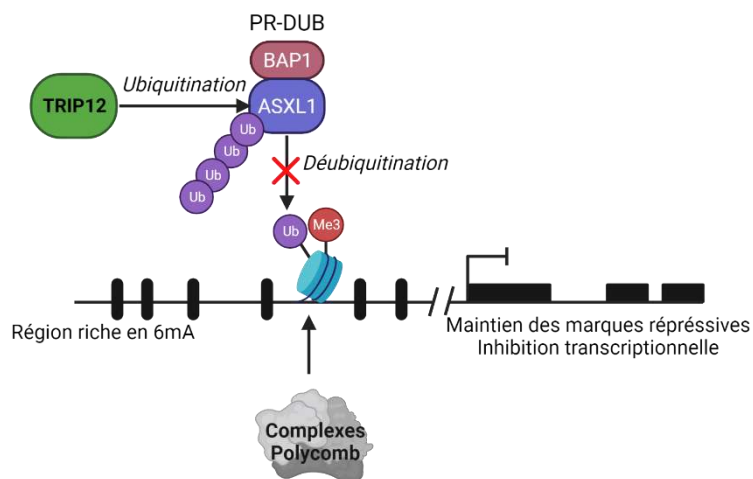


Figure 32 : Représentation schématique de la relation entre TRIP12 et ASXL1..

De plus, d'autres analyses protéomiques suggèrent que TRIP12 s'associe à des composants de PRC2 comme SUZ12, EZH2, EED²²¹ mais également à BAP1 du composant PR-DUB. L'ensemble de ces études met en évidence l'implication de TRIP12 dans la régulation épigénétique de l'expression des gènes via son activité d'E3 ubiquitine ligase. TRIP12 émerge ainsi comme une protéine régulatrice-clé de l'homéostasie de la chromatine.

iii. Via le facteur de transcription YY1

L'expression des gènes est également contrôlée par des facteurs de transcription. Ying Yang 1 (YY1) est un facteur de transcription ubiquitaire chez les Mammifères²²² capable de moduler la transcription en recrutant des cofacteurs activateurs ou répresseurs de la transcription. De nombreuses études décrivent des altérations du niveau d'YY1 dans différentes pathologies telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, le syndrome de déficience intellectuelle et les cancers²²². Dans un contexte de surcharge hépatique en fer, Tang et collaborateurs ont démontré que TRIP12 induit la dégradation d'YY1 transmettant une inflammation hépatique via l'axe HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha)/mir-122/CCL2 (Chemokine (C-C motif) Ligand 2)²⁰⁸. De façon intéressante, les groupes R.Young et de Y. Wang expliquent que la fonction de régulation de la transcription d'YY1 est, en partie, due à sa capacité de structurer des boucles d'ADN par des interactions « enhancer »/promoteurs ou G4 quadruplexes^{223,224}. Ces travaux proposent YY1 comme un nouvel « organisateur » du génome 3D et, bien qu'encore débattu²²⁵, cette fonction d'YY1 ancrerait TRIP12 comme un nouveau régulateur de l'organisation tridimensionnelle du génome.

c. L'implication de TRIP12 dans la progression du le cycle cellulaire l'intégrité génome

Le cycle cellulaire est un processus très finement régulé qui conduit à la formation de deux cellules-filles à partir d'une cellule-mère. Chez tous les organismes vivants, le cycle cellulaire se divise en deux grandes étapes : l'interphase et la mitose (division cellulaire). Pour les Eucaryotes, l'interphase est la phase la plus longue du cycle cellulaire (environ 90%), elle est divisée en trois étapes préparatoires à la division mitotique. Pendant la première phase G₁ (Gap1), la cellule croît

et contrôle l'intégrité de son génome. Durant la deuxième phase dite S (Synthèse), la cellule incorpore des nucléotides pour répliquer son ADN. Enfin, lors de la troisième phase dite G₂ (Gap2), la cellule vérifie une deuxième fois l'intégrité de son génome et termine sa croissance. Vient ensuite la mitose, elle s'accompagne d'une succession de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques qui aboutit à la séparation en deux lots égaux des chromosomes de la cellule-mère entre les deux cellules-filles²²⁶. La progression d'une cellule dans le cycle cellulaire est régulée notamment par des CDK (Cyclin Dependent Kinase) qui phosphorylent les protéines sur des résidus thréonine ou sérine. Leur activité dépend des cyclines avec lesquelles elles interagissent et forment un complexe labile CDK/cycline spécifique pour chaque transition de phases du cycle. L'activité des CDK est modulée par des interactions transitoires avec des CKI (Cyclin dependent Kinase Inhibitors) qui inhibent leur action ²²⁶.

Plusieurs groupes ont démontré le rôle-clé de TRIP12 dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, les travaux de Chen et collaborateurs^{204,227,228} reportent que TRIP12 est l'E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de la protéine p14/ARF (**Figure 32**). Ils renommèrent ainsi TRIP12 en ULF pour Ubiquitin Ligase for ARF. p14/ARF joue un rôle majeur dans la progression du cycle cellulaire. Dans une cellule saine, l'E3 ubiquitine ligase MDM2 (Mouse Double Minute 2) entraîne la dégradation du gardien du génome, P53. ARF interagit avec MDM2 et inhibe son action sur P53, ce qui conduit à l'accumulation de P53, à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou au déclenchement de l'apoptose. TRIP12 poly-ubiquitine ARF et diminue sa quantité, MDM2 dégrade alors P53 permettant ainsi la progression dans le cycle cellulaire²⁰⁴.

Plusieurs protéines modulent l'interaction/dégradation d'ARF par TRIP12. En effet, le même groupe a identifié deux régulateurs protéiques protégeant ARF de sa poly-ubiquitination par TRIP12: la nucléophosmine²⁰⁴ (NPM) et c-MYC²²⁸. NPM interagit et séquestre ARF dans le nucléole, la rendant inaccessible à l'action de TRIP12 uniquement présent dans le nucléoplasme (**Figure 32**). De même, une forte surexpression de c-MYC (contexte oncogénique fort) améliore la demi-vie d'ARF en déstabilisant l'interaction ARF/TRIP12. Par la suite, un autre groupe démontre que la nucléostémine (NS) nucléolaire stabilise le complexe ARF/NPM alors que la NS nucléaire déstabilise le complexe ARF/TRIP12 limitant ainsi la dégradation d'ARF²²⁹. De plus, TRIP12 se lie avec la forme nucléaire de la protéine TRADD (Tumour necrosis factor Receptor-Associated Death Domain), protéine-clé de la signalisation pro-inflammatoire du Tumor Necrosis Factor (TNF)²³⁰ (**Figure 32**). La translocation nucléaire de TRADD protège ainsi ARF de sa poly-ubiquitination et de sa dégradation induite par TRIP12.

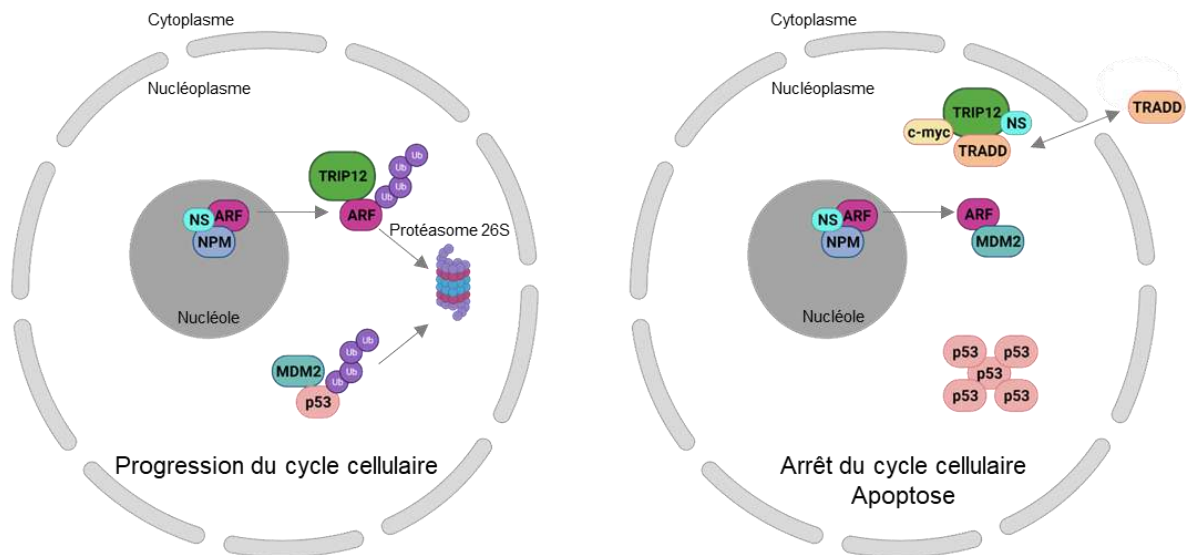


Figure 33 : Représentation schématique de la régulation de la voie ARF/P53 par TRIP12.

Enfin, les résultats *in vivo* de Kajiro et al. corroborent les études précédentes. Chez la Souris, une mutation homozygote inactivant l'activité ubiquitine ligase de TRIP12 conduit à une létalité embryonnaire au stade E11.5²³¹. *In vitro*, les cellules ES issues de ces embryons présentent une croissance cellulaire réduite et une accumulation anormale en phase G₂/M et sub-G₁. Les auteurs expliquent ce phénotype par l'accumulation de la protéine ARF dont TRIP12 contrôle la stabilité et par l'induction anormale de la CKI p16 ink4A induisant une progression non-contrôlée dans le cycle cellulaire.

TRIP12 est très impliquée dans le contrôle de la progression dans le cycle cellulaire. Jusqu'il y a peu, une faible quantité de données était disponible quant à la régulation de TRIP12 au cours du cycle cellulaire. Nous avons démontré que l'expression de la protéine TRIP12 est induite en fin de phase S, perdure en phase G₂, atteint son maximum d'expression en mitose et bien que fortement associée à la chromatine en mitose, TRIP12 disparaît très rapidement en début de phase G₁. A noter que les mécanismes de régulation de l'expression de TRIP12 au cours du cycle ne sont pas encore connus. De plus, nous avons montré que TRIP12 conditionne l'entrée en mitose en contrôlant la durée de la réplication de l'ADN en phase S et ce grâce à son interaction avec la chromatine via son IDR¹⁸⁵.

d. L'implication de TRIP12 dans les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN

i. Via la voie ARF/53

Dans des conditions de stress oncogénique élevé (grande quantité de l'oncogène c-MYC) couplées à l'induction de cassures de l'ADN par la doxorubicine, Chen et al. démontrent que c-MYC empêche l'interaction entre ARF et TRIP12 en interagissant avec TRIP12²²⁸. De ce fait, ARF est stabilisée ce qui conduit à une accumulation de P53 et à une induction de l'apoptose en réponse aux cassures de l'ADN. Ils confirment ces résultats en observant une stabilisation d'ARF puis une induction de l'apoptose via P53 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) invalidés pour TRIP12 et soumis à des traitements induisant des cassures à l'ADN. D'autre part, il est décrit qu'en

condition de dommages à l'ADN, ATM active la protéine phosphatase 1 (PP1). PP1 déphosphoryle NPM complexée à ARF au niveau des nucléoles. Cette déphosphorylation entraîne une libération d'ARF dans le nucléoplasme la rendant accessible à son ubiquitination par TRIP12²³² (**Figure 33**). Ce mécanisme entraîne un blocage de la réponse apoptotique après dommages à l'ADN. TRIP12 agit ainsi comme un modulateur ambivalent voire ambiguë de la voie ARF/p53/apoptose lors des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Toutefois, une étude a identifié la sérine S1577 de TRIP12 comme étant phosphorylée par les kinases ATM/ATR²³³. Il est donc probable que les modifications post-traductionnelles de TRIP12 soient essentielles pour comprendre le rôle complexe de TRIP12 dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Il est intéressant de noter que lors de la réparation des dommages à l'ADN, la chromatine subit de nombreux changements de son organisation. Grâce à une succession de modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination des histones, la chromatine subit des réarrangements structurels (décompaction, évictions des histones...) pour assurer le bon déroulement de la DDR^{234,235}.

ii. Via l'ubiquitination des histones

Une étude de S. Gasser révèle l'implication d'UFD4 (orthologue de TRIP12 chez la Levure) dans la réorganisation nucléosomale observée lors de la réparation de dommages à l'ADN²³⁶. Une éviction des histones par le complexe INO80-C suivie de leur dégradation est observée lors de cassures à l'ADN pour permettre une décompaction et une augmentation de la mobilité de la chromatine afin de faciliter les mécanismes de réparation²³⁷. Challa et al. montrent que UFD4 grâce à son activité catalytique participe à l'éviction des histones en réponse à des dommages de l'ADN. De ce fait, UFD4 facilite la mobilité globale de la chromatine et l'invasion du brin complémentaire facilitant le recrutement des acteurs de la réparation de l'ADN (**Figure 33**). Dans cette étude, les auteurs n'étudient pas précisément les histones ciblées par TRIP12.

L'ubiquitination des histones joue un rôle crucial dans le recrutement des protéines responsables de la détection et de la réparation des dommages à l'ADN. L'E3 ubiquitine ligase RNF8 ubiquitine les histones H2A et H2AX au niveau des cassures. Cette primo-ubiquitination est ensuite amplifiée et étendue par une autre E3 ubiquitine ligase, RNF168. Ces chaînes de poly-ubiquitination servent de plateforme de recrutement pour les protéines-clés de la réparation que sont 53BP1 et le complexe RAP80/BRCA1. Une sur-amplification du signal d'ubiquitination peut être désastreuse pour la cellule. En effet, les protéines 53BP1 et BRCA1 sont séquestrées sur des régions d'ADN non endommagées empêchant leur action de détection au niveau des cassures. TRIP12 en collaboration avec UBR5 (ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5) empêchent la sur-propagation de l'ubiquitination induite par RNF168²⁰⁵ (**Figure 33**). Bien que les auteurs ne démontrent pas l'interaction/ubiquitination directe de RNF168 par TRIP12, ils affirment que TRIP12 contrôle le niveau de RNF168 pour prévenir une ubiquitination excessive après cassures.

iii. Via la déubiquitinase USP7

En condition physiologique, la déubiquitinase USP7 stabilise MDM2 et par conséquent déstabilise P53. En condition de cassures à l'ADN, USP7 est déphosphorylée par PPM1G (3'-protein-phosphatase-1G) et USP7 stabilise préférentiellement P53 plutôt que MDM2. De plus, USP7 stabilise RNF168 et favorise l'arrêt dans le cycle cellulaire et la réparation des cassures de l'ADN². Dans ces mêmes conditions, Liu et al. démontrent que TRIP12 interagit et poly-ubiquitine USP7 conduisant à sa dégradation par le protéasome¹⁹⁰ (**Figure 33**). Par conséquent TRIP12

contrôle indirectement la stabilité des protéines protégées par USP7 telles que P53, 53BP1 et CHK1, lesquelles sont essentielles à la régulation de la DDR. Auparavant, une étude (cf Partie 3.3.c.ii) a démontré que TRIP12 est stabilisée par USP7 via son activité de DUB. Etant donné les rôles opposés de TRIP12 et USP7 sur le niveau de RNF168, leur contrôle mutuel est un modulateur essentiel au bon déroulement de la réparation des dommages de l'ADN¹⁹⁸.

iv. Via PARP1

Le recrutement de la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) au niveau de différents types de lésions de l'ADN (SSB, DSB, stress réplicatif) est une des étapes les plus précoces dans la DDR. PARP1 est recrutée au niveau des cassures grâce à sa capacité de liaison de l'ADN et induit la synthèse de chaînes de 20 à 50 résidus d'ADP-ribose (PARylation) à sa surface et à la surface de différentes protéines. La PARylation entraîne l'engagement de protéines impliquées dans la DDR et dans le remodelage de la chromatine en réponse aux cassures²³⁸. Un déficit ou une inhibition de PARP1 entraîne une latence dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN comme la phosphorylation des histones H2A.X ou de P53²³⁸. Des inhibiteurs de PARP1 sont utilisés en oncologie pour induire la mort cellulaire par létalité synthétique dans un contexte déficient pour les mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue (BRCA1 muté). Le turnover de la PARylation est très contrôlé pour assurer une réparation efficace. Gatti et al. démontrent que TRIP12 est impliquée ce processus. En effet, via son domaine WWE, TRIP12 interagit et poly-ubiquitine PARP1 ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome¹⁸⁸ (**Figure 33**). L'inhibition de TRIP12 par siARN entraîne une sensibilisation de diverses lignées cancéreuses (U2OS, HeLa, HCC1143 et MCF7) aux inhibiteurs de PARP1. Une fois de plus, TRIP12 limite l'accumulation supra-physiologique d'un acteur de la DDR au niveau des cassures.

v. Via le phospho-protéome de Ku70

Après irradiations induisant des DSB, la protéine Ku70 est phosphorylée sur sa sérine S155²³⁹. En condition de DSB, l'hétérodimère Ku80/70 reconnaît les extrémités libres de la cassure et permet le recrutement des effecteurs de la réparation par⁷⁰. Une étude récente montre qu'après cassures, TRIP12 est à proximité de la forme phosphorylée de Ku70 sur la sérine S155²⁴⁰. Malgré l'absence d'étude fonctionnelle entre les deux protéines, ce travail place encore TRIP12 comme un modulateur de la DDR.

Ces différentes études mettent en évidence la forte implication de TRIP12 dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN. Cependant, ces données soulignent une fonction ambivalente de TRIP12 sur la DDR qui peut être à la fois activatrice^{188,236} ou inhibitrice^{190,205} selon le contexte cellulaire et le substrat associé.

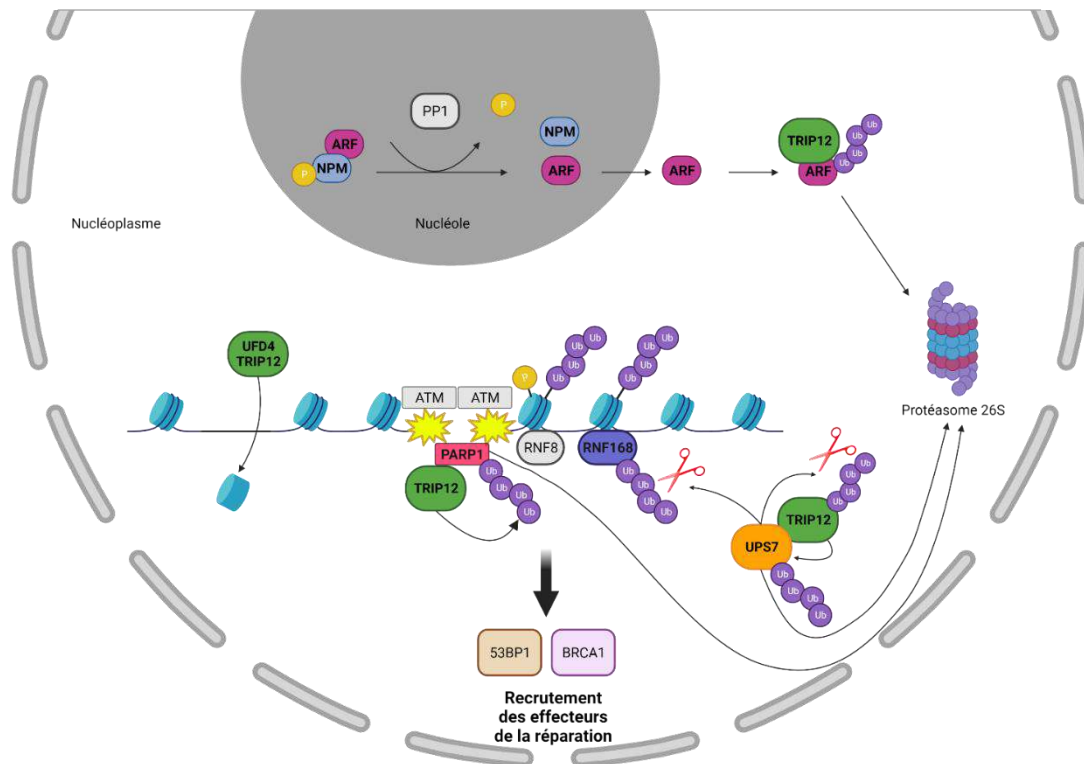


Figure 34 : Représentation schématique de la régulation de la réponse aux dommages de l'ADN par TRIP12

e. L'implication de TRIP12 dans la différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire est un processus via lequel les cellules se spécialisent en un type cellulaire particulier en acquérant une morphologie et des fonctions spécifiques. Plusieurs études démontrent la forte implication de TRIP12 dans ce processus. En effet, TRIP12 est indispensable à l'embryogénèse chez la Souris. Des embryons homozygotes portant une mutation qui inactive l'activité catalytique de TRIP12 présentent un retard de développement dès le stade embryonnaire E8.5 avec une réduction du nombre de somites (structures embryonnaires transitoires donnant naissance aux vertèbres, aux muscles et à la peau) et des malformations placentaires. L'ensemble de ces altérations conduit à une létalité au stade embryonnaire E11.5²³¹. Dans une étude dédiée aux planaires *Schmidtea mediterranea*, vers connus pour leur capacité de régénération accrue, Henderson et al. montrent que la déplétion de l'orthologue de TRIP12, *smed-TRIP12*, empêche la régénération de la région caudale après amputation²⁴¹. Bien qu'aucune mécanistique ne soit décrite dans cet article, les auteurs mettent en avant la nécessité de TRIP12 à la régénération cellulaire des tissus postérieurs. De plus, nos travaux et ceux de nos collaborateurs montrent que TRIP12 est non seulement l'E3 ubiquitine ligase contrôlant la stabilité de deux facteurs de transcription PTF1a¹⁸⁷ et SOX6 (SRY-Box transcription factor 6)²⁰⁶ mais également de FBW7²⁰⁹ (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7). Ces trois protéines sont des protéines régulatrices de la différenciation cellulaire et du développement tissulaire. SOX6 est nécessaire à la différenciation des fibres musculaires squelettiques chez la Souris. PTF1a est un régulateur de la différenciation des neurones GABAergique et du pancréas, tout comme FBW7 qui régule entre autre, la différenciation des cellules pancréatiques canalaire. Ainsi, ces études ancrent profondément TRIP12 comme une protéine-clé dans la régulation de ces processus.

Enfin, il est important de rajouter que TRIP12 est impliquée dans la régulation des complexes SWI/SNF et Polycomb. Ces deux complexes sont très fortement impliqués dans le développement et la différenciation cellulaire^{242,243} et renforcent l'importance de TRIP12 dans le processus de différenciation cellulaire.

III. L'implications de TRIP12 en physiopathologie.

a. Dans les cancers

i. L'altérations du gène et de l'ARNm

La base de données cBioPORTAL recense toutes les mutations et altérations géniques (fusions, délétions, altérations multiples) identifiées chez des patients atteints de cancers²⁴⁴. D'après ces données, 4% des patients présentent une altération au niveau du gène de Trip12. 399 mutations dans la séquence de Trip12 sont identifiées dans différents types de cancers. Le taux de mutation varie entre 11,26% pour les cancers de l'endomètre et tombe à 0,2% pour les cancers thyroïdiens. Parmi ces mutations, 71 correspondent à des variants structuraux et 9 génèrent des formes où uniquement la partie IDR est exprimée (**Figure 34**). Malgré toutes ces mutations, seulement sept études s'y sont intéressées en détail (regroupées dans le **Tableau 5**). De plus, les cohortes étudiées sont le plus souvent petites et aucune analyse fonctionnelle n'a été réalisée pour tenter de définir leur statut « driver » ou « passager », ni pour comprendre les conséquences de telles mutations sur la carcinogénèse.

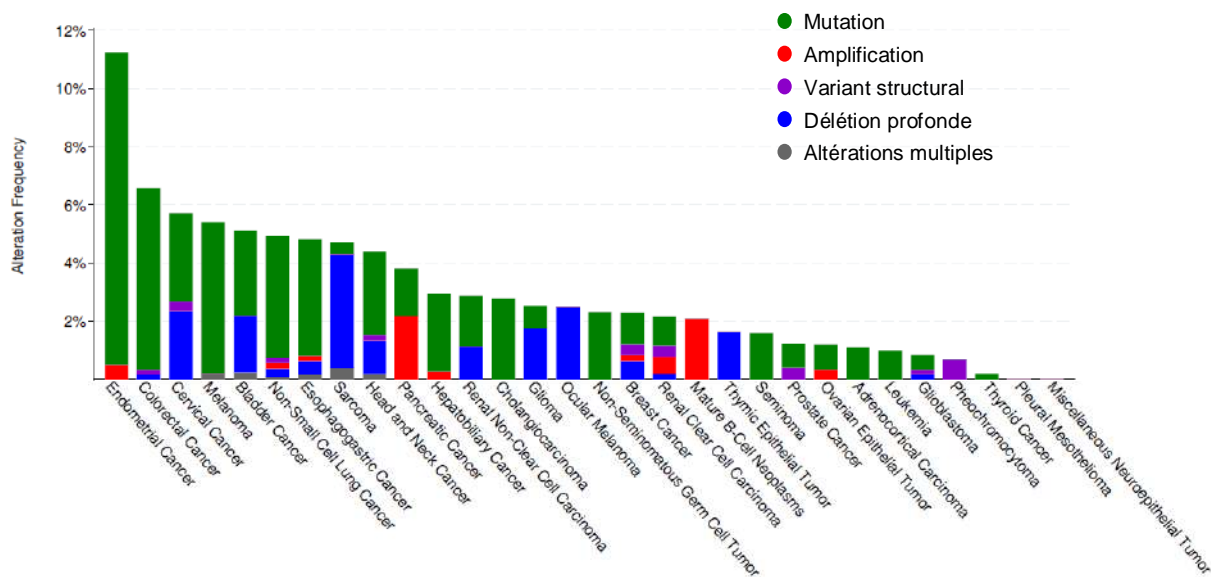


Figure 35 : Représentation schématique des mutations et des variations du nombre de copies du gène Trip12 dans les cancers humains. (sources : cBioPortal)

Types de mutations	Mutation en nt et aa	Localisation	Fréquences	Cancers	Ref.
Insertion	c.273InsA (p.P92TfsX8)	Exon 3	1/27 3,7%	Adénocarcinome gastrique à instabilité micro- satellitaire	245
Délétion	c.3583delT (p.S1195LfsX24)	Exon 24	1/32 3,1%	Adénocarcinome colorectal à instabilité micro- satellitaire	
Substitution (SNP)	g. 230467943 C > A	Intron 1		Cancer du sein	246
Faux-sens	g. 230670518 G > C	Exon 8	9/12	Adénocarcinome pulmonaire	247
Mutation conduisant à saut d'exon	chr2:230725122- 230725247	Exon 2 – Exon 4		Leucémie aiguë myéloïde	248
Faux-sens	c.590C>T (R1595X)	Exon 3	3/20	Carcinome squameux anal	249
Non-sens	c.4783C>T (S197F)	Exon 33			
Délétion	c.5462_5469del	Exon 37			
Fusion	TRIP12-NPM1	Exon 20	1/369	Leucémie aiguë myéloïde pédiatrique	250
Délétion	c.1286_1288delGAA (p. R429del)	Exon 8		Lymphome à larges cellules B	251

Tableau 5 : Mutations du gène *Trip12* et cancers associés.

Peu d'études s'intéresse à la régulation de l'expression de l'ARNm de TRIP12 dans les cancers. La base de données GEPIA répertorie son niveau d'expression dans différents cancers et le compare à des tissus sains²⁵². Elle montre qu'il existe une grosse hétérogénéité d'expression en fonction du cancer étudié. Certains cancers, comme le CP, présentent une surexpression de l'ARNm de Trip12 tandis que d'autres, tels que le cancer du thymus, ont une diminution de l'expression. Gao P. et al. relatent l'existence d'un variant d'épissage correspondant au saut de l'exon 3 chez une patiente en totale rémission d'une leucémie aiguë myéloïde post-traitement²⁴⁸. Sans pour autant réaliser d'étude fonctionnelle sur une cohorte plus grande, les auteurs avancent que cet épissage alternatif pourrait entraîner l'activation de la voie ARF/P53/apoptose en inhibant la dégradation d'ARF transmise par TRIP12.

i. Les altérations de la protéine TRIP12

Il existe très peu de données concernant l'expression protéique de TRIP12 dans les cancers. D'après le Human Protein Atlas qui recense le niveau d'expression protéique dans des tissus humains sains et issus de cancers, l'expression de la protéine TRIP12 est très hétérogène²⁵³ (**Figure 35**). TRIP12 est retrouvée plus fortement exprimée dans les cancers ORL, les gliomes et les cancers testiculaires. En revanche, elle est faiblement retrouvée dans les cancers de la prostate.

A ce jour, seulement sept études démontrent l'implication de TRIP12 dans différents types de cancers.

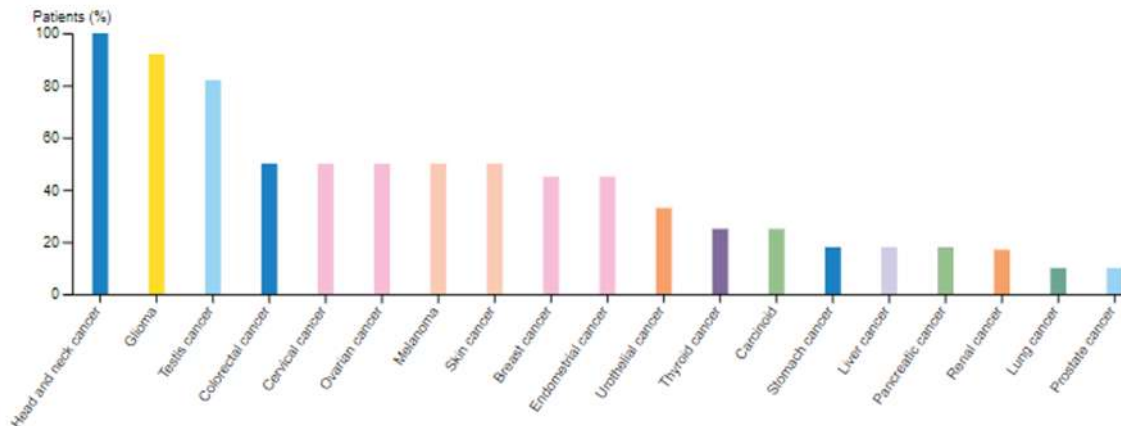


Figure 36 : Histogramme du niveau d'expression de la protéine TRIP12 dans différents types de cancers.

♦ Via la voie ARF/P53

Comme décrit précédemment dans la partie 3.2.c, TRIP12 est un régulateur-clé de la voie de signalisation ARF/P53. Cette voie est très fréquemment altérée dans les cancers, quatre études mettent en évidence le lien entre cancer et l'implication de TRIP12 dans cette voie^{23,28,50,72}. La nucléophosmine (NPM) qui protège ARF de sa dégradation par TRIP12 est mutée dans un tiers des cas de leucémies aiguës myéloïdes. Cette mutation provoque une translocation de NPM dans le cytoplasme. Ainsi, ARF n'est plus maintenu dans le nucléole et elle est dégradée par TRIP12 dans le nucléoplasme. Par conséquent, la voie ARF/P53 est inhibée et la prolifération de cellules issus de leucémies myéloïdes aiguës est favorisée. D'autre part, les travaux de Cai et al. décrivent une surexpression de la déubiquitineuse USP7 dans des tissus de carcinome hépatocellulaire corrélée à un mauvais pronostic. Cette surexpression entraîne une stabilisation de TRIP12 (cf Partie 3.2.d) qui conduit à la dégradation d'ARF via sa poly-ubiquitination favorisant la prolifération cellulaire¹⁹⁸. L'infection par *Helicobacter pylori* est le facteur de risque prédominant pour les cancers gastriques. Par un mécanisme encore inconnu, l'expression de TRIP12 est induite lors de l'infection par cette bactérie via son facteur de virulence CagA (Cytotoxin-Associated Gene A)²⁵⁴. Cette surexpression de TRIP12 est retrouvée chez des patients atteints de cancer gastrique. Elle induit la dégradation de la protéine ARF conduisant à une réduction de l'autophagie, processus essentiel à la prolifération de cellules cancéreuses.

♦ Via la transition épithélio-mésenchymateuse

Dans une étude de 2021, Lee et al. démontrent qu'une expression élevée de l'ARNm de Trip12 est associée positivement à une meilleure survie des patientes atteintes de cancer du sein non métastatique²⁵⁵. Ils mettent en évidence que la déplétion de Trip12 entraîne une transition épithélio-mésenchymateuse via, entre autre, l'induction de l'expression de l'ARNm du facteur de transcription pro-métastatique ZEB1/2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1). Bien que les mécanismes de régulation transcriptionnelle de Trip12 sur les gènes de la TEM ne soient pas élucidés dans l'étude, les auteurs mettent en évidence un rôle inhibiteur de TRIP12 dans la dissémination métastatique des cancers du sein.

♦ Via la radiosensibilisation

L'équipe de HD. Skinner a démontré à deux reprises que TRIP12 est impliquée dans la radiosensibilité des tumeurs ORL en fonction de leur statut pour l'infection par le papillomavirus humain (HPV)^{256,257}. Les patients victimes de cancers tête & cou HPV positifs présentent une meilleure réponse à la radiothérapie et ont une meilleure survie globale comparativement à des patients HPV négatifs. Les patients HPV positifs avec un niveau élevé de TRIP12 ont une survie globale plus courte. Mécanistiquement, l'infection par HPV entraîne une surexpression de la protéine P16 (une protéine CDKi), qui par un mécanisme encore inconnu, déstabilise TRIP12. TRIP12 est une protéine régulatrice de la DDR via le contrôle de la stabilité de RNF168 (Partie 3.II.d.ii) ; sa déstabilisation provoque l'accumulation de RNF168. Ceci conduit à une ubiquitination incontrôlée des histones en réponse aux dommages de l'ADN, une moins bonne efficacité de réparation et donc une sensibilité accrue à la radiothérapie. De cette façon, les auteurs proposent que TRIP12 pourrait être utilisée comme un marqueur prédictif de réponse à la radiothérapie.

♦ Via la sensibilisation aux inhibiteurs de PARPi

L'utilisation des inhibiteurs de PARP est un traitement est en plein essor mais les prédictions de réponses qui reposent sur l'abondance de PARP1 restent encore imprécises. Comme décrit en 3.II.d.iv, TRIP12 limite l'accumulation supra-physiologique de PARP1 au niveau des cassures et réduit ainsi l'efficacité du « piégeage de PARP » par ses inhibiteurs. Gatti et al. proposent que le niveau de TRIP12 pourrait être utilisé comme un marqueur prédictif de sensibilité aux inhibiteurs de PARP en mettant en avant que le niveau de PARP1 est négativement corrélé à celui de TRIP12 dans deux cohortes de patientes atteintes de cancers du sein et des ovaires¹⁸⁸.

b. Dans l'autisme, les déficiences intellectuelles et neurodégénératives

i. Les altérations du gène et de l'ARNm de Trip12

La base de données ClinVar (Clinical Variation) dénombre 98 variants pathogéniques du gène Trip12²⁵⁸. La grande majorité d'entre eux est retrouvée dans des cas de troubles neuro-développementaux. En effet, les mutations du gène de Trip12 sont associées aux désordres neuro-développementaux (OMIM #604506). Plusieurs études mettent en évidence que le gène Trip12 est l'un des plus mutés dans les cas de déficiences intellectuelles (DI)^{259,260}. Les DI sont les désordres développementaux les plus communs, elles touchent 1 à 3% de la population mondiale. Quatre publications relient des mutations dans le gène Trip12 aux troubles autistiques²⁶⁰⁻²⁶³. Par ailleurs, des altérations du gène Trip12 sont référencées comme une cause du syndrome de Clark-Baraitser²⁶⁴⁻²⁶⁶ (CLABARS; OMIM617752). Le tableau clinique de ce syndrome est caractérisé par une DI, accompagnée ou non de trouble du spectre autistique, un retard dans l'acquisition de parole, une altération du comportement et une dysmorphie cranio-faciale. Pour le diagnostic de ce syndrome, van der Laan et al. ont développé une signature épigénétique spécifique qui repose sur le profil de méthylation de l'ADN associés aux variants pathogéniques de TRIP12²⁶⁵. Enfin, une étude récente a recensé 54 variants de Trip12 à partir des données de littérature et grâce à une nouvelle cohorte de 38 individus atteints de DI²⁶⁶. Parmi ces différentes mutations, 11 sont des mutations non-sens génératrices des protéines tronquées (**Figure 36**). Il est intéressant de noter que toutes ces mutations non-sens peuvent générer des formes catalytiquement inactives de TRIP12 et que cinq d'entre elles génèrent une protéine avec uniquement le domaine IDR de

TRIP12. Connaissant l'implication de l'IDR dans l'interaction de TRIP12 avec la chromatine, cette donnée suggère une fonctionnalité de l'IDR dans la pathogénicité de ces mutations dans le syndrome de Clark-Baraitser.

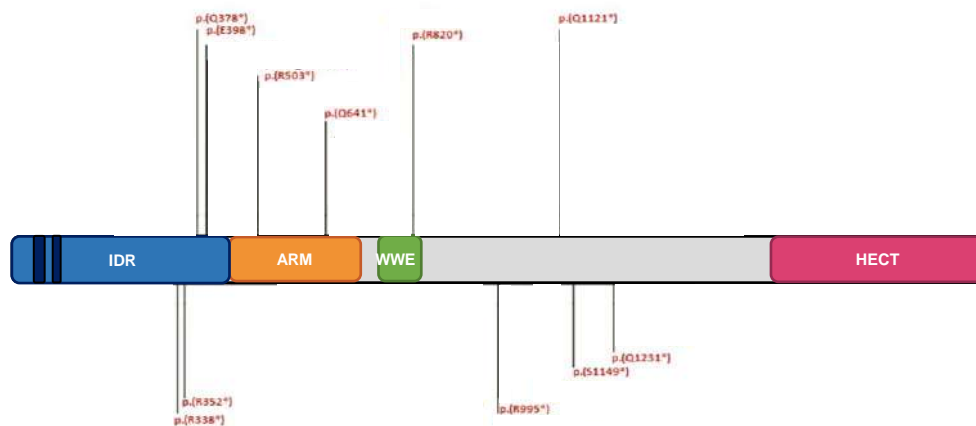


Figure 37 : Représentation schématique des mutations non-sens répertoriées dans les déficiences intellectuelles, autisme et syndrome de Clark-Baraitser. (Adapté de Aeder et al. 2023).

Toutes ces études démontrent que TRIP12 est un gène-clé dans les troubles neuro-développementaux. Cependant, ces études ne sont que descriptives et ne mettent pas en évidence les conséquences de ces mutations sur les processus cellulaires impliqués dans le développement de ces troubles.

ii. Les altérations de la protéines TRIP12

A ce jour, une seule étude relate une augmentation de l'expression protéique de TRIP12 dans le cerveau issus de patients atteints de forme sporadique de la maladie de Parkinson¹⁹⁴. Un stress du réticulum endoplasmique (caractéristique de la maladie) induit l'expression de l'ARNm de Trip12 via le facteur de transcription ATF6 (Activating Transcription Factor 6). La protéine TRIP12 se retrouve localisée dans le réticulum endoplasmique où elle poly-ubiquitine la glucocérébrosidase (GC) sur la lysine K293. Les agrégats d' α -synucléine, caractéristiques de la maladie de Parkinson, dépendent du niveau de la GC (relation inconnue), moins il y a de GC, plus il y a d'agrégats d' α -synucléine. L'étude révèle que la déplétion de TRIP12 dans le striatum de modèles murins de la maladie de Parkinson prévient la neurotoxicité des agrégats d' α -synucléine via le rétablissement des niveaux de GC. Cette inhibition a un effet protecteur contre la neurodégénération des neurones dopaminergiques, caractéristique de la pathologie. Par cette étude, TRIP12 se positionne comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour la maladie de Parkinson.

Chapitre 2 : Résultats expérimentaux

Partie 1 : Les objectifs des travaux de thèse

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse consacre une partie de ses recherches sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogénèse pancréatique. En 2014, le groupe a identifié TRIP12 comme l'E3 ubiquitine ligase responsable de la dégradation de PTF1a, un facteur de transcription pancréatique essentiel au maintien du phénotype acinaire¹⁸⁷. Depuis ce jour, TRIP12 est au cœur des recherches de mon équipe.

I. Les rôles de TRIP12 dans l'organisation de la chromatine

Plusieurs études mettent en évidence l'implication de TRIP12 dans le remodelage de la chromatine via son activité d'E3 ubiquitine ligase. Elle contrôle notamment la stabilité de protéines impliquées dans l'homéostasie des complexes SWI/SNF et Polycomb (cf. Partie 3.II.b)^{203,207}. Des travaux précédents de l'équipe ont démontré que TRIP12 possède une région intrinsèquement désordonnée de 440 acides aminés à son extrémité N-terminale. Cette IDR confère à TRIP12 la capacité d'interagir avec la chromatine. De plus, cette étude apporte les premières indications suggérant un rôle de TRIP12 sur l'organisation de la chromatine¹⁸⁵.

De ces données préliminaires découlent mes objectifs de thèse qui étaient de caractériser le rôle de TRIP12 sur l'organisation globale de la chromatine et de comprendre les conséquences fonctionnelles de l'action de TRIP12 sur des processus biologiques nucléaires tels que la réparation des cassures de l'ADN.

Ces travaux constituent la partie principale de ma thèse et font l'objet de la rédaction d'un article en cours de finalisation intitulé : « **The intrinsically disordered region of the E3 ubiquitin ligase TRIP12 induces the formation of chromatin condensates and perturbs important cellular processes.** » (*Chapitre 2. Partie 2. I*) dans lequel je suis première auteure. Cette partie sera complétée par des résultats complémentaires sur l'implication de TRIP12 dans les mécanismes de détection des dommages à l'ADN.

II. Les rôles de TRIP12 dans l'initiation et la progression de l'adénocarcinome pancréatique

D'après les différentes bases de données, l'expression de l'ARNm de Trip12 est augmentée chez des patients atteints de CP (Chapitre 1 Partie 3.III.A.i). De plus, l'équipe a démontré que TRIP12 dégrade PTF1a¹⁸⁷. Considéré comme un suppresseur de tumeur, l'expression de PTF1a est perdue dès les premières étapes de la carcinogénèse pancréatique et sa ré-expression permet la redifférenciation de cellules préneoplasiques en cellules acinaires^{267,268}. De plus, TRIP12 contrôle la stabilité de FBW7 qui régule entre autre, la différenciation des cellules pancréatiques canalaire²⁰⁹ et dont l'expression réduite participe à la carcinogénèse pancréatique²⁶⁹. Malgré cela, l'implication de TRIP12 dans la carcinogénèse pancréatique reste peu décrite. Ainsi, l'objectif de cette étude était de déterminer l'implication de TRIP12 dans l'initiation du cancer du pancréas grâce au développement de modèles murins invalidés pour le gène Trip12.

Ces travaux constituent une partie annexe de ma thèse et font l'objet de la rédaction d'un article en cours de finalisation intitulé : « **The E3 ubiquitin ligase TRIP12 is required for pancreatic acinar cell plasticity and pancreatic carcinogenesis.** » (cf *Chapitre 2. Partie 2. III*). Je suis deuxième auteure dans ce papier, position justifiée par ma participation :

- aux discussions, à l'interprétation et à la critique de l'ensemble du manuscrit.
- aux prélèvements des pancréas de souris.
- à la mise en place et à l'optimisation du protocole d'extraction, de mise en culture et de transdifférenciation des acini issus des modèles murins (Figure 2).
- à la validation des modèles murins et des lignées murines par RT-qPCR et Western blot (Figure 5).
- à la mise en place des tests de migration et d'invasion des lignées cellulaires murines (Figure 5).

III. La rédaction d'une revue de la littérature sur l'E3 ubiquitine ligase TRIP12

La pandémie de COVID-19 a entraîné la fermeture du laboratoire (Mars à Mai 2020) lors de ma première année de thèse. En 2020, aucune revue concernant TRIP12 n'était disponible dans la littérature. Nous avons décidé de mettre à profit cette période pour en rédiger une dans laquelle je suis co-première auteure. Nous l'avons intitulée « **E3 ubiquitine ligase TRIP12 : Regulation, Structure and Physiopathological Functions** » et l'avons publiée cette même année dans le journal « *International Journal of Molecular Sciences* ».

Ma participation a consisté :

- à l'élaboration du plan, à la création des illustrations et aux diverses discussions concernant la revue.
- à la rédaction de la partie concernant les domaines protéiques, leur conservation et la partie sur le rôle de TRIP12 dans le remodelage de la chromatine.

Cette revue a servi de support à la partie introductive sur TRIP12 (*Chapitre 1 Partie 3*) de cette thèse.

Partie 2 : Les publications et les résultats complémentaires

I. Article n°1: The intrinsically disordered region of the E3 ubiquitin ligase TRIP12 induces the formation of chromatin condensates and interferes with DNA damage response.

AUTHORS

Claire Vargas¹, Manon Brunet¹, Alban Ricard¹, Damien Varry¹, Dorian Larrieu¹, Fernando Muzzopappa², Fabian Erdel², Guillaume Labrousse¹, Naïma Hanoun¹, Laetitia Ligat¹, Manon Farcé¹, Odile Shiltz-Burlet³, Alexandre Stella³, Henrik Laurell⁴, Nicolas Bery¹, Pierre Cordelier¹, Marlène Dufresne¹ and Jérôme Torrisani^{1*}.

¹. CRCT, Université de Toulouse, Inserm, CNRS, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, 31100 Toulouse, France

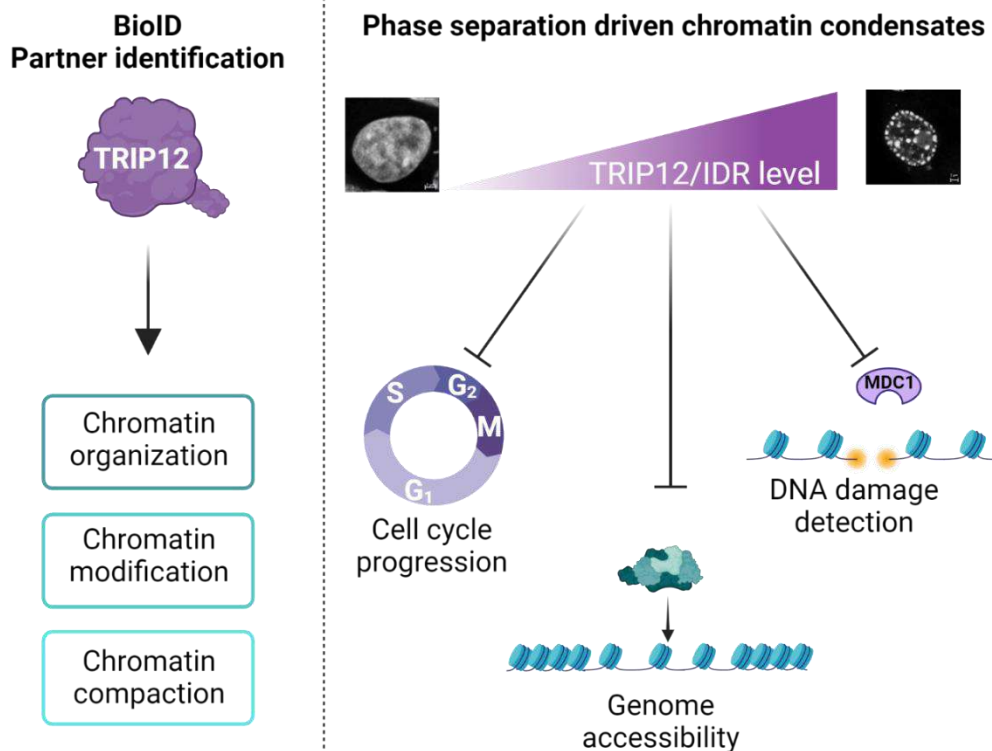
². Unité de Biologie Moléculaire, Cellulaire et du développement. Centre de Biologie Intégrative, Université de Toulouse, CNRS, UPS, 31062 Toulouse, France

³. Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale–CNRS, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, 31400 Toulouse, France

⁴. Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM U1048, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, 31400 Toulouse, France

*: To whom correspondence should be addressed. Tel: +33582741644; Email: jerome.torrisani@inserm.fr

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Chromatin compaction is crucial for the expression and integrity of the genome. We previously showed that the nuclear HECT-type E3 ubiquitin ligase Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 (TRIP12) is tightly associated to chromatin. Overexpressed in several types of cancers, we explored herein the consequences of a TRIP12 overexpression on chromatin homeostasis. First, we established TRIP12 proxisome by BioID and unveiled its pleiotropic role in chromatin regulation. Second, we demonstrated that an overexpression of TRIP12 leads to the formation of chromatin condensates enriched in heterochromatin marks via its intrinsically disordered region. We further discovered that the formation of TRIP12 mediated-chromatin condensates is highly dynamic and driven by a mechanism of phase separation. Chromatin condensates formation is dependent not only on the concentration, the length of TRIP12-IDR but also electrostatic interactions. Chromatin compaction is a determinant parameter in several biological processes. We measured that the formation of TRIP12 mediated-condensates alters cell cycle progression, genome accessibility, transcription as well as DNA damage response by inhibiting the accumulation of Mediator DNA Damage Checkpoint 1. Altogether, this study reveals a novel dynamic role for TRIP12 in chromatin compaction independently of its ubiquitin ligase activity with important consequences on cellular processes.

INTRODUCTION

Chromatin is classically classified in two main categories: the euchromatin and the heterochromatin. The euchromatin is composed of transcriptionally active-relaxed chromatin that is modified by specific histone marks (e.g.: H3K27ac). In contrast, the more compacted heterochromatin contains less active genes and is enriched in different histone marks (e.g.: H3K9me3). Chromatin compaction is known to condition a multitude of biological processes such as gene expression by modulating the accessibility of the genome to transcriptional machinery. It also participates in the efficacy of the DNA damage response (DDR)^{1,2}. Although largely studied, proteins and mechanisms that controls the chromatin compaction are not entirely discovered.

TRIP12 for Thyroid hormone Receptor Interacting protein 12 is a E3 ubiquitin ligase that belongs to the important ubiquitin-proteasome system. TRIP12 is a nuclear protein that has been involved in several biological processes such as the control of cell proliferation³, DDR^{4,5} and cellular differentiation⁶⁻⁸. Importantly, TRIP12 has been implicated in all of these processes via the action of its HECT (Homologous to E6-AP carboxyl-terminus) ubiquitinating catalytic domain^{6,8}. For instance, we previously discovered that TRIP12 participates in pancreatic differentiation by inducing the degradation of the transcription factor PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1A)⁸. Moreover, TRIP12 regulates the chromatin remodeling by controlling the stability of BAF57 (Brg1 associated factor 57), a component of the SWI/SNF (switch/sucrose non-fermenting) complex⁹. TRIP12 ensures the degradation of ASXL1 (Additional Sex Comb Like 1), a key regulator of PRC1 (Polycomb Repressing Complex 1) and it is also present in the interactome of the PRC components such as EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (Suppressor of Zeste 12 protein homolog) and EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2)¹⁰⁻¹². TRIP12 induces the degradation of the transcription factor YY1 (Ying Yang 1), a key component of the INO80 remodeling complex¹³. The implication of TRIP12 in chromatin homeostasis is also supported by the fact that TRIP12 is one of the most abundant interacting partners of the histone H2B¹⁴.

Our previous study identified an intrinsically disordered region (IDR) at the N-terminal extremity of TRIP12 that ensures its tight interaction with chromatin¹⁵. IDR are protein sequences that lack tertiary structure and are enriched in positively-charged amino acids¹⁶. Despite their presence in almost half of the proteome, their size varies from several residues to serve as linkers between structured domains to several hundred residues to facilitate interactions with nucleic acids or proteins¹⁶. IDR containing-proteins also participate in chromatin organization and gene expression by inducing biophysical processes such as liquid-liquid (LLPS) or polymer-polymer (PPPS) phase separation (e.g.: BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) and MED1 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1))^{17,18,19}.

TRIP12 alterations have been involved in several pathologies. Indeed, TRIP12 gene mutations are tightly associated to intellectual disabilities such as Clark-Baraitser syndrome^{20,21} and autism spectrum disorders²²⁻²⁴. We (Personal unpublished data) and others have also reported that TRIP12 protein is overexpressed in several types of cancer and preneoplastic lesions^{3,25}.

In this study, we decided to better understand the modes of action and the consequences of TRIP12 overexpression on chromatin homeostasis. We confirmed the pleiotropic role for TRIP12 in chromatin organization but more importantly, we discovered the implication of its IDR in the formation of chromatin condensates with important consequences on DDR.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and treatments

HelaS3 (ATCC CCL-2™), HEK-293T (CRL-3216™), U2OS (HTB-96™), HCT-116 (CCL-247™) and H2B-dsRed HelaS3¹⁵ cells were grown in DMEM 4.5 g/L glucose medium and hTERT RPE-1 (CRL-4000™) were grown in advanced DMEM/F-12 4.5 g/L glucose medium both supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine and antibiotics (Life Technologies) at 37°C in humid atmosphere with 5% CO₂. Cells were routinely tested for mycoplasma contamination. HelaS3 cells were treated either with 10 μM 5-ethynyl 2'-deoxyuridine (EdU) (Invitrogen) for 15 min. The EdU incorporation was visualized using Click-It™ EdU Alexa Fluor™ 647 Imaging kit (Invitrogen). HelaS3 were treated with 1% of 1,6-Hexanediol (Tocris 7046) or vehicle for 18 h at 37°C. Cell lines were X-irradiated at 1 Gray with a XRAD SmART irradiator device.

Generation of inducible GFP-degrader Hela S3 cell line

Full-length VHL (Von Hippel-Lindau) cDNA (amino acids 1-213) was cloned into *Pml I/Xho I* sites of the pEF empty plasmid. NbGFP4 nanobody cDNA²⁶ was inserted into pEF-VHL-MCS using *Nco I/Not I* sites. A FLAG-tag was added by PCR at the C-terminal end of the NbGFP4 degrader plasmid. VHL-NbGFP4-FLAG sequence was subsequently cloned into TLCV2 lentivector (Addgene #87360²⁷) by PCR using *Age I/Nhe I* sites. Lentiviral production is described in a following section. HelaS3 cells were transduced for 48 h in 6 well plate in 1 ml of medium containing 8 μg/mL of polybrene (Sigma-Aldrich). VHL-NbGFP4-FLAG HelaS3 cell line was obtained after selection with 1 μg/mL of puromycin (Invivogen).

Plasmids generation and transient cell transfection

pcDNA.6.2-C-EmGFP-TRIP12, pcDNA.6.2-C-EmGFP-TRIP12-C1959A, pcDNA.6.2-C-EmGFP-ΔHECT, pcDNA.6.2-C-EmGFP-ΔIDR, pcDNA.6.2-C-EmGFP-IDR, pcDNA.6.2-C-EmGFP-ARM-WWE, pcDNA.6.2-C-EmGFP-ΔIDR/ARM/WWE/HECT, pcDNA 6.2-C-EmGFP-HECT, pcDNA 6.2-C-EmGFP-(1-325), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(107-445), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(1-208), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(108-325), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(208-445), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(1-107), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(108-207), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(208-324), pcDNA 6.2-C-EmGFP-(325-445) constructs were already described¹⁵. pEGFP-C2-MDC1 and pAc-GFP-TRIP12 plasmids that encodes a 2040 aa isoform of TRIP12 were obtained from Dr J. Lukas (Copenhagen, Denmark). Cysteine C2025 catalytic site was mutated in alanine by site directed mutagenesis as previously described⁸. pstv6-NBirA* DEST and NBirA*-FLAG-EGFP-NLS plasmids were obtained from Dr AC. Gingras (University of Toronto, Canada)¹⁴. pDONR-201-TRIP12 containing human TRIP12 cDNA (1992 aa isoform) was previously described⁸. TRIP12 cDNA was transferred in pstv6-NBirA*-pDest using Gateway strategy (Invitrogen) to generate pstv-NBirA*-FLAG-TRIP12 plasmid. MED1-IDR containing plasmid was obtained from Addgene #145276 and inserted into pcDNA™6.2-C-EmGFP-DEST supplemented with the Simian Virus 40 NLS sequence by Gateway strategy (Invitrogen) using primers described in Suppl. Table 1. GFP-DNMT1 plasmid was obtained from Dr M. Szyf (University McGill, Montreal, Canada). RFP-H2B and H2B-GFP plasmids were a gift from Dr D. Llères (Institute of Molecular Genetics of Montpellier, France). The plasmid pDest-RFP-C1 was obtained from Dr. T. Johansen (Tromsø, Norway). The insertion TRIP12 cDNA and its IDR into the pDest-RFP-C1 plasmid was performed using Gateway strategy (Invitrogen) to generate the pDest-RFP-TRIP12 and pDest-RFP-IDR plasmids.

The different plasmids were transiently transfected in HeLaS3 or VHL-NbGFP4-FLAG HeLaS3 cells using jetPRIME® transfection kit (Polyplus) following manufacturer's recommendations. Medium was changed 4h post transfection. Cells were fixed after 24h or visualized by microscopy.

Lentivirus production and cell transduction

Generation of lentiviral particles was adapted from the protocol described in ²⁸. Briefly, HEK-293T were transfected using jetPRIME® transfection kit (Polyplus) with 6 µg of pstv6-NBirA*-FLAG-TRIP12 or pstv6-NBirA*-FLAG-EGFP-NLS, 4 µg of psPAX2, 1.5 µg of pMD2.G and 23 µL of jetPRIME® reagent. After 48 h, supernatants were collected, centrifuged and filtered through a 0.45 µm filter (Millipore). The supernatants were concentrated using Sartorius Vivaspin™ 20 centrifugal concentrator. HeLaS3 cells were seeded at a density of 10⁴ cells per well in a 48 well-dish. After 24 h, cells were incubated with 125 µL of concentrated virus in the presence of protamine sulfate (4 µg/mL) for 48 h. Transduced cells were selected using 1 µg/mL of puromycin (InvivoGen).

Live cell microscopy

For cell cycle monitoring, cells were grown on 6-well plates (Corning) in DMEM medium without phenol red (Gibco-BRL). One µg of H2B-GFP or IDR-GFP plasmids was transfected as described above. Twenty-four hours after transfection, cells were imaged and classified in three categories (low, moderate, high) depending on their GFP fluorescence intensity determined by an InCuCyte Zoom apparatus (Sartorius). Eleven to twelve cells for each category were monitored during 30 h. For analysis of chromatin condensates dynamics, HeLaS3 or VHL-NbGFP4-FLAG HeLaS3 cells were grown on µ-slide 4 well (IBIDI) in DMEM medium without phenol red (Gibco-BRL). 0,25 µg of IDR-GFP plasmid was transfected as described above. One hour before image acquisition, 500 nM of SiR-DNA (SC007, Spirochrome) were added to the medium to visualize DNA. For analysis of chromatin condensates reversibility, 1 µg/mL of doxycycline was added to induce VHL-NbGFP4-FLAG degrader expression. Images were acquired every hour (5 fields, 40x) using an Operetta® CLS high content analysis system (Perkin-Elmer). Fluorescent intensity was quantified using Harmony High-Content Imaging and Analysis Software (PerkinElmer) and FIJI software.

Immunofluorescence and DNA granularity quantification

Cells were grown on cover slips then fixed using with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.125% Triton X-100™. Cover slips were saturated using 5% BSA-PBS for 1 h and incubated with primary antibodies (Suppl. Table 2) overnight at 4°C. After three washes, cells were incubated with appropriate secondary Alexa Fluor®-488 anti-goat, Alexa Fluor®-555 anti-mouse/rabbit or Alexa Fluor®-647 anti-rat antibodies (Suppl. Table 2) for 2 h at room temperature. Nuclei were counterstained with 1 µM DAPI for 5 min at room temperature. Cover slips were mounted on glass slides using Fluorescent Mounting Medium (DAKO). Fluorescence was visualized using LSM 780 or 880 Fast Airyscan confocal microscope (Zeiss) with a 63x NA 1.4 oil-immersion objective and analyzed using Zen software (Zeiss). For DAPI granularity quantification, images of individual cells were acquired using a LSM880 confocal microscope (Zeiss) (500 x 500 pixels). Each nucleus was manually defined as a region of interested (ROI). The granularity was defined by a coefficient of variation (CV) obtained by dividing the mean of all pixel integrated intensity of the ROI by the standard deviation as previously described²⁹. For simplification, the slope value was defined as the leading coefficient of the linear regression curve

multiplied by 10^7 . The determination of cell cycle phase by immunofluorescence using CYCLIN A, EdU staining was previously described¹⁵.

Subcellular fractionation and Western blot analysis

Cells were incubated in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1,5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5% NP-40®, 0,5 mM PMSF and 10 µl/mL protease inhibitors (Sigma-Aldrich). After 10 min-incubation on ice, samples were centrifuged. Supernatants containing cytosolic proteins were discarded. Nuclear pellets were lysed with 200 mM Tris-HCl (pH7,5), 0.25% glycerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM PMSF, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.4 M NaCl and 10 µl/mL protease inhibitors. After 15 min-incubation on ice, samples were centrifuged. Supernatants containing nuclear proteins were collected. For total protein extraction, cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidet P-40 and 10 µl/mL protease inhibitors) for 20 min on ice. Cell lysates were sonicated 3 x 5 sec at 50% intensity (Vibra-Cell™) and centrifuged at 12 000 rpm. Proteins were denaturated in Laemmli buffer at 95°C for 5 min. Proteins were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (BioRad) using TransBlot Turbo apparatus. After membrane saturation and incubation with primary/secondary antibodies (Suppl. Table 2), protein expression was detected using Clarity™ Western ECL Substrate (BioRad) and Chemi-Doct™ XRS+ BioRad apparatus.

FRAP and half-bleached FRAP analysis

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) and half bleached FRAP experiments were conducted using a confocal LSM 780 microscope (Zeiss). Bleaching was performed using 488 nm laser at 100% power and images were collected every two seconds. Fluorescence recovery intensity was measured using ZEN Module FRAP Efficiency Analysis. The half-bleached FRAP analysis was performed as previously described³⁰.

BioID streptavidin pull-down purification

pstv6-NBirA*-FLAG-TRIP12 HeLaS3 stable cell line was generated as described below and validated by Western blot, RT-qPCR and immunofluorescence after the addition of doxycycline (1 µg/mL). pstv6-NBirA*-FLAG-TRIP12 cells were incubated with 1 µg/mL of doxycycline and 50 µM of biotin (Sigma-Aldrich) for 24 h. During the last 15 h, cells were treated with 1.25 µM of a proteasome inhibitor MG-132 (Sigma-Aldrich). After four PBS washes, cells were scrapped in 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1,5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 5 mM DTT, 0,5% NP-40®, 0,5 mM PMSF and 10 µl/mL protease inhibitors (Sigma-Aldrich). After 10 min-incubation on ice, samples were centrifuged (15 min at 2 000 rpm, 4°C). Supernatants containing cytosolic proteins were discarded. Nuclear pellets were lysed with a modified RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5 % sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100™ and 10 µL/mL protease inhibitors). Nuclear lysates were sonicated (5 x 6 sec at 25% intensity) using Vibra-Cell™ sonicator and centrifuged (20 min at 10.000 rpm, 4°C). Clarified lysates were incubated with 40 µl of Thermo Scientific™ Pierce™ Streptavidin Magnetic Beads overnight at 4°C. Beads were washed with different buffers (1 M KCl, 0.1 M Na₂CO₃, 2M urea, modified RIPA) and eluted in 5% SDS, 10% glycerol, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20 mM DTT and 2 mM biotin. Four independent biotin pull down experiments were performed.

Label free mass spectrometry identification (LC MS/MS)

Each sample was in 35 µL of 5% of SDS. The protein solutions were reduced and alkylated with a solution 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), 400 mM chloro-acetamide for 5 min at 95°C. The proteins were acidified with a final concentration of 1.2% phosphoric acid and diluted with 7 volumes of Strap buffer (90% methanol, 100 mM triethylammonium bicarbonate (TEAB), pH 7.1). The samples were transferred into S-Trap Micro Spin columns (Protifi), trapped in filter by centrifugation at 4,000 g for 1 min, washed 3 times with 150 µl of S-Trap buffer and centrifuged at 4,000 g for 1 min. Proteolysis was performed by the addition into the S-Trap cartridge of 0.8 µg trypsin (20 µl in 50 mM ammonium bicarbonate) followed by 1 h-incubation at 47°C. Peptide extraction was performed using three steps of elution : 80 µL ammonium bicarbonate 50 mM, 80 µl 0.2% formic acid and 40 µl of acetonitrile 50 % /formic acid 0,2%, with centrifugations at 4,000 g for 1 min. To highlight the TRIP12 proxisome, a ratio of 4 and a p-value of 0.05 were applied. The list of proteins identified was compared with the list of contaminants (CRAPome) commonly found in similar approaches³¹. Proteomic data are accessible on PRIDE with the following accession number PXD: xxxxx (pending).

Chromatin accessibility by ATAC-seq

Genomic accessible regions were determined by two ATAC (assay for transposase accessible chromatin)-seq experiments performed by the epigenetic services of Active Motif. Briefly, HeLaS3 cells were transfected with IDR-GFP construct using jetPRIME® transfection reagent (Polyplus). After 24 h, GFP-expressing cells were sorting by cytometry using FACS Melody apparatus (BD Biosciences). 10⁵ GFP-highly positive and GFP-negative (used as controls) cells were collected. Samples were frozen accordingly to the manufacturer's instructions in an ice-cold cryopreservation solution and stored at -80°C until shipping. ATAC-seq reads were generated using Illumina sequencing (NextSeq 500) and were mapped to the hg38 human reference genome using BWA algorithm. MACS peak calling algorithm was used to identify the regions with high levels of tagging events. Only merged accessible regions with Max tag >50 were considered. Data are available in (#xxxxxx)(pending).

RNA expression by RNA-seq analysis

Total RNA was isolated from HeLaS3 cells transfected or not with IDR-GFP plasmid that were used for ATAC-seq experiments using TRIzol® Reagent (Life Technologies) according to supplier's recommendations. Quality and quantity of total mRNA was ensured by Agilent 5400 Fragment Analyzer system. Paired-end (PE150) sequences were generated using a NovaSeq 6000 apparatus (Illumina) by Novogen (Cambridge, UK). Paired reads were aligned and mapped on *Homo Sapiens* reference genome (GRCh38.p14) using STAR software. Data analysis with normalization was performed using the R software, Bioconductor packages including DESeq2 and SARTools R³². Sequences corresponding to IDR-GFP mRNA were discarded from the analysis. Experiments were performed in duplicate. A p-value adjustment was performed to consider multiple testing and control the false positive rate. A BH p-value adjustment was performed and the level of controlled false positive rate was set to 0.05. Data are available on GEO Omnibus data depository (#xxxxxx)(pending).

UV-laser micro-irradiation

HeLaS3 cells were transiently transfected with appropriate plasmids as described above. After 24 h, cells were photo-sensitized with Hoeschst (Life technologies) (0.25 µg/mL) for 10 min in phenol red-free complete DMEM medium (Gibco-BRL). UV-irradiation (405 nm) was performed using FRAP module of LSM 780 Zeiss confocal microscope (10 iterations, power 100%, obj x40) in a 37°C atmosphere with 5% CO₂. Images were acquired every 30 sec for 60 cycles. Irradiation was performed after the 3 or 4 first acquisitions. The quantification of GFP-MDC1 recruitment on irradiated zones was done using FIJI software following procedures described in³³.

Bioinformatics analyses

Gene ontology enrichment and protein function networks were established using Gene Ontology (<http://geneontology.org>), Metascape (<https://metascape.org>) and String (<https://string-db.org>) software. Isoelectric point (pI) of TRIP12 fragments inserted in pcDNA6.2 EmGFP vectors was calculated using ExPasy-Compute pI/MW tool (GFP protein sequence was omitted for the calculus). Natural disordered regions were predicted using PONDR VSL2 website (<http://pondr.com>).

Statistical analyses

For correlation determination, a Spearman r coefficient test (two tailed p value) was used with GraphPad Prism 9.5.0 software. For MDC1 and γH2AX foci number comparison, one way-ANOVA statistical test followed by multiple comparisons was used. For granularity comparison in presence or not of 1,6-hexanediol, an unpaired t test was used. *, **, *** and **** correspond to a p value <0.05, 0.01, 0.005 and 0.001, respectively.

RESULTS

TRIP12 is implicated in global chromatin organization and compaction networks.

TRIP12 ubiquitin ligase has been involved in numerous nuclear functions³⁵ and retrieved as a prey in numbers of BioGrid interactomes, in particular of two chromatin remodeling complexes (SWI/SNF and PRC2)^{9,11,12}. However, a protein partners network of TRIP12 used as a bait, has never been established. To fill this lack, we established a TRIP12 proxisome by biotinylation-based identification (BioID) that identifies partners at the vicinity (~15 nm) of a protein of interest. TRIP12 was N-terminally fused to the biotin ligase NBirA*(R118G)-FLAG protein (**Fig. 1A**) and stably expressed in HeLaS3 cells after doxycycline addition (**Fig. 1B**). We verified the nuclear localization of the fusion protein and the incorporation of biotin in response to doxycycline (**Fig. 1A, left panel**). More importantly, we ensured a moderate expression of BirA*-FLAG-TRIP12 relatively to the endogenous TRIP12 protein to limit non-specific proteins identification (**Fig. 1B and Suppl. Fig. 1A**). We also verified a chromatin-bound localization of the fusion protein on metaphasic chromosome (**Fig. 1A, right panel**). After streptavidin-beads pull-down, purified proteins identification and abundance were determined by label-free mass spectrometry (**Suppl. Fig. 1B**). A total of 328 proteins statistically enriched at the vicinity of BirA*-FLAG-TRIP12 were identified (**Fig. 1C + Suppl. Table 3**). A subset of them were arbitrarily picked and validated by Western blot analysis (**Suppl. Fig. 1C**). Among identified proteins, 18 were in common with TRIP12 BioGrid interactors such as EZH2 (Enhancer of Zest Homologue 2), SMARCE1 (SWI/SNF-Related Matrix-Associated Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily E Member 1) or BRD4 (Bromodomain Containing 4) (**Suppl. Fig. 1D**). A gene ontology analysis revealed that the most statistically enriched gene categories are “chromatin organization” and “histone modification” (**Fig. 1D**). In parallel, a Metascape analysis identified several functional networks among which the most statistically relevant correspond to chromatin organization, histone post-translational modifications, RNA splicing, epigenetic regulation and chromatin remodeling (**Fig. 1E**). In addition, a String analysis confirmed the close proximity of TRIP12 to proteins belonging to PRC and SWI/SNF complexes but also to other remodeling complexes such as SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase), NURD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) and MLL1 (mixed lineage leukemia protein-1) (**Fig. 1F**). Of note, the three mammal isoforms (α , β , γ) of the HP1 (heterochromatin protein 1) were present in TRIP12 proxisome (referenced as CBX5, CBX1 and CBX3 in **Suppl. Table 3**). Altogether, our results confirmed the tight implication of TRIP12 in global chromatin reorganization and compaction networks.

TRIP12 overexpression modifies the repartition of chromatin independently of its catalytic activity.

Proxisome identification confirmed a pleiotropic implication of TRIP12 in chromatin organization. Interestingly, a microscopic observation of the cell line used for the BioID identification revealed a clear modification of DAPI repartition in response to NBirA*-FLAG-TRIP12 expression. Exogenous TRIP12 co-localized with large chromatin condensates and perinucleolar heterochromatin regions (**Fig. 2A, left panel**). These modifications were not observed after NBirA*-FLAG-EGFP-NLS expression (**Fig. 2A, right panel**). Therefore, we decided to further investigate the consequences of a TRIP12 overexpression on global chromatin organization. We expressed different TRIP12-GFP protein constructs in HeLaS3 cells (**Fig. 2B**). Due to the heterogeneity of transient plasmid transfection, we obtained cell populations expressing a different level of GFP (**Fig. 2C**). In low GFP expressing cells, nuclear TRIP12 was enriched on perinucleolar heterochromatin regions (**Fig. 2A, left panel**). Interestingly, in moderate GFP expressing cells, an enlargement of perinucleolar and perinuclear heterochromatin regions

concomitantly with a formation of large isolated chromatin condensates was observed (**Fig. 2C, left panel**). In high GFP expressing cells, the nucleus was filled with a constellation of large chromatin condensates. A quantitative analysis demonstrated a statistical positive correlation between the level of TRIP12-GFP expression and the DAPI granularity (slope: 45) that reflects the capacity of GFP constructs to modify chromatin (**Fig. 2D, left graph**). Of note, the formation of TRIP12-mediated chromatin condensates was not dependent of the position of the GFP nor the isoform of TRIP12 as the 2040 aa-TRIP12 isoform³⁵ with the GFP at the N-terminal extremity led to similar chromatin modifications (slope: 60) (**Fig. 2C, right panel and Fig. 2D, right graph**). Importantly, the modification of chromatin repartition was also observed with catalytic defective mutants (catalytic site-point mutation (C1959A)⁸ or HECT-deleted constructs) indicating that TRIP12 expression modified the chromatin spatial organization without its ubiquitin ligase activity (**Fig. 2E and 2F**). Such a chromatin reorganization was not observed with well-known chromatin interacting proteins such as the histone H2B or the large DNA methyltransferase DNMT1 (1620 aa) (**Fig. 2E and 2F**).

Taken together, our results showed that a TRIP12 overexpression induces the formation of chromatin condensates in a concentration-dependent manner and independently of its catalytic activity.

The intrinsically disordered region of TRIP12 is responsible for the formation of chromatin condensates.

TRIP12 is a large protein composed of several structured domains (ARM, WWE and HECT) and a long intrinsically disordered domain (IDR)³⁵ (**Fig. 3A**). To identify the domain(s) implicated in the formation of chromatin condensates, different fragments of TRIP12 were fused to the GFP protein (**Fig. 3B**). To allow a nuclear localization, an artificial SV40 nuclear localization signal (NLS) was inserted in these constructs with the exception of the IDR-GFP construct that contains endogenous NLS. Unlike the other domains, only the expression of IDR-GFP dramatically modified the chromatin repartition in a dose-dependent manner (**Fig. 3C and 3D**). This was consolidated by the use of a TRIP12-GFP construct deleted of the IDR (Δ IDR-GFP) that failed to form chromatin condensates. This chromatin reorganization in response to IDR-GFP expression was also observed in other cell line models such as U2OS, hTert-RPE1 or HCT-116 cells (**Fig. 3E**).

Isoelectric point (pI) of a protein is an indirect indicator of its electric charge at a physiological pH (~7.4). In other words, a protein with a pI > 7.4 is positively charge. We calculated the pI of our different TRIP12 fusion proteins. As expected, the IDR of TRIP12 was the most positively charged domain (pI=10.76) and all the constructs that contain the IDR displayed a pI greater than 8.76 (**Fig. 3F and Suppl Fig. 2A**). Indeed, IDR are positively charged due to the bio-physical properties of their amino-acids¹⁶. The IDR of TRIP12 is enriched in serines (S)/lysines (K) and impoverished in leucines (L) (**Suppl Fig. 2A**). Positive charges form patches along the IDR sequence of TRIP12 (**Suppl Fig. 2B**). Interestingly, we determined a strong correlation between the charge of TRIP12 fragments and their capacity to induce the formation of chromatin condensates as indicated by their respective slope (**Fig. 3F**). This observation suggested that the formation of chromatin aggregates mediated by TRIP12 is likely driven by electrostatic forces.

Comparatively to IDR of other proteins, the IDR of TRIP12 is a relatively large (440 aa) and covers ~25% of the protein (**Fig. 2B**). We wondered whether the length of its IDR was an important parameter in the formation of chromatin condensates induced by TRIP12. To this aim, we generated a series of IDR deletion constructs and measured their ability to form chromatin condensates (**Fig. 3G**) Our analysis revealed that no specific sequences within TRIP12-IDR was

necessary for the formation of chromatin condensates. In contrast, we noted that the length of IDR fragments was tightly correlated to their capacity to give rise to chromatin condensates whereas the constructs displayed a similar pI (**Fig. 3G and 3H**). Indeed, IDR fragments of ~100 aa lost their capacity to cause chromatin condensates. Comparatively, we measured the consequences of Mediator 1 (MED1)-IDR expression on chromatin organization. MED1-IDR biophysical features (Serines-rich, length (627 aa) and ionic charge (pI = 10.01)) were comparable to TRIP12-IDR (**Suppl Fig. 2B**). Surprisingly, an over-expression of MED1-IDR-GFP at a comparable level to the one of IDR-GFP did not induce the formation of chromatin condensates (**Fig. 3I**).

Altogether, our results indicated that concentration, ionic charge and length of TRIP12-IDR are critical parameters to form chromatin condensates. Nevertheless, other unknown parameters that seem unique to TRIP12 are likely required.

The chromatin condensates induced by TRIP12-IDR are enriched in heterochromatin marks.

We observed in **Fig. 2** that an overexpression of TRIP12 induces a thickening of perinucleolar heterochromatin and the formation of large chromatin condensates. We therefore explored the content of these condensates by immunofluorescence using specific marks of constitutive (HP1 α and H3K9me3) and facultative heterochromatin (EZH2, K27H3me3 and H2AK119ub) (**Fig. 4A**). We visualized a perfect colocalization of IDR-GFP staining with all these marks demonstrating that TRIP12-induced chromatin condensates are mainly composed of heterochromatin. In contrast, two specific marks of transcriptionally active-euchromatin, the RNA polymerase II Serine 2- and Serine 5-phosphorylated forms were excluded at the periphery of these condensates (**Fig. 4B**). Therefore, our results demonstrated that TRIP12-IDR overexpression leads to the formation of heterochromatin and consequently augments the volume occupied by heterochromatin regions.

The formation of TRIP12-IDR mediated-chromatin condensates is a dynamic and reversible mechanism driven by polymer-polymer phase separation.

We demonstrated that the formation of chromatin condensates is highly dependent of TRIP12-IDR level of expression (**Fig. 2**). In cells with the highest level, TRIP12-IDR expression led to an ultimate level of compaction that allows the visualization of individual chromosomes with a characteristic centromeric CREST immunostaining (**Fig. 5A, top panel**). Nevertheless, this profound reorganization of the genome did not modify the integrity of the nuclear membrane (**Fig. 5A, bottom panel**). We next studied the dynamics of chromatin condensates formation. We observed IDR-GFP expressing individual living cells by microscopy (**Fig. 5B**). We confirmed a direct correlation between the level of TRIP12-IDR expression and the formation of chromatin condensates within individual living cells (**Fig. 5C**). We further tested whether the chromatin condensates were reversibly or permanently formed upon TRIP12-IDR expression. To this aim, we generated an inducible VHL-NbGFP4-FLAG HeLaS3 stable cell line expressing an intracellular anti-GFP nanobody coupled to a proteasome-mediated degrader. First, we verified the efficient degradation of IDR-GFP protein by the degrader (**Fig. 5D**). Second, we induced the formation of chromatin condensates by IDR-GFP transfection followed by the expression of the GFP-degrader. After 24h, we measured a significant decrease of GFP intensity correlated to a diminution of chromatin condensates demonstrating the reversibility of chromatin condensates formation provoked by TRIP12 expression (**Fig. 5E and 5F**). In parallel, individual living cells with chromatin condensates were monitored for 9h after the expression of the GFP-degrader by

microscopy. We observed that an IDR-GFP degradation diminishes the presence of chromatin condensates within few hours (**Fig. 5G and 5H**) confirming the reversibility of chromatin condensates formation induced by TRIP12.

Chromatin condensates induced by IDR-containing proteins can be generated by two main non-exclusive highly dynamic processes: liquid-liquid phase separation (LLPS) or polymer-polymer phase separation (PPPS)¹⁹. To determine which one of them drove the formation of chromatin condensates induced by TRIP12, cells were treated with 1,6-hexanediol (1,6-HD), a classical inhibitor of hydrophobic interactions which govern LLPS. This treatment did not impact neither the formation of chromatin condensates (**Fig. 5I**) nor the DAPI granularity (**Fig. 5J**). Moreover, we analyzed the dynamics of IDR-GFP in chromatin condensates by FRAP analysis. The rapid total recovery of fluorescence comparatively to a H2B-GFP was strongly in favor of condensates formation driven by PPPS (**Fig. 5K**). This was confirmed by half-bleached FRAP experiments in which we photo-bleached only half of chromatin condensates and measured fluorescence intensity in both compartments^{30,36} (**Fig. 5L**). The fluorescence recovery took its origin not only from the internal mixing of the condensates but also from outside. Moreover, fluorescence intensity reached equivalent levels to those before photo-bleaching in less than 30 sec.

Combined to those obtained in **Fig. 3**, these results demonstrated that the highly dynamic formation of chromatin condensates by TRIP12-IDR is mainly governed by PPPS involving electrostatic forces.

Consequences of TRIP12-IDR mediated-chromatin condensates on cellular growth, chromatin accessibility and genome expression.

Next, we investigated whether IDR-mediated-chromatin condensates could influence cellular growth. IDR-GFP and H2B-GFP transfected HeLaS3 cells were monitored for 30 h by live cell microscopy and classified into three categories depending on their level of GFP expression. Interestingly, during the observation period, low and moderate IDR-GFP expressing cells underwent only one cell division comparatively to corresponding H2B-GFP expressing cells that divided twice for most of them. Moreover, the vast majority of IDR-GFP high expressing cells died during the first 20 h after transfection (**Fig. 6A**). A subsequent analysis of cell cycle distribution showed that all IDR-GFP cell categories accumulate in late S and G₂ phases comparatively to H2B-GFP cells (**Fig. 6B**). These results indicated that the presence of chromatin condensates caused by TRIP12-IDR perturbs the cell cycle progression via a late S/G₂ arrest. To test whether DNA replication defects could explain the late S/G₂ cell enrichment, IDR-GFP expressing cells were cultured in the presence of EdU. As seen in **Fig. 6C**, the incorporation of EdU in the condensates suggested that the chromatin compaction caused by TRIP12 did not alter drastically DNA replication and that the late S/G₂ arrest was likely due to other functional alterations.

The accessibility of the genome to transcriptional machinery is tightly controlled by chromatin compaction which can be estimated by ATAC-seq approaches. We measured that the number of accessible regions was dramatically reduced in IDR-GFP high expressing cells (**Fig. 6D**). A more detailed analysis revealed a high percentage (28.9%) of regions for which the accessibility was decreased compared to a low percentage (2%) of regions for which the accessibility was increased (**Fig. 6E**). In parallel, a transcriptome analysis by RNA-seq on the cells that were used for ATAC-seq revealed that among 8906 detectable mRNAs, the expression of 17.9% (n=1 598) of them was statistically modified by an over-expression of IDR-GFP protein. More precisely, 8.0% (n=713) were downregulated and 9.9% up-regulated (n=885) of more than

two fold (**Fig. 6F**). We could not establish a statistical correlation between the level of gene accessibility and their mRNA expression. Nevertheless, these results clearly indicated that an overexpression of the IDR of TRIP12 greatly alters the accessibility of the genome as well as its expression.

TRIP12 overexpression inhibits the accumulation of MDC1 protein on DNA double strand breaks via its IDR.

It is well documented that chromatin compaction is a critical element in the efficiency of DDR pathways^{1,2}. Interestingly, we noticed the protein Mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1), a key protein in the detection of DNA double strand breaks (DSB)³⁷, is among the most enriched proteins at the proximity of TRIP12 (**Fig. 1C and Suppl. Table 3**). Indeed, in response to DSB, MDC1 forms foci by recognizing the phosphorylated serine S139 of γ H2AX histone. In turn, MDC1 participates in the recruitment of crucial proteins of the DNA damage response (DDR) pathways such as 53BP1 (NHEJ) and BRCA1 (HR)³⁷. An overexpression of NBirA*-FLAG-TRIP12 in X-ray irradiated cells dramatically inhibited the formation of MDC1 foci in all cell cycle phases unlike an overexpression of NBirA*-FLAG-EGFP-NLS used as control (**Fig. 7A and 7B**). Of note, the overexpression of NBirA*-FLAG-TRIP12 did not alter the number of γ H2AX foci meaning that TRIP12 does not affect the early detection of DNA breaks upstream of MDC1 accumulation (**Suppl. Fig. 3A and 3B**). To identify the domain(s) responsible of MDC1 accumulation, HeLaS3 were transfected with different GFP-constructs and subsequently irradiated. Similarly, an overexpression of TRIP12-GFP drastically impeded MDC1 foci formation (**Fig. 7C and 7D**). This inhibition was also measured with TRIP12 catalytic mutants (TRIP12-GFP C1959A and Δ HECT-GFP) but not with a construct lacking IDR (Δ IDR-GFP) suggesting the requirement of this domain. Indeed, the overexpression of IDR-GFP alone was sufficient to remarkably inhibit the formation of MDC1 foci in a dose-dependent manner (**Fig. 7E and 7F**) even in IDR-GFP low expressing cells in which chromatin modifications are subtle (**Fig. 2C**). Moreover, the inhibition of MDC1 accumulation by TRIP12 via its IDR was kinetically confirmed after UV-laser micro-irradiation (**Fig. 7G and 7H**). Indeed, a prior expression of full-length TRIP12 fused to the RFP reporter protein dramatically reduced the recruitment of GFP-MDC1 to the irradiated zone when an expression of RFP-IDR alone totally abolished it.

These results clearly demonstrated that an overexpression of TRIP12 affects DNA damage response through the action of its IDR by inhibiting the accumulation of the DDR-key protein MDC1 on DNA breaks.

DISCUSSION

Up to date, the roles attributed to the E3 ubiquitin ligase TRIP12 have exclusively implicated its C-terminal-ubiquitin ligase activity. Herein, we bio-physically characterized for the first time a functional role for the TRIP12 intrinsically disordered N-terminal domain on chromatin compaction with major consequences on several important biological processes such as DDR.

To begin, we established the first interactome of TRIP12 used as a bait by BioID. It confirmed the pleotropic implication of TRIP12 in chromatin compaction and organization networks. Numbers of partners were found in common with interactomes in which TRIP12 was used as a prey (i.e.: BRD4³⁸) which enhanced our confidence on our identified proteins. One advantage of this approach is its capacity to identify (without discriminating them) not only protein interacting partners but also ubiquitinated substrates for which the interaction is extremely labile^{14,39}. Therefore, our analysis provides to the scientific community an exhaustive list of candidate proteins that will help, with further investigations, to better understand the complex mechanisms of chromatin regulation.

We next demonstrated that an overexpression of TRIP12 induces the formation of chromatin condensates. More precisely, we identified the IDR as responsible of this compaction. We further showed that the nuclear concentration of TRIP12 or its IDR is a critical parameter in the degree of chromatin compaction. Also, we discovered that the electric charge of the IDR ($pI=10.76$) is crucial for TRIP12 capacity to form chromatin condensates. These finding indicate that chromatin condensation induced by TRIP12 is likely driven by electrostatic forces. TRIP12 IDR is enriched in positively charged serines which is the third most frequent residue found in disordered regions⁴⁰. Positive charges are heterogeneously spread on TRIP12-IDR sequence and form patches. It is known that the distribution of positive charges within IDR is important to exert their function⁴¹. Electric charge is a major parameter in chromatin condensate formation by TRIP12 but not only. Indeed, the length of IDR is also directly linked to TRIP12 capacity to form condensates with a minimum size comprised between 100 and 200 aa. Chromatin condensates can be driven by two non-exclusive biophysical processes such PPPS and LLPS¹⁹. Among them, LLPS has been more often implicated in heterochromatin and transcriptional machinery regulation implicating IDR-proteins such as BRD4 or MED1¹⁷, respectively. PPPS and LLPS are highly dependent of protein concentration that must reach a saturating concentration to form aggregates. We showed that chromatin condensates formed by TRIP12-IDR is likely driven by PPPS implicating electrostatic forces. Altogether, our study reveals that concentration, positive electric charge and length of IDR are essential parameters to create chromatin condensates. Although almost half of the proteome possesses IDRs, only 10-20% of these proteins contain a disordered region that covers more than 25% of the protein size as TRIP12-IDR does¹⁶. This feature combined with a length of 440 aa (50 kDa) makes the IDR of TRIP12 very unique. MED1-IDR displaying similar length (600 aa) and electric charge ($pI=10.01$) does not induce chromatin condensates when expressed at the same level as TRIP12-IDR. This raises the question whether this property is really specific to TRIP12. To the best of our knowledge, TRIP12 is the sole protein in the literature for which the overexpression induces this macroscopic chromatin phenotype. However, we cannot exclude that other proteins in proteome exhibits similar capacities. Extensive studies should be required to address this question.

The formation of heterochromatin is driven by a multi-step process that include post-translational histone modifications by protein complexes and the subsequent recruitment of reader proteins. For instance, HP1 α is known to induce by oligomerization the formation of heterochromatin *in vitro*⁴². Nevertheless, it is suggested that, in a cellular context, HP1 α is not

sufficient to form such a level of chromatin compaction which requires other proteins⁴³. In our study, we discovered that TRIP12 expression induces the formation of chromatin condensates enriched in specific heterochromatin marks. It is therefore tempting to speculate that TRIP12 participates in the formation of heterochromatin via electrostatic interactions. The targeting of TRIP12 to specific genomic regions could be ensured by the PRC complexes. To support this idea, our BioID analysis revealed numbers of PRC complex proteins in the proxisome of TRIP12. Moreover, several reports identified TRIP12 in the interactome of PRC complexes proteins^{11,12}.

The level of chromatin compaction has been involved in several important biological processes. A proper chromosome compaction is a crucial step for mitotic cell division. Herein, we observed that chromatin compaction induced by an expression of IDR-GFP perturbs the cell cycle and leads to an accumulation of cells in late S/G₂ phase and a subsequent death during mitosis. A finely-tuned expression of TRIP12 seems required to complete mitotic division. Therefore, it is likely that TRIP12, via its IDR properties, participates in the proper condensation of chromosomes prior mitosis. This is in accordance with our previous study in which we showed that TRIP12 is tightly controlled during the cell cycle and highly expressed in late S and G₂ phases¹⁵. Moreover, we noticed that a depletion of TRIP12 results in alterations of chromosome segregation. DNA replication efficiency during S phase is tightly dependent to chromatin assembly⁴⁴. Herein, chromatin condensates induced by TRIP12-IDR does not inhibit the incorporation of EdU suggesting that they do not alter DNA replication. Nevertheless, to definitely confirm this claim, the speed of DNA replication forks in the presence or not of TRIP12-IDR should be measured. Gene transcription is another important molecular process that is tightly dependent of chromatin compaction level. Genome accessibility to the transcriptional machinery dictates the genes that must be transcribed into mRNA. We measured the impact of TRIP12-IDR induced-condensates on genome accessibility and gene transcription by ATAC-seq coupled to RNA-Seq. We noticed a dramatic diminution in the number of genomic accessible regions coupled to profound alterations of the transcriptome indicating a direct implication of TRIP12-IDR in transcriptional regulation. Deciphering the molecular mechanisms that govern this alteration is a remaining task. The exclusion of the RNA polymerase II at the periphery of chromatin condensates induced by TRIP12 that we observed in this study could be an easy explanation. The variant of histone H2AZ has been strongly correlated with transcription control⁴⁵. Interestingly, this histone variant is the most enriched proteins identified in our BioID analysis. Therefore, the mechanistic relation between TRIP12 and H2AZ could provide deeper insights on the implication of TRIP12-IDR in the control of transcription.

DNA damage response (DDR) efficiency greatly depends on chromatin compaction. Nuclear F-actin and myosin drive the relocalization of heterochromatic breaks in relaxed chromatin⁴⁶. Up to date, TRIP12 has been implicated in the inhibition of NHEJ and Alt-EJ (Alternative End joining) DDR pathways via the action of its HECT catalytic domain by inducing the ubiquitination of RNF168 and PARP1, respectively⁴⁵. Here, we discovered that the IDR of TRIP12 inhibits the formation of MDC1 foci at DSBs in a dose dependent manner. MDC1 is a central protein in the DDR as it participates in the recruitment and the accumulation of 53BP1 and BRCA1⁴⁷. MDC1 is among the most enriched protein in TRIP12 BioID proxisome which is in a total accordance with a recent study that identified TRIP12 as a main interactant of MDC1⁴⁸. Nevertheless, the molecular relationships that exist between MDC1 and TRIP12-IDR are still partially known. We can speculate that chromatin compaction induced by TRIP12-IDR at DSB creates a steric hindrance for MDC1 recruitment and accumulation. Another explanation would be that TRIP12-IDR physically interacts with MDC1. Consequently, an overexpression of TRIP12 and its fixation along the genome would titrate MDC1 and impedes its recruitment at DSBs. H2AX phosphorylation on Ser 139 (γ H2AX) is associated with modifications of chromatin structure⁴⁹.

By modifying the structure of chromatin, TRIP12, via its IDR, could also trigger a genome-wide H2AX phosphorylation that would titrate the free-MDC1 pool onto the chromatin as MDC1 specifically recognizes H2AX (Ser 139) phosphorylation by its BRCT domain³⁷.

Trip12 mRNA is overexpressed in numerous cancers and notably in pancreatic cancers in which we (Personal unpublished data) and others showed a heterogeneous overexpression^{3,35}. Several studies have reported the implication of TRIP12 via its HECT catalytic activity in the sensitivity of cancer cells to chemotherapies^{4,5}. Given the inhibitory effect on MDC1 foci formation, it is likely that the IDR of TRIP12 simultaneously participates in the chemosensitivity of cancer cells. Finally, numerous studies have reported an association, between Trip12 mutations and intellectual deficiencies such as Clark-Baraister syndrome^{21,50}. The molecular mechanisms involved are totally unknown. Numbers of non-sense Trip12 mutations identified in patients produce truncated proteins corresponding to the IDR alone²⁰. Based on our discoveries, alterations of chromatin condensation could constitute the premise for a better understanding of these diseases.

DATA AVAILABILITY

Data are deposited in public repository as indicated in Materials and Methods. Plasmids are available upon requests.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.V. : Investigation, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing – original draft ; M.B.: Investigation, Conceptualization, Supervision, Writing-review and editing ; A.R.: Investigation ; D.V.: Investigation, Conceptualization, Software, Writing-review and editing ; D. L.: Investigation ; F. M: Investigation, Writing-review and editing ; F. E.: Conceptualization, Writing-review and editing ; G.L.: Investigation ; N.H.: Investigation ; L.L.: Investigation ; M.F.: Investigation ; O. S-B.: Project administration ; A. S.: Conceptualization, Investigation, Writing-review and editing ; H.L.: Conceptualization, Writing-review and editing ; N. B.: Conceptualization, Investigation, Writing-review and editing ; P.C.: Funding acquisition, Writing-review and editing ; M.D.: Conceptualization, Writing-review and editing ; J.T.: Conceptualization, Investigation, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Delmas from the CRCT technological facilities (CRCT platform), Dr. N. Verstraete from Dr. V. Pancaldi's team (CRCT).

FUNDING

This work was supported by by the Ligue contre le cancer, the Fondation Toulouse Cancer Santé (TCS2018CS079), the Association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas and the Cancéropôle Grand Sud-Ouest (2021-EM22). Claire VARGAS was funded by the University Paul Sabatier (Toulouse) and the Ligue contre le cancer. Manon BRUNET was funded by the University Paul Sabatier (Toulouse) and the Ligue contre le cancer. Damien VARRY was funded by the Ecole Normale Supérieure (Paris). Dorian Larrieu was funded by the Ligue contre le cancer.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Hauer, M.H., and Gasser, S.M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev.* 31, 2204–2221. 10.1101/gad.307702.117.
2. Arnould, C., and Legube, G. (2020). The Secret Life of Chromosome Loops upon DNA Double-Strand Break. *J. Mol. Biol.* 432, 724–736. 10.1016/j.jmb.2019.07.036.
3. Chen, D., Shan, J., Zhu, W.-G., Qin, J., and Gu, W. (2010). Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 464, 624–627. 10.1038/nature08820.
4. Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., et al. (2012). TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* 150, 697–709. 10.1016/j.cell.2012.06.039.
5. Gatti, M., Imhof, R., Huang, Q., Baudis, M., and Altmeyer, M. (2020). The Ubiquitin Ligase TRIP12 Limits PARP1 Trapping and Constrains PARP Inhibitor Efficiency. *Cell Rep.* 32, 107985. 10.1016/j.celrep.2020.107985.
6. An, C.-I., Ganio, E., and Hagiwara, N. (2013). Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet. Muscle* 3, 11. 10.1186/2044-5040-3-11.
7. Khan, O.M., Almagro, J., Nelson, J.K., Horswell, S., Encheva, V., Keyan, K.S., Clurman, B.E., Snijders, A.P., and Behrens, A. (2021). Proteasomal degradation of the tumour suppressor FBW7 requires branched ubiquitylation by TRIP12. *Nat. Commun.* 12, 2043. 10.1038/s41467-021-22319-5.
8. Hanoun, N., Fritsch, S., Gayet, O., Gigoux, V., Cordelier, P., Dusetti, N., Torrisani, J., and Dufresne, M. (2014). The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 289, 35593–35604. 10.1074/jbc.M114.620104.
9. Keppler, B.R., and Archer, T.K. (2010). Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* 285, 35665–35674. 10.1074/jbc.M110.173997.
10. Kweon, S.-M., Chen, Y., Moon, E., Kvederaviciūtė, K., Klimasauskas, S., and Feldman, D.E. (2019). An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol. Cell.* 10.1016/j.molcel.2019.03.018.
11. Cao, Q., Wang, X., Zhao, M., Yang, R., Malik, R., Qiao, Y., Poliakov, A., Yocum, A.K., Li, Y., Chen, W., et al. (2014). The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* 5, 3127. 10.1038/ncomms4127.
12. Oliviero, G., Brien, G.L., Waston, A., Streubel, G., Jerman, E., Andrews, D., Doyle, B., Munawar, N., Wynne, K., Crean, J., et al. (2016). Dynamic Protein Interactions of the Polycomb Repressive Complex 2 during Differentiation of Pluripotent Cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 15, 3450–3460. 10.1074/mcp.M116.062240.
13. Tang, Y., Wang, D., Niu, X., Wu, H., Yang, J., Zhang, Y., Song, S., Lv, D., Chai, Y., Lu, H., et al. (2020). Mild iron overload induces TRIP12-mediated degradation of YY1 to trigger hepatic inflammation. *Free Radic. Biol. Med.* 161, 187–197. 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.013.
14. Samavarchi-Tehrani, P., Abdouni, H., Samson, R., and Gingras, A.-C. (2018). A Versatile Lentiviral Delivery Toolkit for Proximity-dependent Biotinylation in Diverse Cell Types. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 17, 2256–2269. 10.1074/mcp.TIR118.000902.
15. Larrieu, D., Brunet, M., Vargas, C., Hanoun, N., Ligat, L., Dagnon, L., Lulka, H., Pommier, R.M., Selves, J., Jády, B.E., et al. (2020). The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability. *Sci. Rep.* 10, 789. 10.1038/s41598-020-57762-9.
16. van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., et al. (2014). Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631. 10.1021/cr400525m.
17. Sabari, B.R., Dall’Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018). Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361. 10.1126/science.aar3958.
18. Wang, C., Zhang, E., Wu, F., Sun, Y., Wu, Y., Tao, B., Ming, Y., Xu, Y., Mao, R., and Fan, Y. (2019). The C-terminal low-complexity domain involved in liquid-liquid phase separation is required for BRD4 function in vivo. *J. Mol. Cell Biol.* 11, 807–809. 10.1093/jmcb/mjz037.
19. Erdel, F., and Rippe, K. (2018). Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation. *Biophys. J.* 114, 2262–2270. 10.1016/j.bpj.2018.03.011.
20. Louie, R.J., Friez, M.J., Skinner, C., Baraitser, M., Clark, R.D., Schwartz, C.E., and Stevenson, R.E. (2020). Clark-Baraitser syndrome is associated with a nonsense alteration in the autosomal gene TRIP12. *Am. J. Med. Genet. A.* 182, 595–596. 10.1002/ajmg.a.61443.
21. van der Laan, L., Rooney, K., Alders, M., Relator, R., McConkey, H., Kerkhof, J., Levy, M.A., Lauffer, P., Aerden, M., Theunis, M., et al. (2022). Episignature Mapping of TRIP12 Provides Functional Insight into Clark-Baraitser Syndrome. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 13664. 10.3390/ijms232213664.
22. Lelieveld, S.H., Reijnders, M.R.F., Pfundt, R., Yntema, H.G., Kamsteeg, E.-J., de Vries, P., de Vries, B.B.A., Willemsen, M.H., Kleefstra, T., Löhner, K., et al. (2016). Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat. Neurosci.* 19, 1194–1196. 10.1038/nn.4352.
23. Iossifov, I., O’Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., et al. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 515, 216–221. 10.1038/nature13908.

24. O'Roak, B.J., Stessman, H.A., Boyle, E.A., Witherspoon, K.T., Martin, B., Lee, C., Vives, L., Baker, C., Hiatt, J.B., Nickerson, D.A., et al. (2014). Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* 5, 5595. 10.1038/ncomms6595.
25. Cai, J.-B., Shi, G.-M., Dong, Z.-R., Ke, A.-W., Ma, H.-H., Gao, Q., Shen, Z.-Z., Huang, X.-Y., Chen, H., Yu, D.-D., et al. (2015). Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology*. Baltimore, Md 61, 1603–1614. 10.1002/hep.27682.
26. Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M.C., et al. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Methods* 3, 887–889. 10.1038/nmeth953.
27. Barger, C., Branick, C., Chee, L., and Karpf, A. (2019). Pan-Cancer Analyses Reveal Genomic Features of FOXM1 Overexpression in Cancer. *Cancers* 11, 251. 10.3390/cancers11020251.
28. Bery, N., Miller, A., and Rabbitts, T. (2020). A potent KRAS macromolecule degrader specifically targeting tumours with mutant KRAS. *Nat. Commun.* 11, 3233. 10.1038/s41467-020-17022-w.
29. Casas-Delucchi, C.S., van Bommel, J.G., Haase, S., Herce, H.D., Nowak, D., Meilinger, D., Stear, J.H., Leonhardt, H., and Cardoso, M.C. (2012). Histone hypoacetylation is required to maintain late replication timing of constitutive heterochromatin. *Nucleic Acids Res.* 40, 159–169. 10.1093/nar/gkr723.
30. Erdel, F., Rademacher, A., Vlijm, R., Tünnermann, J., Frank, L., Weinmann, R., Schweigert, E., Yserentant, K., Hummert, J., Bauer, C., et al. (2020). Mouse Heterochromatin Adopts Digital Compaction States without Showing Hallmarks of HP1-Driven Liquid-Liquid Phase Separation. *Mol. Cell* 78, 236–249.e7. 10.1016/j.molcel.2020.02.005.
31. Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.-P., St-Denis, N.A., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardiu, M.E., Low, T.Y., et al. (2013). The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. *Nat. Methods* 10, 730–736. 10.1038/nmeth.2557.
32. Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PloS One* 11, e0157022. 10.1371/journal.pone.0157022.
33. Levone, B.R., Lombardi, S., and Barabino, S.M.L. (2022). Laser microirradiation as a tool to investigate the role of liquid-liquid phase separation in DNA damage repair. *STAR Protoc.* 3, 101146. 10.1016/j.xpro.2022.101146.
34. Di Paolo, A., Racca, C., Calsou, P., and Larminat, F. (2014). Loss of BRCA1 impairs centromeric cohesion and triggers chromosomal instability. *FASEB J.* 28, 5250–5261. 10.1096/fj.14-250266.
35. Brunet, M., Vargas, C., Larrieu, D., Torrisani, J., and Dufresne, M. (2020). E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions. *Int. J. Mol. Sci.* 21. 10.3390/ijms21228515.
36. Muzzopappa, F., Hummert, J., Anfossi, M., Tashev, S.A., Herten, D.-P., and Erdel, F. (2022). Detecting and quantifying liquid–liquid phase separation in living cells by model-free calibrated half-bleaching. *Nat. Commun.* 13, 7787. 10.1038/s41467-022-35430-y.
37. Coster, G., and Goldberg, M. (2010). The cellular response to DNA damage: a focus on MDC1 and its interacting proteins. *Nucl. Austin Tex* 1, 166–178. 10.4161/nucl.1.2.11176.
38. Lambert, J.-P., Picaud, S., Fujisawa, T., Hou, H., Savitsky, P., Uusküla-Reimand, L., Gupta, G.D., Abdouni, H., Lin, Z.-Y., Tucholska, M., et al. (2019). Interactome Rewiring Following Pharmacological Targeting of BET Bromodomains. *Mol. Cell* 73, 621–638.e17. 10.1016/j.molcel.2018.11.006.
39. Iconomou, M., and Saunders, D.N. (2016). Systematic approaches to identify E3 ligase substrates. *Biochem. J.* 473, 4083–4101. 10.1042/BCJ20160719.
40. Uversky, V.N. (2015). The intrinsic disorder alphabet. III. Dual personality of serine. *Intrinsically Disord. Proteins* 3, e1027032. 10.1080/21690707.2015.1027032.
41. Bianchi, G., Longhi, S., Grandori, R., and Brocca, S. (2020). Relevance of Electrostatic Charges in Compactness, Aggregation, and Phase Separation of Intrinsically Disordered Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6208. 10.3390/ijms21176208.
42. Azzaz, A.M., Vitalini, M.W., Thomas, A.S., Price, J.P., Blacketer, M.J., Cryderman, D.E., Zirbel, L.N., Woodcock, C.L., Elcock, A.H., Wallrath, L.L., et al. (2014). Human Heterochromatin Protein 1 α Promotes Nucleosome Associations That Drive Chromatin Condensation. *J. Biol. Chem.* 289, 6850–6861. 10.1074/jbc.M113.512137.
43. Eskeland, R., Eberharter, A., and Imhof, A. (2007). HP1 Binding to Chromatin Methylated at H3K9 Is Enhanced by Auxiliary Factors. *Mol. Cell Biol.* 27, 453–465. 10.1128/MCB.01576-06.
44. Clemente-Ruiz, M., and Prado, F. (2009). Chromatin assembly controls replication fork stability. *EMBO Rep.* 10, 790–796. 10.1038/embor.2009.67.
45. Creighton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R., and Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* 135, 649–661. 10.1016/j.cell.2008.09.056.
46. Kendek, A., Wensveen, M.R., and Janssen, A. (2021). The Sound of Silence: How Silenced Chromatin Orchestrates the Repair of Double-Strand Breaks. *Genes* 12, 1415. 10.3390/genes12091415.
47. Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol. Cell* 21, 187–200. 10.1016/j.molcel.2005.11.025.
48. Salifou, K., Burnard, C., Basavarajiah, P., Grasso, G., Helmsmoortel, M., Mac, V., Depierre, D., Franckhauser, C., Beyne, E., Contreras, X., et al. (2021). Chromatin-associated MRN complex protects highly transcribing genes from genomic instability. *Sci. Adv.* 7, eabb2947. 10.1126/sciadv.abb2947.

49. Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508. 10.1016/s1534-5807(03)00093-5.
50. Bramswig, N.C., Lüdecke, H.-J., Pettersson, M., Albrecht, B., Bernier, R.A., Cremer, K., Eichler, E.E., Falkenstein, D., Gerds, J., Jansen, S., et al. (2017). Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Hum. Genet.* 136, 179–192. 10.1007/s00439-016-1743-x.

Figure 1 : TRIP12 is implicated in global chromatin organization and compaction networks.

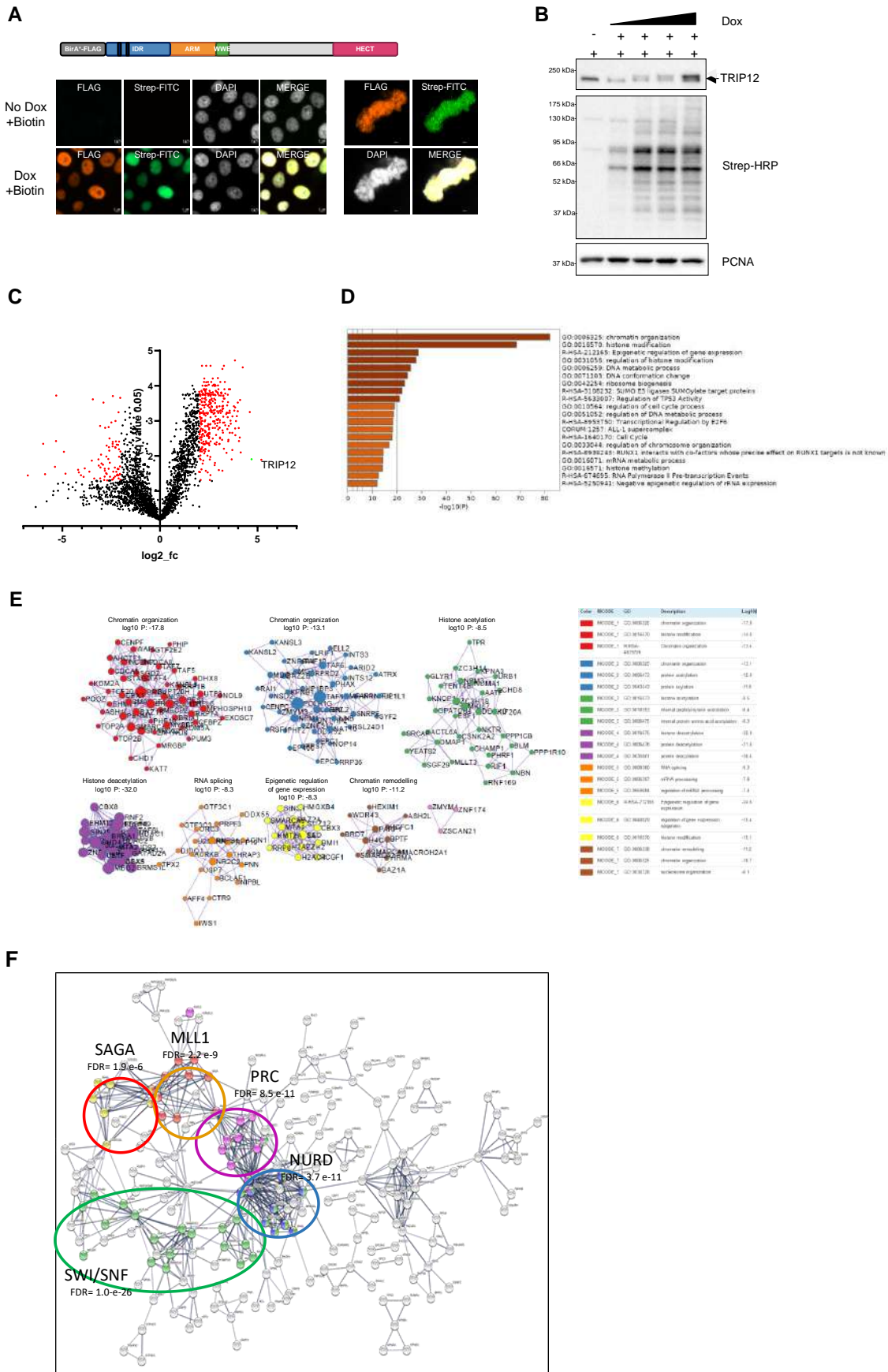


Figure 1: TRIP12 is implicated in global chromatin organization and compaction networks.

A- Graphical representation of NBirA*-FLAG-TRIP12 fusion protein (top). IDR: Intrinsically Disordered Region, ARM: armadillo repeats, WWE: tryptophan-tryptophan-glutamate rich domain and HECT: Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus. Black rectangles represent Nuclear Localization Signals (NLS). Representative image of NBirA*-FLAG-TRIP12 and biotinylated protein localization in NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells in interphase (left panel) or in mitosis (right panel) treated or not with doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and biotin (50 μM) for 24 h by immunofluorescence using an anti-FLAG antibody and streptavidin-FITC conjugate. Nuclei were counterstained with DAPI.

B- Nuclear TRIP12 expression and biotinylation profile in response to doxycycline treatment in NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells was determined by Western blot analysis using the indicated antibodies and streptavidin-HRP conjugate. Cells were treated with increasing doses of doxycycline (100, 350, 600 and 1000 ng/ml), biotin (50 μM) for 24 h and with MG-132 (1.25 μM) for 15 h. PCNA level was used as loading control. The black and grey arrows indicate endogenously and exogenously expressed TRIP12 protein, respectively.

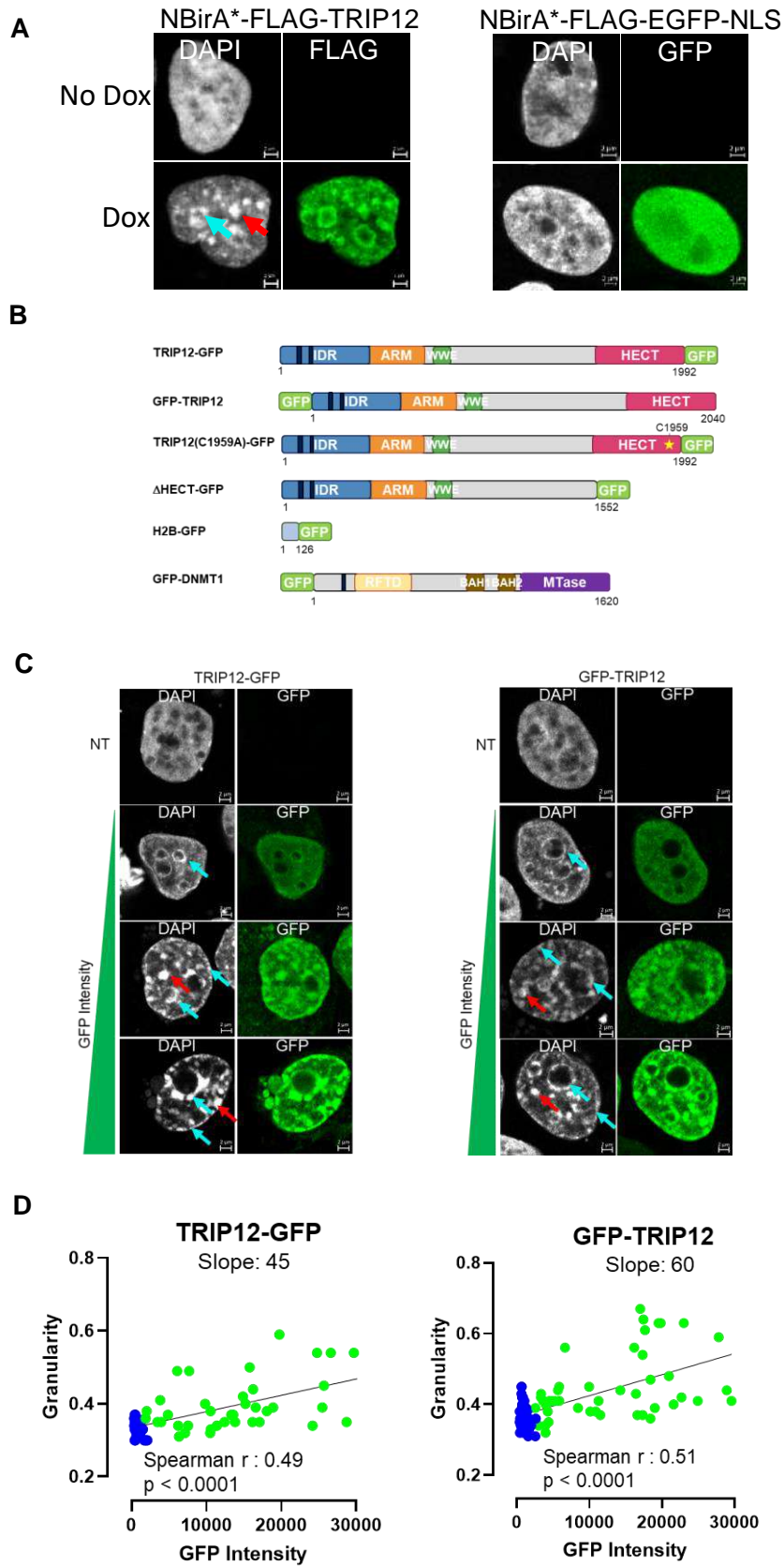
C- Volcano plot of identified proteins at proximity (~ 15 nm) of TRIP12 determined by BioID and mass label-free mass spectrometry. Statistically enriched proteins ($n=328$) are represented by red circles (q value < 0.05 and $\log_2 \text{FC} > 2$) calculated from four independent experiments. Auto-biotinylated TRIP12 protein is indicated on the graph.

D- Gene ontology analysis of TRIP12 interactors identified by BioID approach using Metascape software. GO terms having the highest significance are shown.

E- Protein networks analysis using Metascape software of TRIP12 protein partners identified by BioID. Statistic values are expressed as $\log_{10}(\text{p-value})$.

F- Protein functional network using String software of TRIP12 protein partners identified by BioID. Coloured circles correspond to proteins that belong to SAGA (yellow), MLL1 (orange), PRC (violet), NURD (blue), SWI/SNF (green) complexes. Corresponding False Discovery Rate (FDR) are indicated.

Figure 2 : TRIP12 overexpression modifies the repartition of chromatin independently of its catalytic activity.



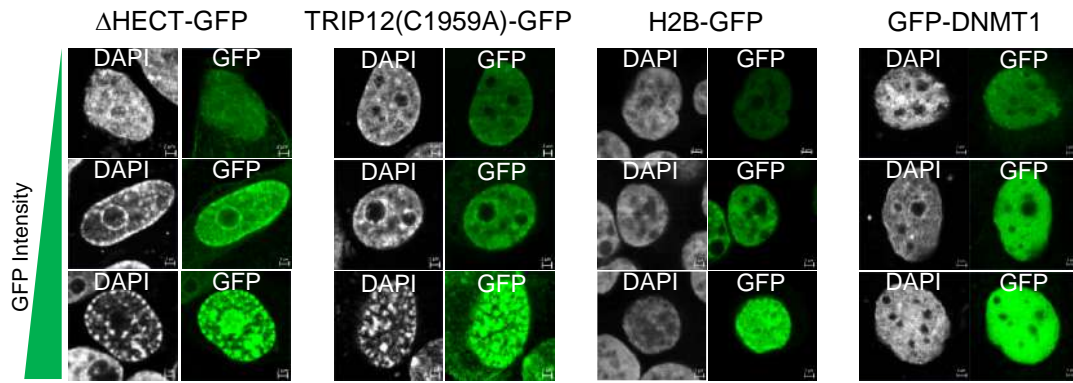
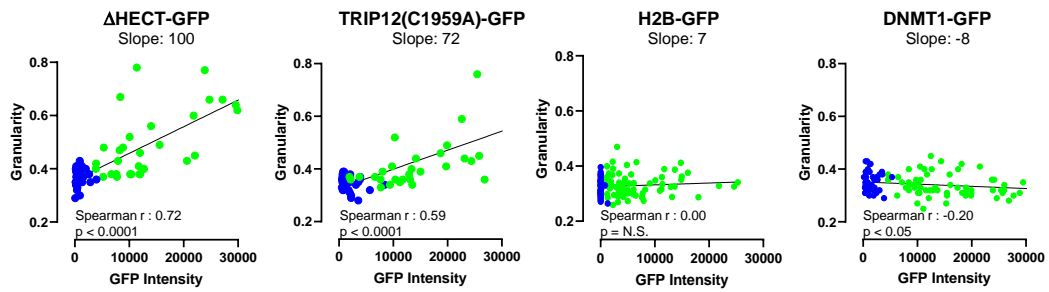
E**F**

Figure 2: TRIP12 overexpression modifies the repartition of chromatin independently of its catalytic activity.

A- Representative images of NBirA*-FLAG-TRIP12 and NBirA*-FLAG-EGFP-NLS expressing HeLaS3 cells treated or not with doxycycline (1 µg/mL) for 48 h by immunofluorescence using indicated antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. A blue arrow represents the thickening of perinucleolar regions while a red arrow represents chromatin condensates.

B- Graphical representation of GFP fusion proteins. The yellow star locates the ubiquitin ligase catalytic site. IDR: Intrinsically Disordered Region, ARM: armadillo repeats, WWE: tryptophan-tryptophan-glutamate rich domain, HECT: Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus, GFP: Green Fluorescent Protein, RFTD: Replication Foci Targeting Domain, BAH: Bromo-Adjacent Homology and MTase: MethylTransferase. Black rectangles represent Nuclear Localization Signals (NLS). Numbers indicate the length of the proteins in amino acids.

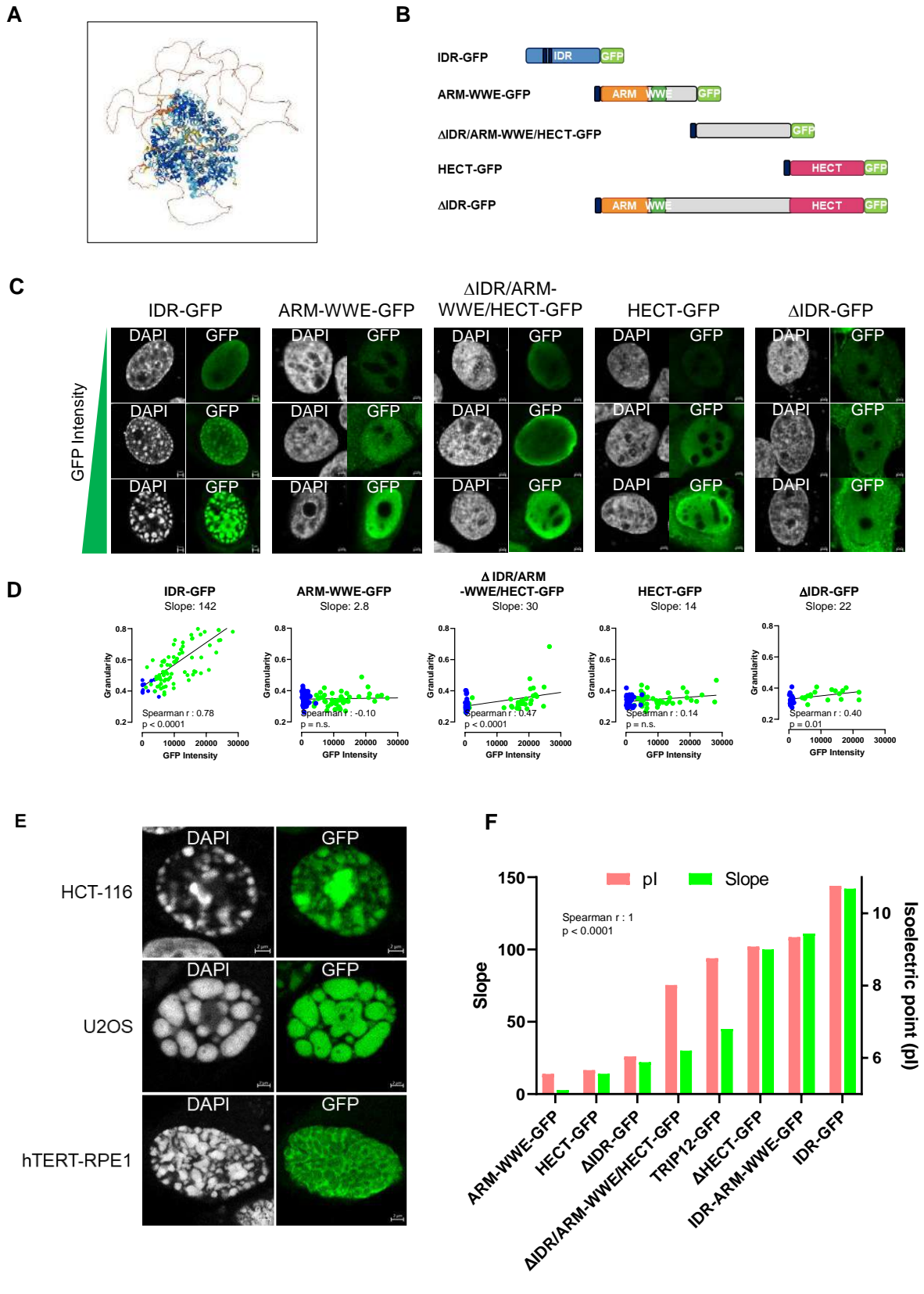
C- Representative images of TRIP12-GFP (left panel) and GFP-TRIP12 (right panel) overexpressing HeLaS3 cells by immunofluorescence after transient transfection. Nuclei were counterstained with DAPI. Cells with three different GFP intensities are represented. Blue arrows represent the thickening of perinuclear and perinucleolar regions. Red arrows represent chromatin condensates.

D- Determination of DNA granularity in function to GFP expression level in TRIP12-GFP and GFP-TRIP12 expressing HeLaS3 cells. For each cell, the DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

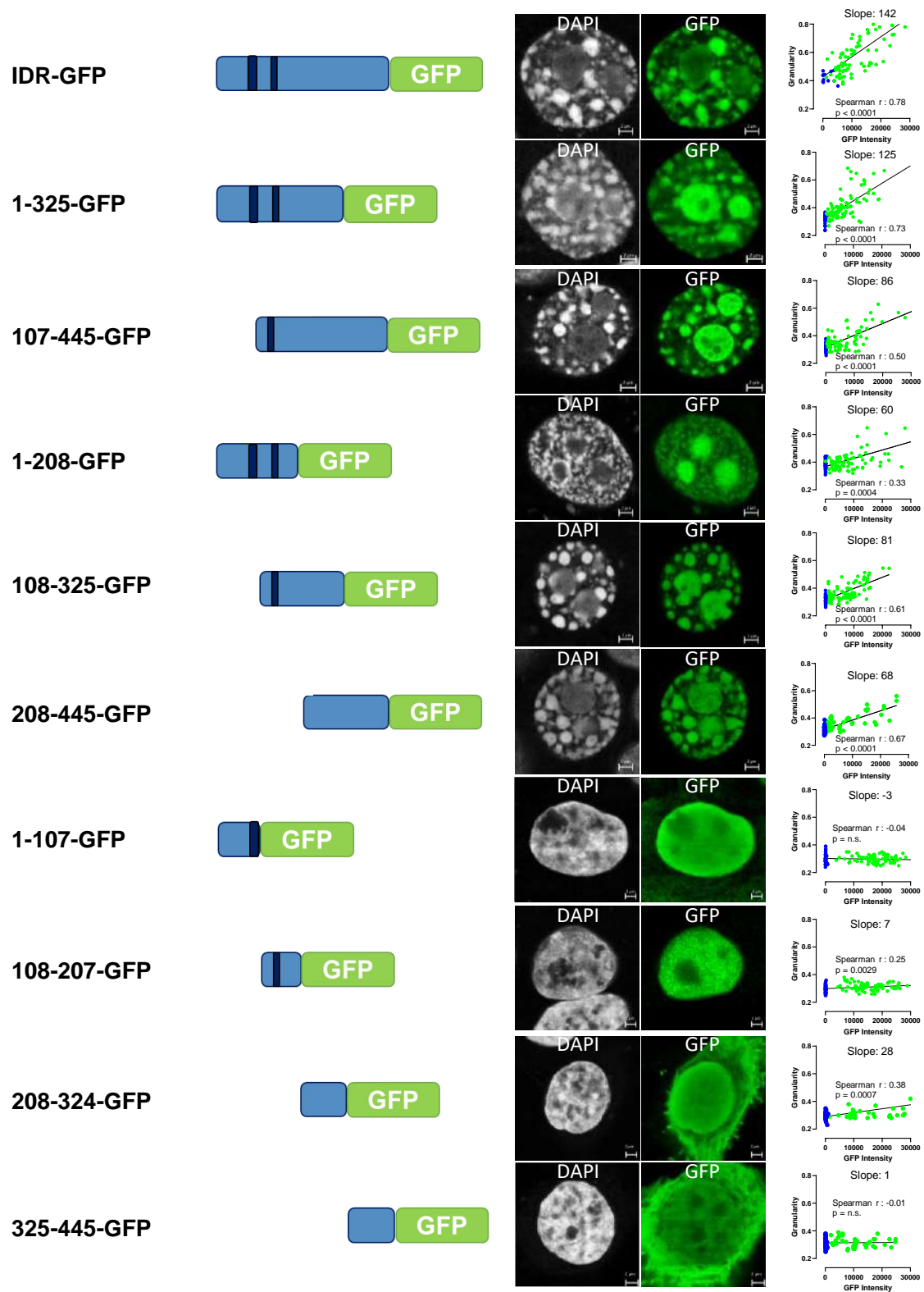
E- Representative images of HECT-GFP, TRIP12(C1959A)-GFP, H2B-GFP and GFP-DNMT1 expressing HeLaS3 cells by immunofluorescence after transient transfection. Nuclei were counterstained with DAPI. Cells with three different GFP intensities are represented.

F- Determination of DNA granularity in function of GFP expression level in HECT-GFP, TRIP12(C1959A)-GFP, H2B-GFP and GFP-DNMT1 expressing HeLaS3 cells. For each cell, DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

Figure 3 : The intrinsically disordered region of TRIP12 is responsible for the formation of chromatin condensates.



G



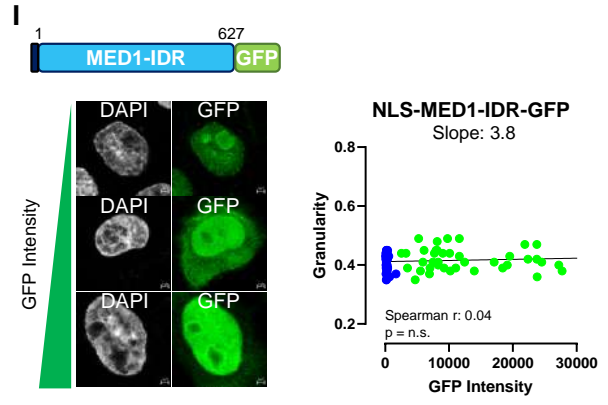
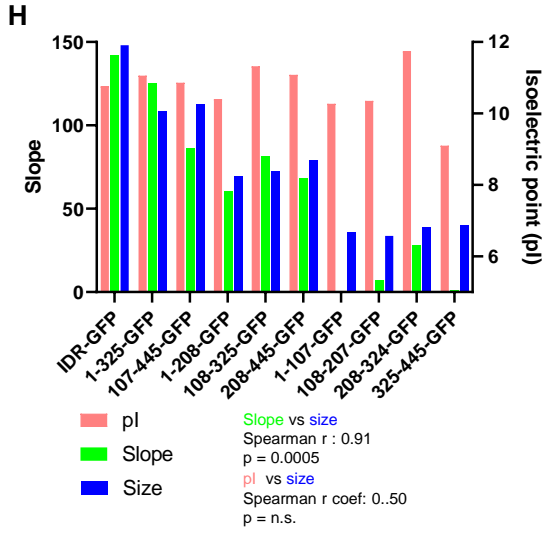


Figure 3: The intrinsically disordered region of TRIP12 is responsible for the formation of chromatin condensates.

A- Prediction of TRIP12 3D-structure by AlphaFold website. Low, medium and high confidence prediction are represented in orange, light blue and dark blue, respectively.

B- Graphical representation of TRIP12 different domains fused to the GFP reporter protein. Dark blue rectangles locate endogenous or artificial nuclear localization signals (NLS). IDR: Intrinsically Disordered Region, ARM: armadillo domain, WWE: tryptophan-tryptophan-glutamate rich domain, HECT: Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus and GFP: Green Fluorescent Protein.

C- Representative images of TRIP12-domains fused to GFP expressing HeLaS3 cells by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI. Cells with three different GFP intensities are represented. Insertion of an artificial NLS in ARM-WWE-GFP, Middle-GFP, HECT-GFP and Δ IDR-GFP constructs allowed a nuclear localization with a substantial leaking in the cytoplasm.

D- Determination of DNA granularity in function of GFP expression level in TRIP12-domains fused to GFP expressing HeLaS3 cells. For each cell, DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

E- Representative images of chromatin condensates induced by TRIP12-IDR overexpression in HCT-116, U2OS and hTert-RPE1 cell lines by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

F- Comparison of isoelectric point (pI) and capacity to form chromatin condensates (slope) of the different TRIP12-GFP constructs. The pI of the different TRIP12 fragments was determined using ProtParam on ExPASy website. The capacity to form chromatin condensates was indicated by the slope values obtained in **Fig. 2D, 2F and 3C**.

G- Representative images of DNA organization in IDR-GFP deletion constructs in high expressing HeLaS3 cells (left panel). The cytoplasmic leaking of 208-324-GFP and 325-445-GFP constructs is explained by the loss of NLS sequences. Determination of DNA granularity in function of GFP expression level for the different IDR-GFP deletion constructs (right panel). The DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

H- Comparison of isoelectric point (pI), capacity to form chromatin condensates (slope) and the length (in aa) of the different IDR-GFP deletion constructs. The pI and the length of the different TRIP12 fragments were determined using ProtParam on ExPASy website. The capacity to form chromatin condensates was determined by slope values obtained in **Fig. 3G**.

I- Graphical representation of MED1-IDR fused to GFP protein. The dark blue rectangle locates an artificial nuclear localization signals (NLS). Representative images of MED1-IDR-GFP expressing HeLaS3 cells obtained by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI. Cells with three different GFP intensities are represented. For each cell, DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

Figure 4 : The chromatin condensates induced by TRIP12-IDR are enriched in heterochromatin marks.

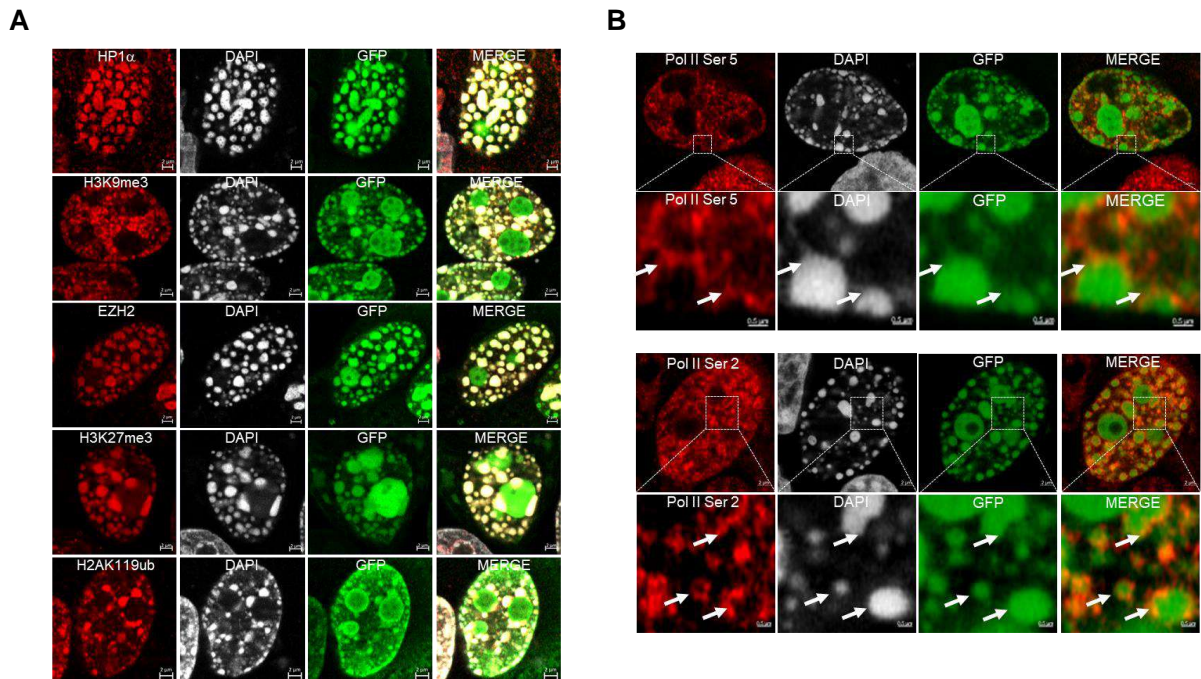


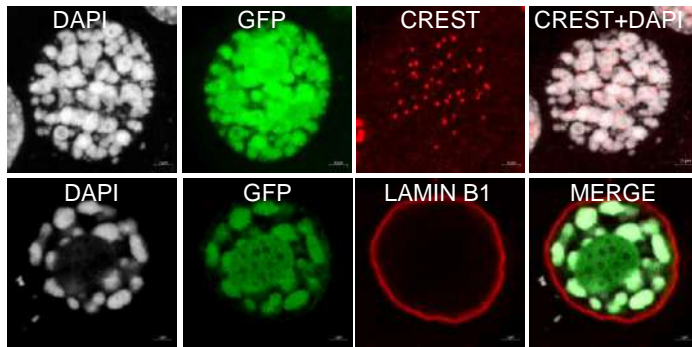
Figure 4: The chromatin condensates induced by TRIP12-IDR are enriched in heterochromatin marks.

A- Representative images of localization of TRIP12-IDR mediated condensates and HP1 α , H3K9me3, EZH2, H3K27me3 and H2AK119ub heterochromatin marks by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

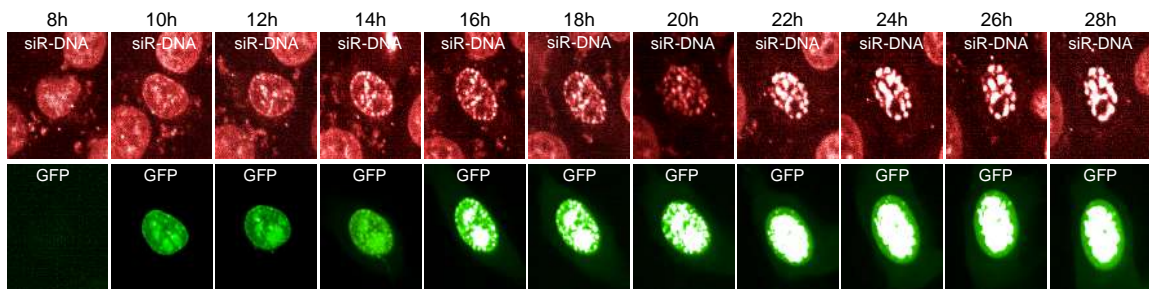
B- Representative images of localization of TRIP12-IDR mediated condensates and phosphorylated RNA polymerase II on serine 2 and serine 5. White arrows show the localization of RNA polymerase II staining at the periphery of the chromatin condensates. Nuclei were counterstained with DAPI.

Figure 5 : The formation of TRIP12 induced-chromatin condensates is a dynamic and reversible mechanism driven by polymer-polymer phase separation.

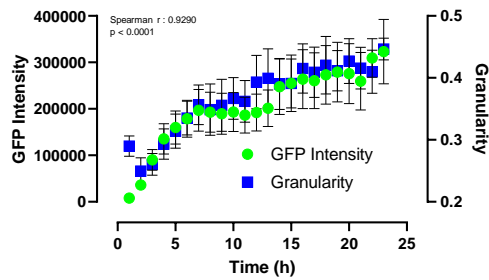
A



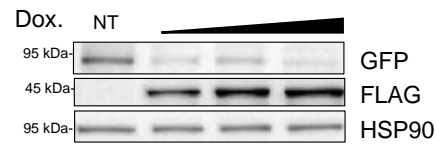
B



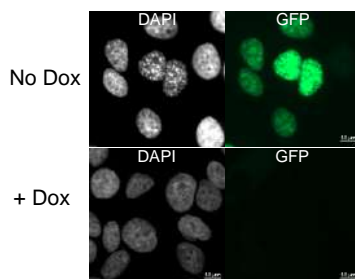
C



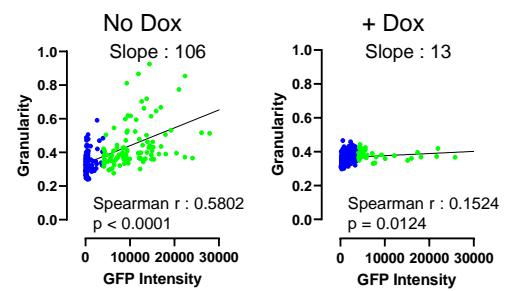
D



E



F



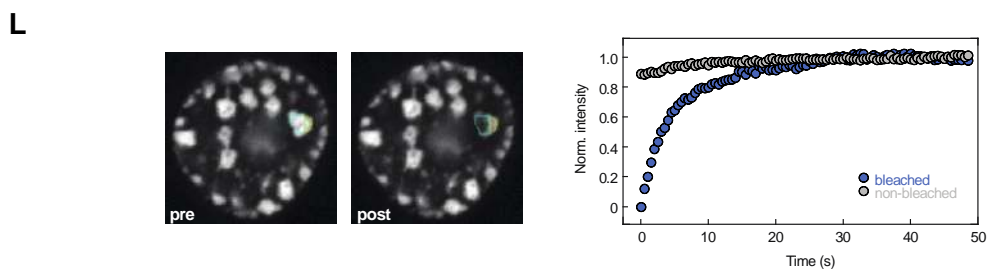
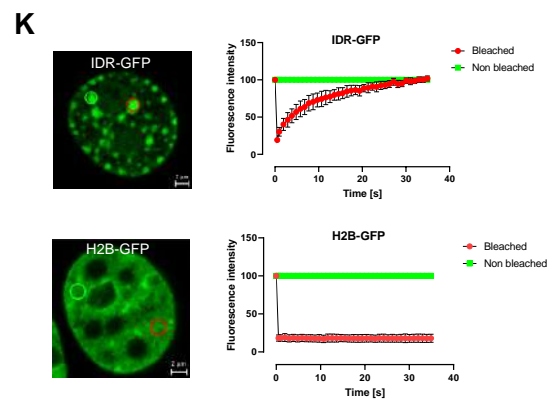
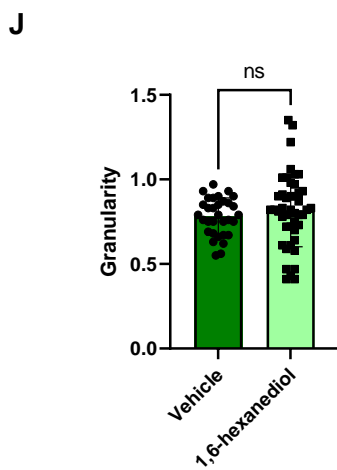
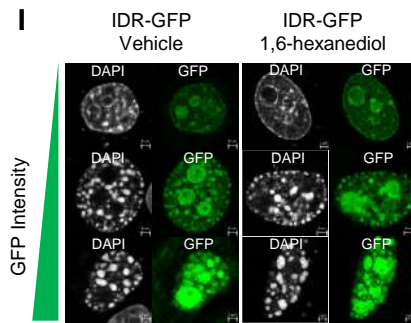
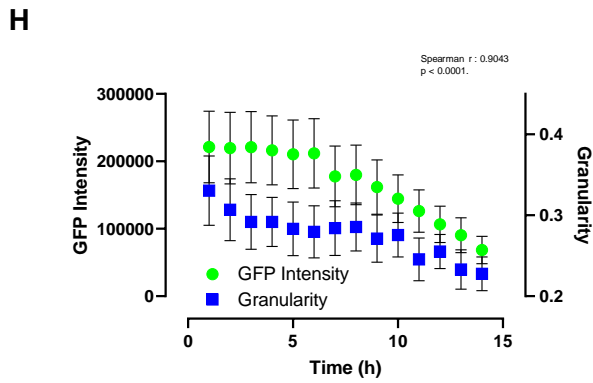
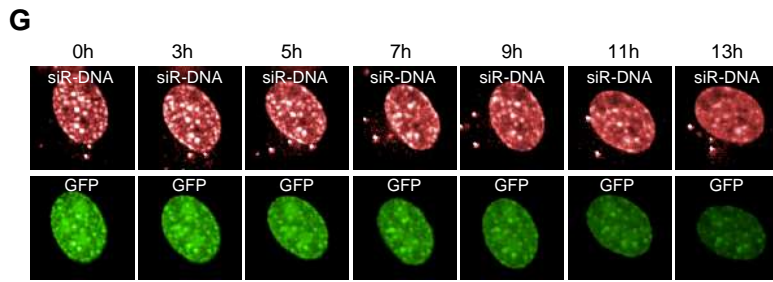


Figure 5: The formation of TRIP12 induced-chromatin condensates is a dynamic and reversible mechanism driven by polymer-polymer phase separation.

A- Visualization of CREST (top panel) and LAMIN B1 (bottom panel) and chromatin condensates in TRIP12-IDR expressing HeLaS3 cells by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

B- Representative images of chromatin condensate formation and GFP expression in IDR-GFP expressing HeLaS3 cells by live cell microscopy. Images were acquired every hour for 29 h after transfection. For the clarity of the figure, representative image of a cell 8 h after transfection and every two hours are represented. Nuclei were counterstained with SiR-DNA-647 nm.

C- Quantification of GFP expression and DNA granularity in IDR-GFP expressing HeLaS3 cells obtained by live cell microscopy. Images were acquired every hour for 29 hours by live cell confocal microscopy. GFP intensity and DNA granularity were determined using Columbus and FIJI software. Results are expressed as mean \pm SEM of at least five independent cells.

D- Expression of IDR-GFP, FLAG-tagged anti-GFP degrader in VHL-NbGFP4-FLAG expressing HeLaS3 cells determined by Western blot 24 h after increasing doses of doxycycline (0.25, 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The images are representative of several independent experiments. HSP90 protein level was used as loading control.

E- Representative images of VHL-NbGFP4-FLAG expressing in HeLaS3 cells transfected with IDR-GFP construct in the presence or not of doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h obtained by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

F- Determination of DNA granularity in function of IDR-GFP expression level in VHL-NbGFP4-FLAG expressing in HeLa cells transfected with IDR-GFP construct in the presence or not of doxycycline (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h or vehicle. For each cell, DAPI granularity and GFP expression were determined as described in Materials and Methods on over than 50 cells. Blue and green filled circles correspond to individual non transfected and transfected cells, respectively. The linear regression curve is indicated in black.

G- Representative images of DNA condensates and IDR-GFP expression in VHL-NbGFP4-FLAG expressing HeLaS3 cells transfected with IDR-GFP construct every hour (for 13 h) after addition of doxycyclin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by cell live microscopy. DNA is stained with siR-DNA-647 nm.

H- Quantification of DNA granularity and GFP intensity in VHL-NbGFP4-FLAG expressing HeLaS3 cells transfected with IDR-GFP construct every hour (for 13 h) after addition of doxycyclin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) by cell live microscopy. \pm SEM of at least five independent cells.

I- Representative images of DAPI organization in IDR-GFP expressing HeLaS3 cells in the presence of 1,6-hexanediol 0,5% or vehicle for 18 h. Cells with three different GFP intensities are represented. Nuclei are counterstained by DAPI.

J- Determination of DAPI granularity in IDR-GFP high expressing HeLaS3 cells in the presence of 1,6-hexanediol 0,5% or vehicle for 18 h as described in Materials and Methods section.

K- IDR-GFP mobility in DNA condensates by FRAP analysis. H2B-dsRed expressing HeLaS3 cells were transfected with IDR-GFP construct or H2B-GFP used as control. After 24 h, GFP fluorescence was photo-bleached using a FRAP module of confocal microscope. The recovery of fluorescence was measured every second for 35 sec. Representative images of IDR-GFP and H2B-GFP expressing cells with bleached and non-bleached areas are represented on the left. The graph represents the mean \pm SD of GFP fluorescence intensity obtained from four independent cells.

L- IDR-GFP mobility in DNA condensates by half-bleached FRAP analysis. HeLaS3 cells were transfected with IDR-GFP construct. After 24 h, GFP fluorescence in a half of a condensate was photo-bleached using a FRAP module of confocal microscope. The recovery of GFP fluorescence was measured every second for 50 sec. Representative images of IDR-GFP expressing cells with bleached and non-bleached areas before and after bleaching are represented on the left. The graph represents the fluorescence intensity obtained from one cells.

Figure 6 : Consequences of TRIP12-IDR mediated-chromatin condensates on cellular growth, chromatin accessibility and genome expression.

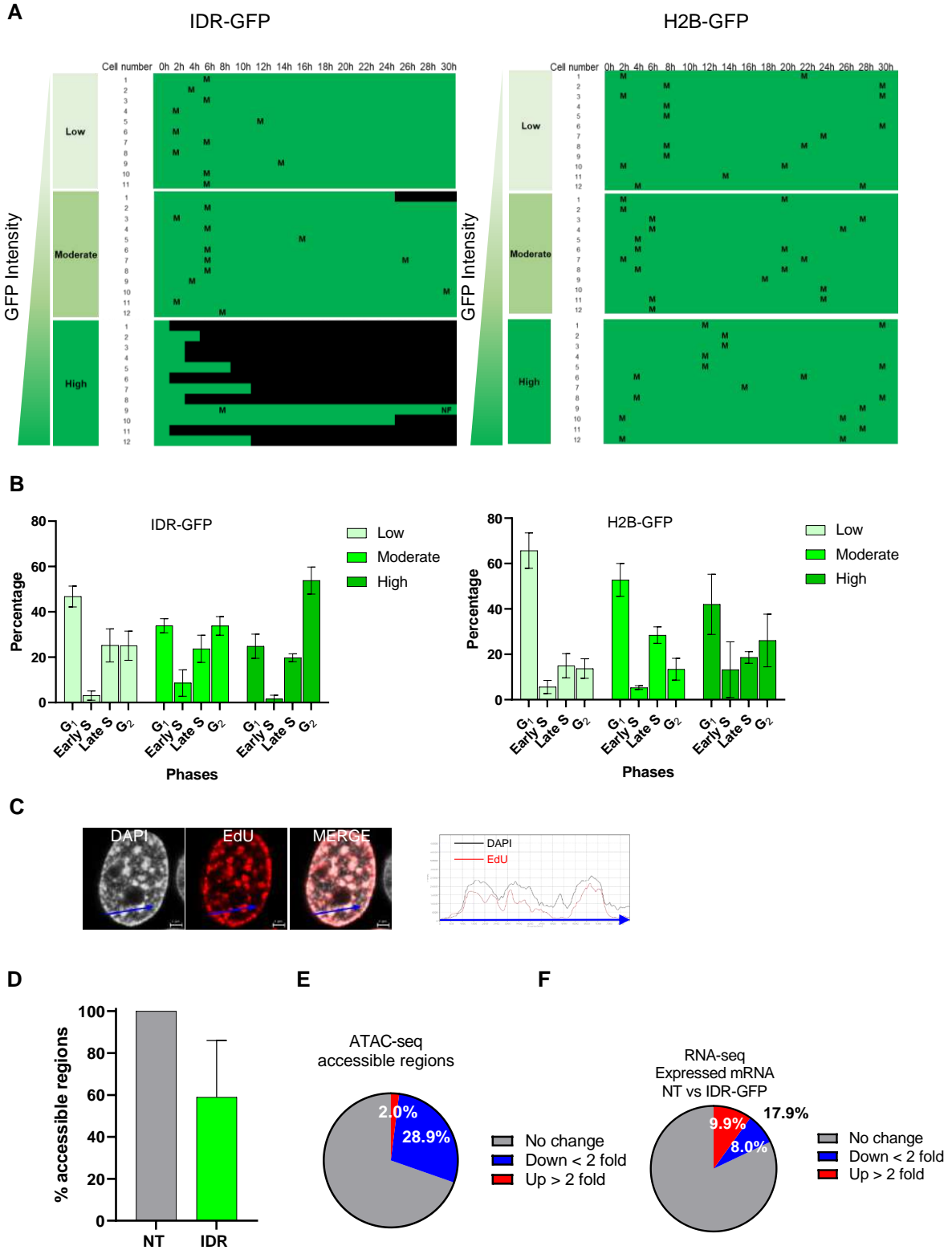


Figure 6: Consequences of TRIP12-IDR mediated-chromatin condensates on cellular growth, chromatin accessibility and genome expression.

A- Cellular fate of IDR-GFP and H2B-GFP transfected HeLaS3 cells. Twenty-four hours after transfection, fluorescence of IDR-GFP transfected cells was determined using Incucyte apparatus to classify cells in three categories: low, moderate and high. 11 to 12 cells per category were monitored for 30 h every 2 h. Mitotic divisions were annotated with a M and nuclear fusion with a NF. Green bars represent living cells whereas black bars represent dead cells.

B- Distribution in the cell cycle of IDR-GFP and H2B-GFP transfected HeLaS3 cells. Twenty-four hours after transfection, the position in the cell cycle was determined by immunofluorescence using CYCLIN A and EdU staining as described in Materials and Methods. The graph represents the percentage of cells in the different phases of the cell cycle expressed as mean (\pm SEM) of at least three independent experiments.

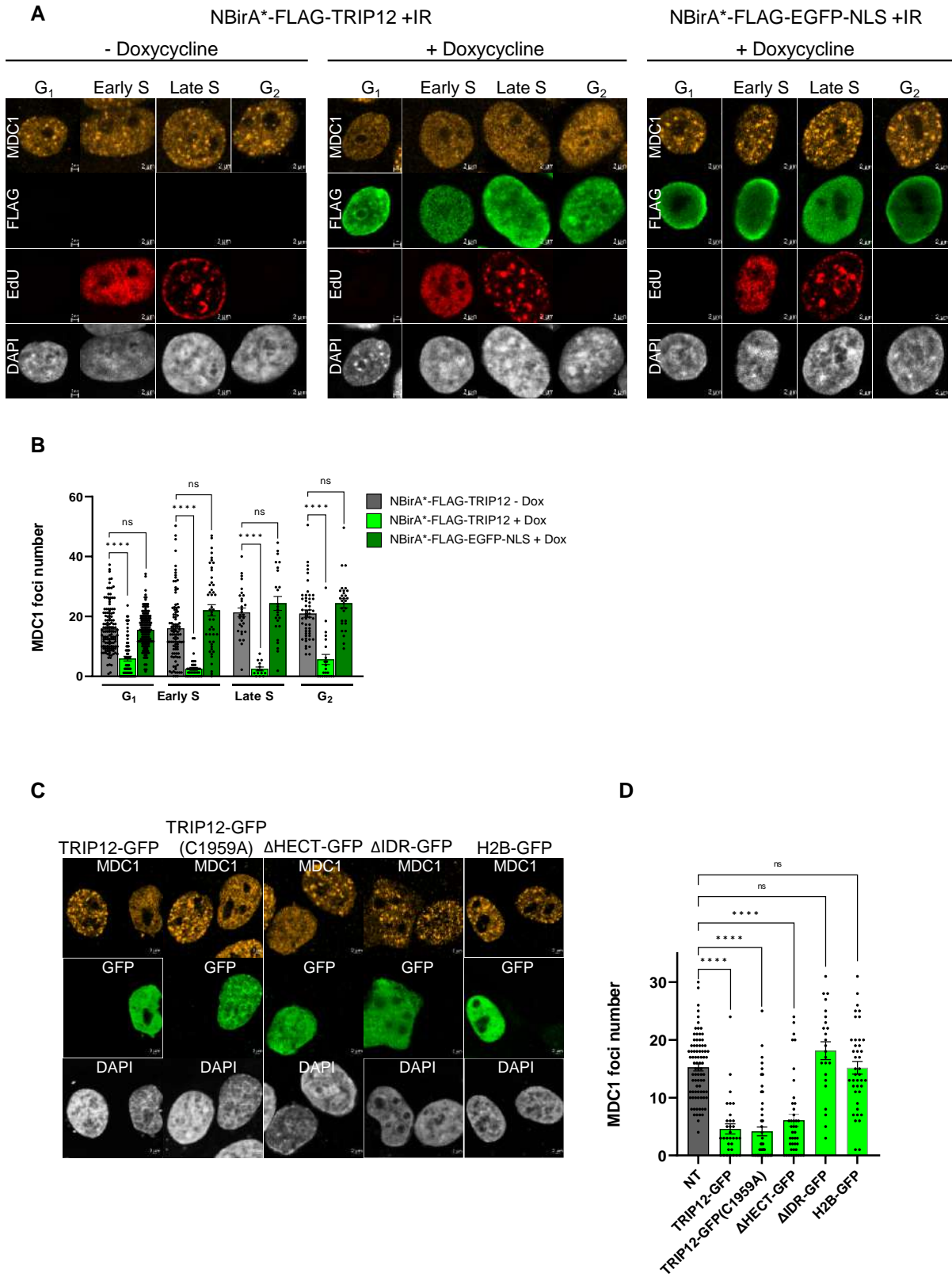
C- Representative image of EdU incorporation in IDR-GFP-mediated chromatin condensates (left). HeLaS3 cells were transfected with IDR-GFP construct. Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with EdU (1 μ M) for 20 min. Incorporation of EdU was visualized by Click-It™ followed by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI. The graph represents the intensity of fluorescence along the arrow.

D- Determination of genomic accessible regions in IDR-GFP expressing cells by ATAC-seq experiments. Only merged regions with a Max tags > 50 were considered. Results were obtained from two independent experiments and expressed as a percentage \pm SEM of genomic accessible regions compared to non-transfected cells (set as 100%).

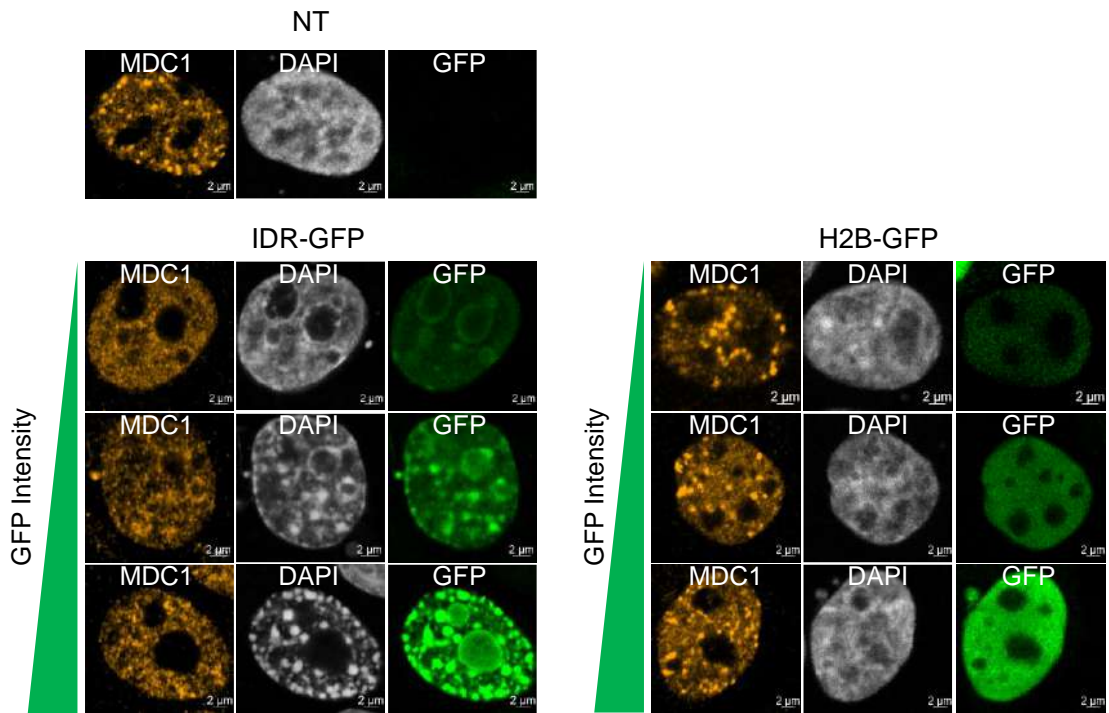
E- Percentage of accessible regions in IDR-GFP expressing HeLaS3 cells with a lower (Down, fold change<2), higher (Up, fold change>2) and unchanged accessibility compared to non-transfected cells (set as 100%). Results were obtained from two independent experiments.

F- Percentage of down (fold change<2) and up-regulated (fold change>2) mRNA in IDR-GFP expressing HeLaS3 cells compared to non-transfected cells by RNA-seq approach. Results were obtained from two independent experiments.

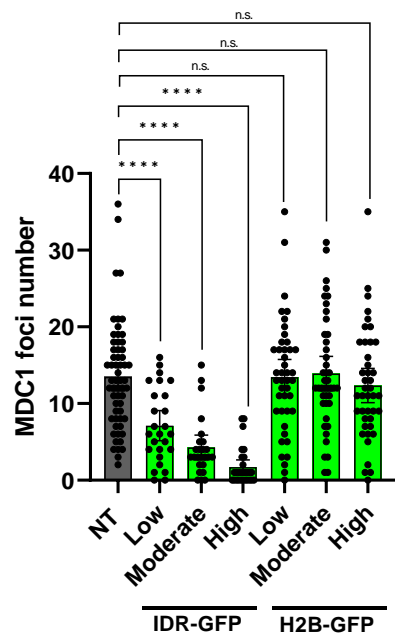
Figure 7 : TRIP12 overexpression inhibits the accumulation of MDC1 protein on DNA double strand breaks via its IDR.



E



F



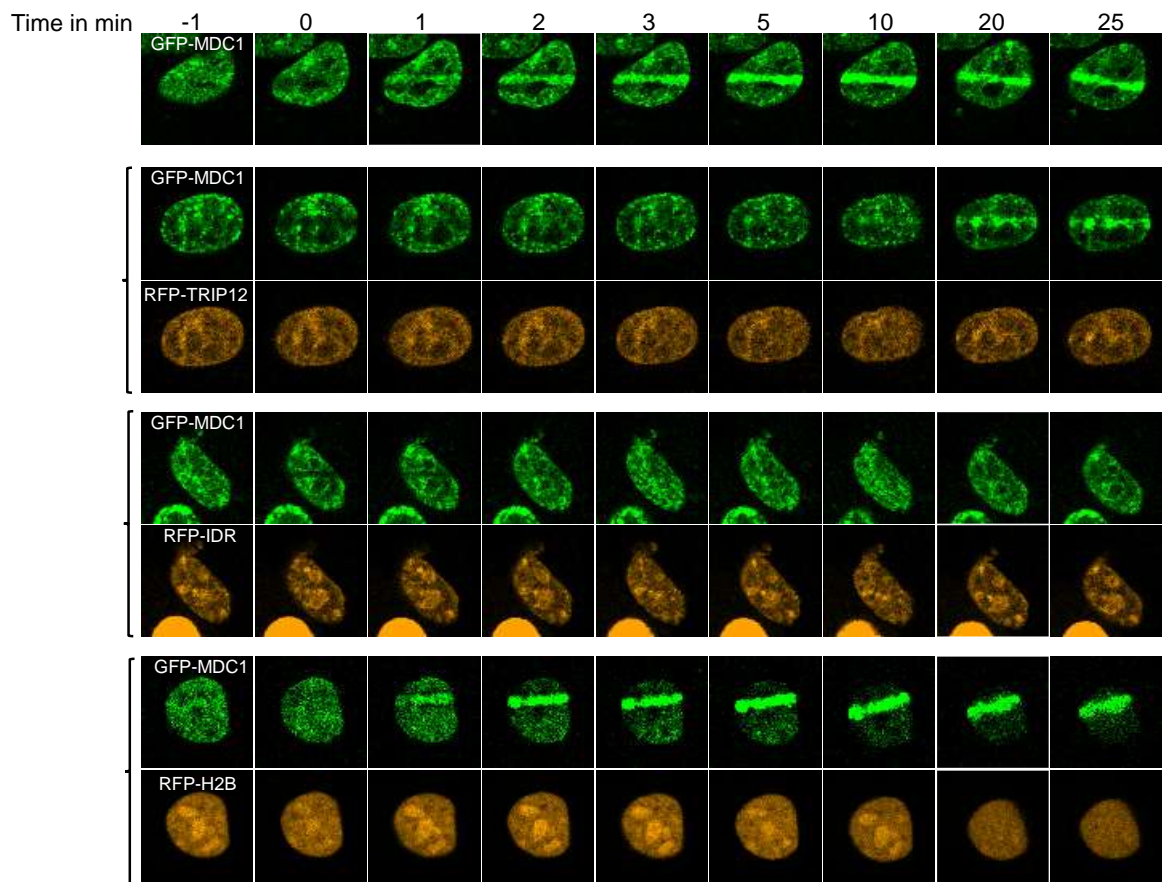
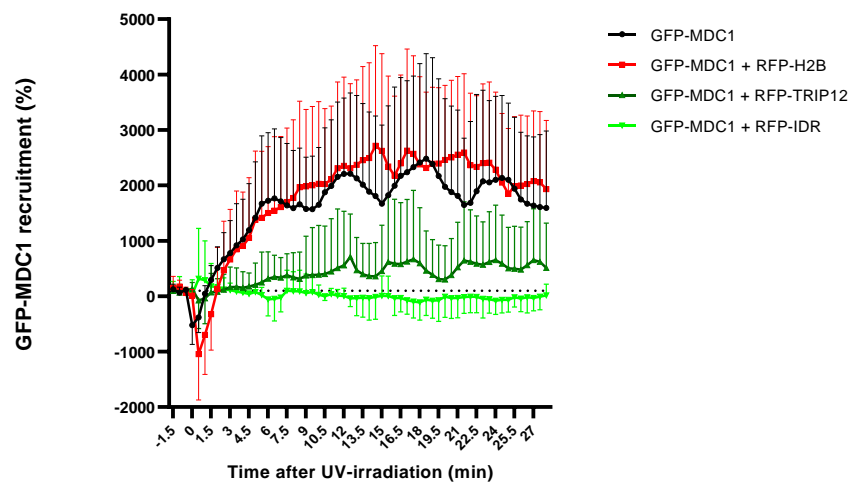
G**H**

Figure 7: TRIP12 overexpression inhibits the accumulation of MDC1 protein on DNA double strand breaks via its IDR.

A- Representative images of MDC1 foci, EdU and FLAG in irradiated NBirA*-FLAG-TRIP12 and NBirA*-FLAG-EGFP-NLS cell lines treated or not with doxycycline (1 μ g/ml for 48 h) during cell cycle phases by immunofluorescence. Cells were X ray-irradiated (1 Gy) and treated with EdU 1 h and 20 min, respectively, before the end of 48 h-doxycycline treatment. The determination of the cell cycle phase is described in Materials and Methods. Nuclei were counterstained with DAPI.

B- Quantification of MDC1 foci in irradiated NBirA*-FLAG-TRIP12 and NBirA*-FLAG-EGFP-NLS cells treated or not with doxycycline during the different phases of the cell cycle. Each dot corresponds to one cell. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from independent experiments determined by confocal microscopy and FIJI macro command.

C- Representative images of MDC1 foci and GFP staining in irradiated HeLaS3 cells transfected or not indicated GFP constructs by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI.

D- Quantification of MDC1 foci in irradiated HeLaS3 cells transfected or not indicated GFP constructs. Each dot corresponds to one cell. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from independent experiments determined by confocal microscopy and FIJI macro command.

E- Representative images of MDC1 foci and GFP by immunofluorescence in X ray-irradiated HeLaS3 cells expressing IDR-GFP or H2B-GFP. Twenty-three hours after transfection, cells were X-ray irradiated (1 Gy). A non-transfected cell and cells with three different GFP intensities are represented. Nuclei were counterstained with DAPI.

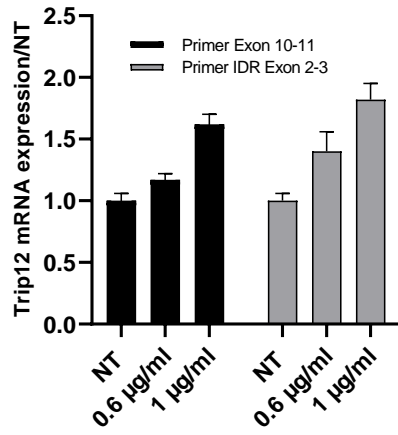
F- Quantification of MDC1 foci in irradiated IDR-GFP and H2B-GFP expressing HeLaS3 cells depending on GFP expression. IDR-GFP expressing cells were classified in low, moderate and high depending on the intensity of GFP expression. Each dot corresponds to one cell. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from independent experiments determined by confocal microscopy and FIJI macro command.

G- Representative images of GFP and RFP fluorescence in HeLaS3 cells expressing the indicated constructs and UV-laser (405 nm) micro-irradiated (time 0) at the indicated times in min by live cell microscopy. For clarity, not all the time points performed in the experiments are represented on the figure.

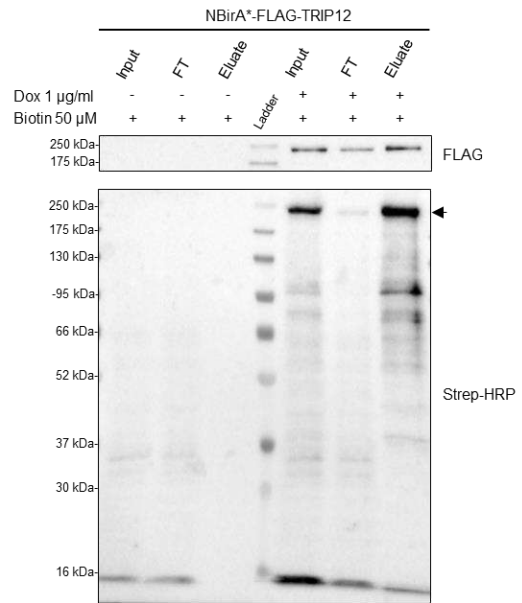
H- Quantification of GFP-MDC1 recruitment kinetics in UV-laser micro-irradiated HeLaS3 cells transfected with the indicated constructs at the indicated times. The results are expressed as mean \pm SD obtained from 10 cells of two independent experiments. The dotted line represents 100% of recruitment.

Supplemental Figure 1

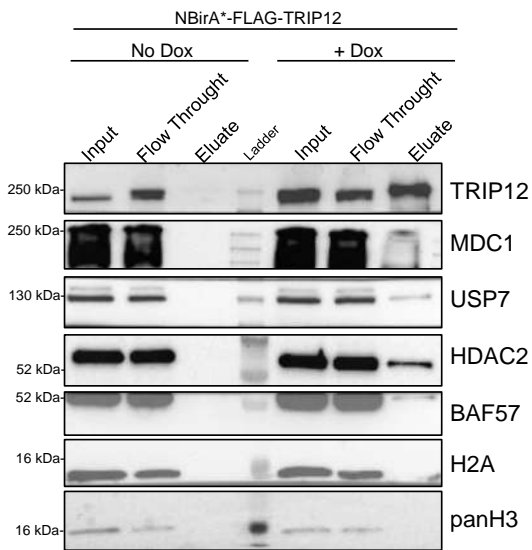
A



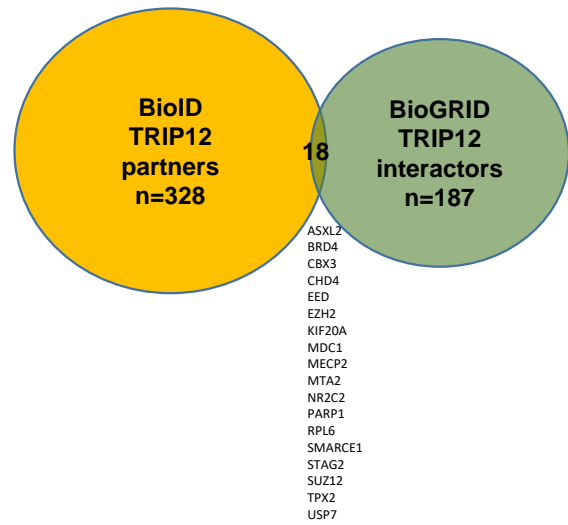
B



C



D



Supplemental figure legend 1:

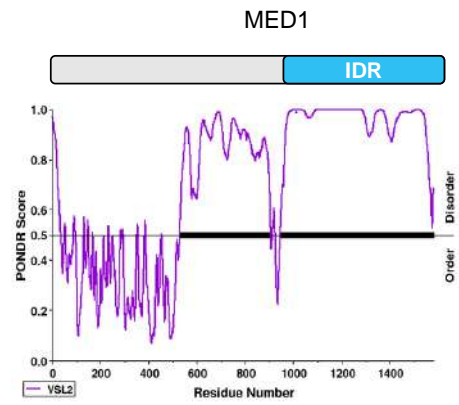
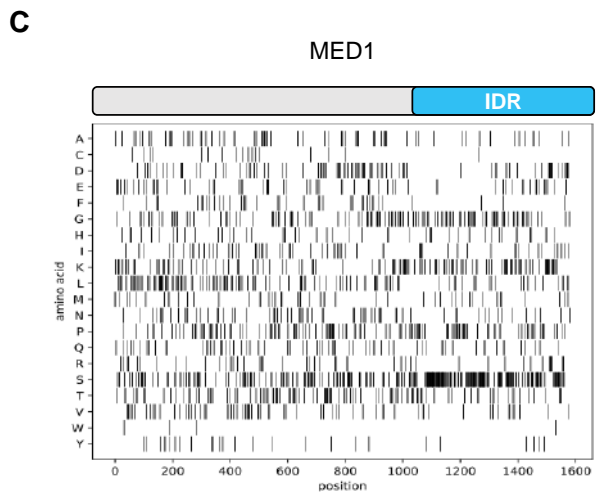
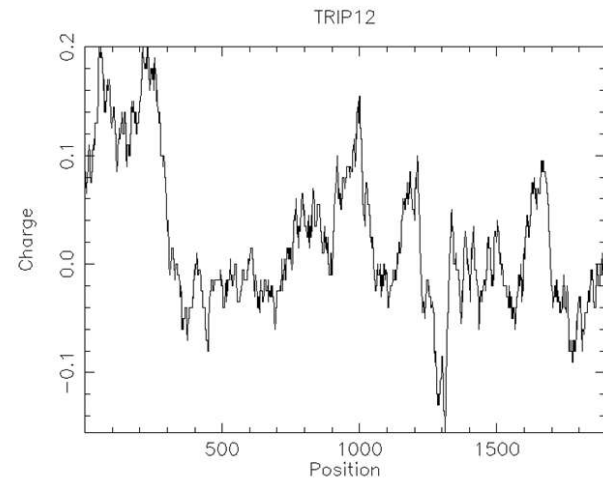
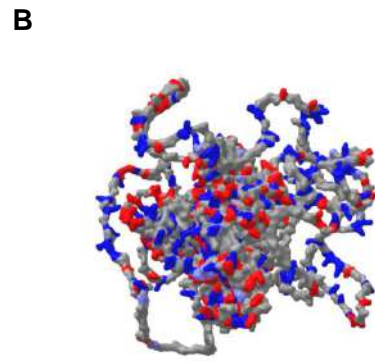
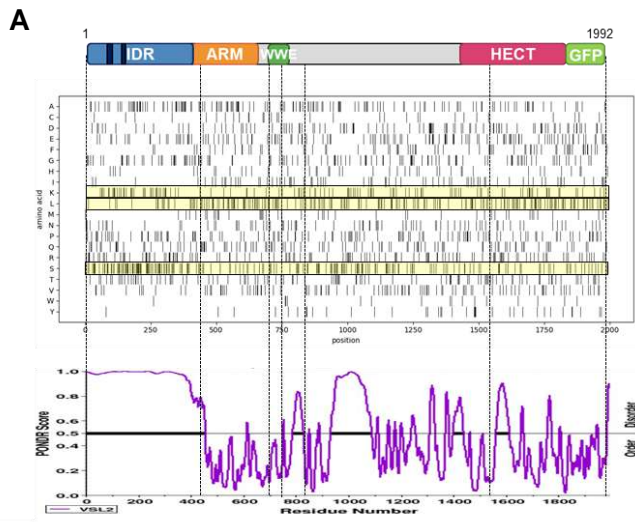
A- Trip12 mRNA expression level in response to doxycycline treatment in NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells determined by RT-qPCR. Cells were treated or not with doxycycline at the indicated concentrations for 24 h. Trip12 mRNA expression was measured using two different sets of primers. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from two independent experiments.

B- Biotinylated protein pull-down obtained from NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells. Cells were treated or not with doxycycline (1 μ g/ml) for 72 h and with biotin (50 μ M) for 24 h. Biotinylated proteins were visualized in input, flow-through (FT) and eluate fractions by Western blot analysis using streptavidin-HRP conjugate. NBirA*-FLAG-TRIP12 expression was visualized using an anti-FLAG antibody. The black arrow indicates the auto-biotinylated form of NBirA*-FLAG-TRIP12.

C- Validation of indicated protein streptavidin pull-down in input, flow-through (FT) and eluate fractions by Western blot analysis. NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells were treated or not with doxycycline (1 μ g/ml) for 72 h and with biotin (50 μ M) for 24h.

D- Venn diagram of BioID TRIP12 partners (n=328) and BioGRID TRIP12 interactors (n=187). Protein in common (n=18) are listed under the diagram.

Supplemental Figure 2



Supplemental figure legend 2:

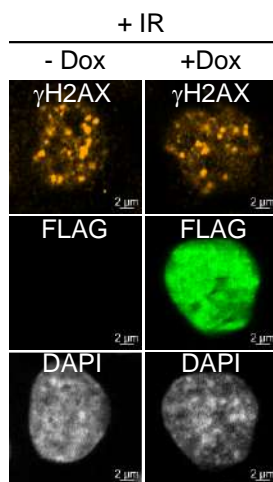
A- Graphical representation of human TRIP12 protein sequence (top panel). Amino acid composition of TRIP12 protein (second panel). Lysine (K), leucine (L) and serine (S) residues are highlighted in yellow. Prediction of natural disordered regions in TRIP12 protein using PONDR® website (third panel). Electric charge of TRIP12 protein using Expsy-Compute pI/MW tool (Bottom panel).

B- 3D representation of positive (blue) and negative (red) electric patches on TRIP12 protein using AlphaFold.

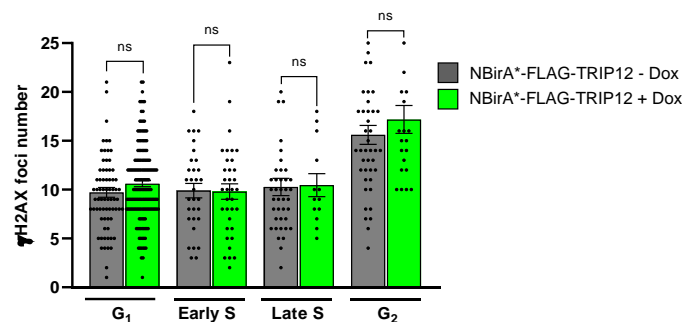
C- Graphical representation of human MED1 protein sequence (top panel). Amino acid composition of MED1 protein (second panel). Lysine (K), leucine (L) and serine (S) residues are highlighted in yellow. Prediction of natural disordered regions in MED1 protein using PONDR® website (third panel).

Supplemental Figure 3

A



B



Supplemental figure legend 3:

A- Representative images of γ H2AX foci, and FLAG in irradiated NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells treated or not with doxycycline (1 μ g/ml for 48 h). Cells were X ray-irradiated (1 Gy) 1 h before the end of doxycycline treatment. The determination of the cell cycle phase is described in Materials and Methods. Nuclei were counterstained with DAPI.

B- Quantification of γ H2AX foci in irradiated NBirA*-FLAG-TRIP12 expressing HeLaS3 cells treated or not with doxycycline during the different phase of the cell cycle determined by confocal microscopy and FIJI macro command. Each dot corresponds to one cell. Results are expressed as mean \pm SEM obtained from independent.

Supplemental Table 1: List of primers

qPCR	Sequences
Trip12 exon 10-11 Forward	5'-ATATTATGAACCATGCTTGTTCGAG-3'
Trip12 exon 10-11 Reverse	5'-CTCTGCCACATCAATACACTGAAT-3'
Trip12 exon 2-3 Forward	5'-CTGTGCTAGTACCAGTCGGC-3'
Trip12 exon 2-3 Reverse	5'-GAGCTTCATCTGTCCGAGCA-3'
Cyclophilin A Forward	5'-GTCAACCCACCGTGTCTT-3
Cyclophilin A Reverse	5'-CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT-3'
Gapdh Forward	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'
Gapdh Reverse	5'-GTAICTCGCTCCTGGAAGATG-3'
Plasmid construction	
MED1 NLS IDR Gateway Forward	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGACCATGGCGCCGAAGA AGAAGCGAAAGGTTCGAGCATCACAGTGGTAGTCAGGGT-3'
MED1 NLS IDR Gateway Reverse	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGTGAAGATCATCTTCCTCCCC-3'

Supplemental Table 2: List of antibody and conjugates

Proteins	Immunofluorescence dilution	Western blot dilution	RRID	References
TRIP12	1/1000	1/1000	AB_1264344	Bethyl A301-814A
TRIP12	1/1000	NA	AB_2675340	Sigma HPA 036835
GFP	1/500	1/1000	AB_523903	Novus Bio NB100-1770
PCNA	N/A	1/5000	AB_628110	Santa-Cruz SC-56
53BP1	1/2000	N/A	AB_10003037	Novus Bio NB 100-304
γ H2AX	1/500	N/A	AB_350295	Novus Bio NB 100-384
MDC1	1/1000	1/1000	AB_10001489	Novus Bio NB-100-395
FLAG tag	1/2000	1/5000	AB_262044	Sigma F1804
FITC-Streptavidin	1/1000	N/A	-	eBioscience11-4317-87
HSP90	NA	1/1000	AB_2121214	Cell Signaling 4874
HRP-Streptavidin	NA	1/2000	x	ThermoFisher S911
CYCLIN A2	1/1000	N/A	AB_1949884	Genetex 103042
CYCLIN A2	1/1000	N/A	AB_631329	Santa Cruz SC751
GAPDH	NA	1/2000	AB_10622025	Cell Signaling 5174
HA tag	1/1000	1/1000	AB_1549585	Cell Signaling 3724
Lamin B1	1/500	N/A	AB_2136290	Proteintech 12987-1-AP
CREST	1/1000	N/A	-	³⁵
HP1 alpha	1/100	N/A	AB_2614983	Active motif 39977
H3K9me3	1/1000	N/A	AB_306848	Abcam ab8898
EZH2	1/1000	N/A	AB_10694683	Cell Signaling 5246
H3K27me3	1/1000	N/A	AB_2616029	Cell Signaling 9733
H2AK119Ub	1/1000	N/A	AB_10891618	Cell Signaling 8240
USP7	N/A	1/1000	AB_203276	Bethyl A300-033A
HDAC2	N/A	1/1000	AB_2118563	Santa Cruz sc-7899
BAF57	1/1000	N/A	A300-810A-T	Bethyl A300-810A-T
H2A	1/5000	N/A	AB_2885986	GeneTex GTX129418
panH3	1/10.000	N/A	AB_417398	Upstate 07-690
RNA pol II pSer2	1/500	N/A	AB_2687450	Active motif 61083
RNA pol II pSer5	1/1000	N/A	AB_2687451	Active motif 61085
Alexa Fluor 555 anti rabbit	1/1000	N/A	AB_2535849	Invitrogen A-21428
Alexa Fluor 448 anti goat	1/1000	N/A	AB_2534102	Invitrogen A-11055
Alexa Fluor 647 anti mouse	1/1000	N/A	AB_2535804	Invitrogen A-21235
Alexa Fluor 568 anti rat	1/1000	N/A	AB_2534121	Invitrogen A-11077

Supplemental Table 3: Most enriched proteins in BioID experiment with fold change (log2) and p value

Gene name	Log2(FC)	-Log10(q value 0.05)
H2AZ2	5,19	2,26
TRIP12	4,69	2,28
TAF7	4,60	4,18
ZZZ3	4,24	6,98
MDC1	4,14	2,53
ZNF512B	4,10	4,76
TPX2	4,09	3,11
RBBP4	4,04	2,98
SCML2	4,04	3,48
HEXIM1	3,98	4,21
TAF5	3,98	4,62
XPC	3,94	3,98
PHF2	3,89	3,78
BAZ2A	3,86	3,19
ORC2	3,85	3,46
CXorf56	3,85	4,39
SGO2	3,84	7,96
CDCA2	3,81	4,26
PRPF19	3,79	4,45
FLYWCH1	3,71	3,96
NPM1	3,70	2,63
LRWD1	3,70	3,29
ORC5	3,67	2,28
TCF20	3,62	3,66
PPP1R10	3,62	3,80
BRD7	3,59	5,58
HIVEP1	3,58	3,29
BEND3	3,57	4,14
INTS12	3,57	4,26
CHD7	3,53	5,62
GLYR1	3,52	3,57
BAZ1B	3,51	3,02
KPNA4	3,49	2,96
CEBPB	3,49	4,13
KANSL1	3,49	4,64
CDCA8	3,47	5,12
ZNF280D	3,47	3,93
ZKSCAN4	3,45	3,44
MBD2	3,44	4,49
ZNF174	3,42	4,15
RSF1	3,41	2,52
NR2C2	3,39	4,05
ZBTB33	3,35	5,23
BRD2	3,34	3,60

HMGXB4	3,32	6,24
RNF2	3,30	4,84
CUX1	3,30	5,56
ATRX	3,29	3,71
RBBP7	3,28	2,68
KPNA3	3,27	7,11
SIN3A	3,27	4,85
NSD3	3,24	4,98
BNC2	3,24	4,94
PAF1	3,24	3,95
USP7	3,24	4,35
BAZ2B	3,23	4,47
SRCAP	3,23	3,70
AHCTF1	3,22	3,30
CHD4	3,21	4,68
ZNF280C	3,21	3,38
GPATCH4	3,20	4,33
POGZ	3,20	6,87
CBX3	3,20	1,86
TAF4	3,19	4,45
SIN3B	3,18	4,22
TOX4	3,18	3,02
TAF6L	3,15	5,26
MFAP1	3,14	5,33
ZNF462	3,14	5,30
WAPL	3,12	4,98
SUGP1	3,11	4,14
ZNF148	3,10	4,27
NSD1	3,09	6,17
RSL24D1	3,07	3,11
MIDEAS	3,07	3,07
ATF3	3,07	3,82
SMARCA5	3,06	3,73
DNTTIP2	3,06	3,50
ZNF384	3,05	2,86
AATF	3,05	3,49
NUMA1	3,05	4,46
IWS1	3,03	2,85
WIZ	3,03	4,21
HP1BP3	3,03	5,00
ORC3	3,01	1,88
DIDO1	2,99	5,56
ADNP	2,99	3,87
LRIF1	2,98	3,42
DDX52	2,98	4,14

MBD4	2,97	5,21
ZNF512	2,97	5,95
DHX8	2,97	6,55
FIP1L1	2,96	5,33
RREB1	2,95	3,82
PRDM2	2,94	3,68
INCENP	2,93	4,22
EPC2	2,92	3,57
EHMT1	2,91	4,38
EHMT2	2,91	4,44
MECP2	2,90	2,92
RECQL	2,90	3,84
KMT2A	2,90	5,40
JUNB	2,88	2,83
TRIR	2,88	3,20
PCGF1	2,86	5,48
ZNF644	2,85	5,76
BOD1L1	2,85	3,96
EP400	2,84	5,03
SUPT20H	2,83	4,75
ELOA	2,82	3,66
RPS7	2,82	4,60
TOMM40	2,82	2,15
ZNF131	2,81	3,49
AFF4	2,81	4,29
CHAMP1	2,81	5,89
EZH2	2,81	5,12
KIF20B	2,81	5,99
ZNF696	2,80	2,87
CHD1	2,80	4,13
ASH2L	2,80	5,81
NPM3	2,80	2,06
TAF1	2,80	3,76
PNISR	2,79	5,86
VIRMA	2,78	4,81
UTP3	2,77	3,76
ZNF66	2,77	4,09
PBRM1	2,76	6,02
RIF1	2,75	5,08
ZSCAN21	2,74	4,07
PPP1CB	2,74	4,27
BRD4	2,73	5,09
MKI67	2,72	3,76
SUDS3	2,71	4,70
HDAC2	2,71	5,36

BLM	2,70	6,44
KANSL3	2,70	3,48
ATAD2	2,70	3,07
SUZ12	2,70	5,78
PHC2	2,68	5,30
RNF169	2,67	4,43
PHF12	2,67	4,17
BAP18	2,66	1,49
RFC1	2,65	4,83
MBD3	2,65	4,45
MPHOSPH10	2,64	4,26
ARHGAP11A	2,64	4,77
DDX10	2,63	4,17
GATAD2B	2,62	6,18
ASH1L	2,62	5,09
SMARCA1	2,60	4,60
NOP10	2,60	2,96
KIF18B	2,59	4,32
NSD2	2,59	7,14
KNOP1	2,59	3,93
RAI1	2,59	4,95
TAF6	2,59	4,57
H2AC4	2,58	1,70
ARID2	2,58	5,34
TPR	2,58	3,65
CBX1	2,58	2,37
ZFC3H1	2,57	4,25
ZNF318	2,56	3,63
TRIML2	2,56	1,53
CHD3	2,56	4,74
RRP1B	2,56	5,09
MTA1	2,56	4,65
H4C1	2,55	2,27
CSNK2A2	2,54	5,47
PPP2R2A	2,53	3,28
HNRNPUL1	2,53	3,23
KAT7	2,53	2,80
BMI1	2,53	4,40
DLGAP5	2,52	4,56
KPNB1	2,52	3,13
BAZ1A	2,52	3,48
SMARCA2	2,52	4,67
SMARCE1	2,52	3,42
ZMYND11	2,52	2,89
GPATCH1	2,51	3,27

MICOS13	2,51	3,08
PARP1	2,50	2,86
YEATS2	2,50	5,22
CENPB	2,50	2,60
KAT14	2,50	6,00
UHRF2	2,49	3,15
ANKRD11	2,48	3,62
AK3	2,48	4,98
FAM207A	2,48	5,10
STAG2	2,47	3,64
INO80	2,46	6,19
NFIC	2,46	3,19
RLF	2,46	4,47
REXO4	2,46	4,11
TFAP2A	2,46	3,25
GATAD2A	2,46	4,49
MSANTD2	2,45	3,55
MAPKAPK2	2,44	1,80
HDAC1	2,44	4,06
RNPS1	2,43	2,41
EPC1	2,42	5,27
C5orf24	2,42	2,89
BCLAF1	2,42	5,22
BRIX1	2,41	3,20
CBX5	2,41	2,88
WDR43	2,40	3,17
NFRKB	2,40	3,56
MLLT3	2,40	5,77
ATAD2B	2,37	2,90
GNL2	2,37	7,21
CEBPZ	2,37	5,63
NAT10	2,37	4,12
RRP8	2,37	6,13
CKAP2L	2,36	4,75
NFE2L1	2,36	2,96
CHD8	2,35	4,55
PHAX	2,35	5,27
RRP7A	2,35	3,34
GTF2E2	2,35	1,85
ZBTB9	2,34	5,52
ACIN1	2,34	5,82
URB1	2,34	4,00
DMAP1	2,33	4,88
TOP2A	2,33	2,65
ATAD5	2,32	5,38

JUN	2,32	2,67
PRPF3	2,32	5,04
PHF10	2,32	5,81
KDM2A	2,32	3,31
AURKB	2,31	3,82
PUM3	2,31	3,56
TAF10	2,30	2,57
EXOSC7	2,30	2,84
POLR1G	2,30	3,38
APOBEC3B	2,29	3,76
EED	2,29	4,64
SRFBP1	2,29	5,61
EMSY	2,28	4,84
RBM10	2,28	5,08
PHRF1	2,28	4,07
NOL9	2,28	5,51
NBN	2,28	4,09
ASXL2	2,28	4,49
NCL	2,28	4,40
PCNP	2,28	2,85
TASOR	2,27	6,49
NOP14	2,27	3,17
ACTL6A	2,26	4,67
DHX57	2,26	2,50
PHF14	2,26	2,85
MGA	2,26	6,24
NOP9	2,25	4,04
DDX55	2,25	2,85
CENPF	2,24	5,57
UQCRFS1	2,24	2,63
MACROH2A1	2,23	2,94
ZC3H18	2,22	2,84
INTS3	2,22	4,09
RSL1D1	2,22	2,23
RBM27	2,22	4,51
RPRD2	2,21	5,12
BRMS1L	2,21	4,23
MLLT1	2,20	5,24
ZMYND8	2,20	3,24
MYBBP1A	2,19	3,42
CHD2	2,19	3,24
MTCH2	2,19	2,12
NKTR	2,19	3,37
U2SURP	2,18	5,88
EPB41L5	2,18	3,79

SMARCA4	2,17	5,15
ZNF281	2,17	4,52
SGF29	2,17	4,86
PHIP	2,16	2,73
ZMYM4	2,15	7,40
CACTIN	2,15	2,57
ZBTB21	2,15	3,12
RRP36	2,15	3,20
RPL6	2,14	4,68
GTF3C1	2,14	5,39
GTF3C3	2,14	4,64
CDCA5	2,14	4,12
ZFHX3	2,14	2,90
CENPC	2,14	3,66
FNBP4	2,13	2,67
SART3	2,13	3,90
MEF2D	2,13	1,91
HCFC1	2,13	5,46
ESF1	2,12	3,64
ZNF770	2,12	2,68
ZMYM3	2,12	3,02
IPO7	2,11	4,33
DDX46	2,11	3,63
BCORL1	2,11	3,11
KIF20A	2,11	3,77
KANSL2	2,10	3,45
CTR9	2,10	3,70
MTA2	2,09	4,12
PES1	2,09	4,12
ZMYM1	2,08	2,27
MRGBP	2,08	3,86
ZNF146	2,08	1,53
WRNIP1	2,08	3,92
PNN	2,08	5,11
SPEN	2,07	3,35
MGST3	2,07	2,42
POLR3C	2,07	2,62
BRCA1	2,07	4,74
CBX8	2,06	4,96
ZNF592	2,06	5,04
TOP2B	2,06	2,66
TENT4B	2,06	3,39
ELL2	2,06	3,12
KDM5A	2,05	4,32
PSIP1	2,05	2,57

TNPO3	2,05	3,33
SYF2	2,05	1,81
SNRPE	2,05	2,31
ZC3H14	2,04	3,95
SMARCC2	2,04	4,55
BPTF	2,04	4,07
KIF22	2,04	4,16
SLC25A6	2,03	1,47
HIRA	2,03	3,54
NIPBL	2,03	5,13
USP36	2,02	5,19
UBTF	2,02	3,22
LARP7	2,02	3,24
TRIM26	2,02	2,91
PAXB1	2,01	3,07
THRAP3	2,01	5,40
HIGD1A	2,00	1,82

II. Les résultats complémentaires sur la réparation des dommages à l'ADN.

a. Le contexte

Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, (*Chapitre 1 Partie 3.II.d*) TRIP12 est impliquée dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN via son activité d'E3 ubiquitine ligase en contrôlant la stabilité de RNF168 et de PARP1^{188,205}. Dans les données de BioID obtenues dans l'article n°1, la protéine MDC1 (Mediator of DNA Checkpoint 1) figure parmi les plus abondantes. MDC1 est impliquée dans la détection des cassures de l'ADN. Elle permet le recrutement des effecteurs de la réparation (*Chapitre 1 Partie 1.2.c*). De plus, les résultats de la Figure 7 de l'article n°1 montre que TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1 suite à des cassures induites par irradiation aux rayons X. TRIP12 est surexprimée dans de nombreux cancers notamment celui du pancréas. Elle est de plus nécessaire à la carcinogénèse pancréatique dans la mesure où l'inactivation du gène Trip12 au sein de modèles murins inhibe l'initiation de la carcinogénèse pancréatique et le caractère métastatique des tumeurs (*Article n°2*).

L'objectif de ces travaux complémentaires est de mesurer les conséquences d'une surexpression de TRIP12 sur la réponse aux dommages à l'ADN. Ces expériences ont été réalisées avec l'aide d'un stagiaire de M2 (Alban Ricard) qui poursuivra ces travaux en thèse dans l'équipe sur ce sujet.

b. Matériels et méthodes

La majorité des techniques, lignées cellulaires et méthodes d'analyse sont identiques à l'article n°1. Seules les techniques différentes et les anticorps supplémentaires sont détaillés ci-dessous.

i. Traitement des cellules

Les lignées stables HeLaS3 NBirA*-TRIP12 et NBirA*-EGFP contiennent un gène codant pour NBirA*-TRIP12-FLAG et NBirA*-EGFP-FLAG dont l'expression est inductible par l'addition de doxycycline à 1 µg/ml pendant 24 h. Les cellules HeLaS3 NBirA*-TRIP12 et NBirA*-EGFP ont été incubées 15 min en présence de 10 µM de 5'-Ethylnyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Life Technologies). Les différentes lignées cellulaires ont été irradiées avec une dose de 1 Gray de rayons X à l'aide d'un irradiateur XRAD SMART.

ii. Quantification d'immunofluorescence.

La quantification du nombre des foyers γ H2AX, MDC1, 53BP1, BRCA1, FK2 ainsi que l'intensité de fluorescence des marquages GFP et MDC1 a été réalisée après acquisition d'images haute résolution à l'aide d'un microscope confocal LSM 880 FAST AiryScan (objectif x63-Zeiss). Après séparation et segmentation des images, le nombre de foyers et l'intensité de fluorescence ont été déterminés à l'aide d'une macrocommande FIJI implémentée dans l'équipe. Le traitement des fichiers générés par FIJI a été réalisé via un script Python développé dans l'équipe. Un minimum de deux expériences indépendantes a été réalisé pour chaque analyse.

iii. Analyses statistiques.

Les différences du nombre moyen de foyers par cellule et d'intensité de fluorescence ont été comparées par un test statistique de Mann-Whitney non paramétrique (unpaired, two-tailed) à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9.5.0. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- SEM. ns pour non significatif. *, **, *** et **** indiquent respectivement une valeur $p < 0.05$, 0.01, 0.005 et 0.001.

Tableau 1: Anticorps primaires

Protéines	Dilution pour l'immunofluorescence	Dilution pour le Western Blot	Références
53BP1	1/2000	NA	Novus Bio NB 100-304
BRCA1	1/500	NA	Santa Cruz C-20
γ H2AX	1/2000	NA	Novus Bio 100-384
TRIP12	1/1000	1/1000	²⁷⁰
CYCLINE A2	1/1000	NA	Genetex 103042
PCNA	NA	1/1000	AbCam Ab29
FK2	1/1000	NA	Millipore 04-263

c. Les résultats

i. *L'expression de TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures endogènes de l'ADN sans modifier son expression protéique.*

La protéine MDC1 s'accumule de part et d'autre des cassures de l'ADN sous forme de foyers après seulement quelques minutes grâce notamment à son reconnaissance des histones H2AX phosphorylées (γ H2AX). Cette formation de foyers MDC1 joue un rôle primordial dans l'efficacité des réponses aux dommages à l'ADN. Compte tenu de l'abondance de MDC1 à proximité de TRIP12 et de l'inhibition de la formation de foyers MDC1 en condition de cassures générées par rayons X (**Article 1, Figure 7**), nous nous sommes intéressés à l'impact d'une surexpression de TRIP12 sur l'accumulation de MDC1 sur les cassures endogènes de la cellule. Pour cela, la lignée cellulaire générée pour l'identification du proxisome de TRIP12 a été utilisée. Cette lignée cellulaire HeLaS3 permet la surexpression de TRIP12 fusionnée à une forme mutée de la biotine ligase BirA* (NBirA*-FLAG-TRIP12) par addition de doxycycline. Dans un premier temps, le nombre de foyers MDC1 dans cette lignée a été déterminé par immunofluorescence. Le nombre de cassures de l'ADN dans une cellule variant selon l'étape du cycle cellulaire, l'état d'avancement des cellules dans le cycle (G_1 , début de S, fin de S et G_2) a été déterminé à l'aide d'une incorporation d'EdU et d'une coloration de l'ADN au DAPI (**Figure 1A**). Ainsi, un plus grand nombre de foyers MDC1 est visualisé en fin de phase S et G_2 comparativement à la phase G_1 et au début de phase S. Ces foyers correspondent à la réponse de la cellule à des cassures endogènes de l'ADN générées au cours de la réplication (**Figure 1A**). En présence de doxycycline, la surexpression de NBirA*-FLAG-TRIP12 induit une diminution significative de ce nombre de foyers MDC1 dans les cellules en fin de phase S et G_2 (**Figure 1B**). L'accumulation de MDC1 au niveau des cassures a été validée par la co-localisation avec les foyers γ H2AX, marqueurs précoces des cassures (**Figure 1C**).

Compte tenu de la fonction ubiquitine ligase de TRIP12, l'impact de TRIP12 sur le niveau d'expression de la protéine MDC1 a été mesuré. Pour cela, le niveau d'intensité de fluorescence correspondant à MDC1 a été quantifié en fonction du cycle cellulaire (**Figure 1D**). Cette quantification montre que la surexpression de NBirA*-TRIP12 n'affecte pas le niveau d'expression de MDC1 quel que soit le stade du cycle cellulaire. Ce résultat a été confirmé par une approche de Western Blot dans laquelle une surexpression de NBirA*-TRIP12 n'induit pas de changement de l'expression protéique de MDC1 (**Figure 1E**).

L'ensemble de ces résultats et la figure 7 de l'article n°1 montrent qu'une surexpression de TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1 suite à des dommages à l'ADN endogènes ou dus à un agent exogène sans modifier le niveau d'expression de MDC1.

ii. *TRIP12 ne s'accumule pas au niveau des cassures de l'ADN.*

Plusieurs études ont montré l'implication de TRIP12 dans la réponse aux cassures de l'ADN. Toutefois, la localisation et l'accumulation de TRIP12 au niveau de ces cassures n'ont jamais été documentées. Pour cela, les cellules HeLaS3 NBirA*-FLAG-TRIP12 ont été irradiées aux rayons X. Une heure après irradiation, la protéine NBirA*-FLAG-TRIP12 ne forme pas de foyers au niveau des cassures de l'ADN visualisées par la présence de foyers γ H2AX (**Figure 2A**). Des résultats similaires sur des cellules HeLaS3 irradiées ont été obtenus à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine TRIP12 endogène (**Figure 2B**). L'ensemble de ces résultats démontre que TRIP12 ne s'accumule pas au niveau des cassures de l'ADN une heure après irradiation mais pour autant inhibe l'accumulation de MDC1.

iii. La surexpression de TRIP12 modifie les signaux de transduction de la DDR en aval de MDC1.

Compte tenu du rôle inhibiteur de TRIP12, via son IDR, sur l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures de l'ADN (**Article 1 Figure 7**), nous nous sommes intéressés à la signalisation de ces cassures en aval de MDC1. En effet, MDC1 participe au recrutement de l'ubiquitine ligase RNF8 (laquelle assure l'ubiquitination des histones de part et d'autre des cassures) ou de molécules-clés de la DDR, telles que 53BP1 et BRCA1.

A l'instar de la phosphorylation de H2AX, l'ubiquitination des histones joue un rôle important dans la détection et par conséquent, la réparation des dommages à l'ADN. Ainsi, l'ubiquitination des histones suite à une irradiation a été mesurée en présence d'IDR-GFP de TRIP12. Nos analyses montrent une diminution significative du nombre de foyers d'histones ubiquitinées (déterminée à l'aide d'un anticorps FK2 dirigé contre les protéines ubiquitinées) en présence de l'IDR-GFP (**Figures 3A et 3B**). De plus, cette inhibition des foyers d'histones ubiquitinées est dépendante de la quantité d'IDR-GFP (**Figure 3B**). L'accumulation sous forme de foyers des molécules 53BP1 et BRCA1 après expression de la protéine IDR-GFP a également été mesurée par immunofluorescence. Une heure après irradiation, l'expression de l'IDR-GFP diminue significativement le nombre de foyers 53BP1 et BRCA1 que ce soit en début ou en fin de cycle cellulaire (**Figures 3C à 3F**).

Ainsi, la surexpression de l'IDR de TRIP12 affecte les capacités d'accumulation de protéines-clés de la détection des DSB en aval de MDC1. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une surexpression de TRIP12 perturbe les capacités de détection et par conséquent de réparation des cassures de l'ADN de la cellule.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une surexpression de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 affecte l'efficacité de la réponse aux dommages à l'ADN en inhibant l'accumulation de la protéine MDC1 au niveau des cassures. L'originalité de ces résultats est que le rôle inhibiteur de TRIP12 dans la formation des foyers MDC1 est indépendante de son activité catalytique mais dépendant de son IDR.

iv. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montre qu'une surexpression de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 affecte l'efficacité de la réponse aux dommages à l'ADN en inhibant l'accumulation de la protéine MDC1 au niveau des cassures. TRIP12 était déjà connue pour avoir un rôle inhibiteur de la réponse aux dommages à l'ADN via son activité d'E3 ubiquitine ligase sur les protéines RNF168²⁰⁵ et PARP1¹⁸⁸. Mais l'originalité de ces travaux réside dans l'identification d'un rôle fonctionnel de l'IDR de TRIP12. En effet, ces données démontrent que ce rôle inhibiteur de TRIP12 sur l'accumulation de MDC1 est indépendant de son activité catalytique mais dépendant de son domaine intrinsèquement désordonné.

d. Figures

Figure 1

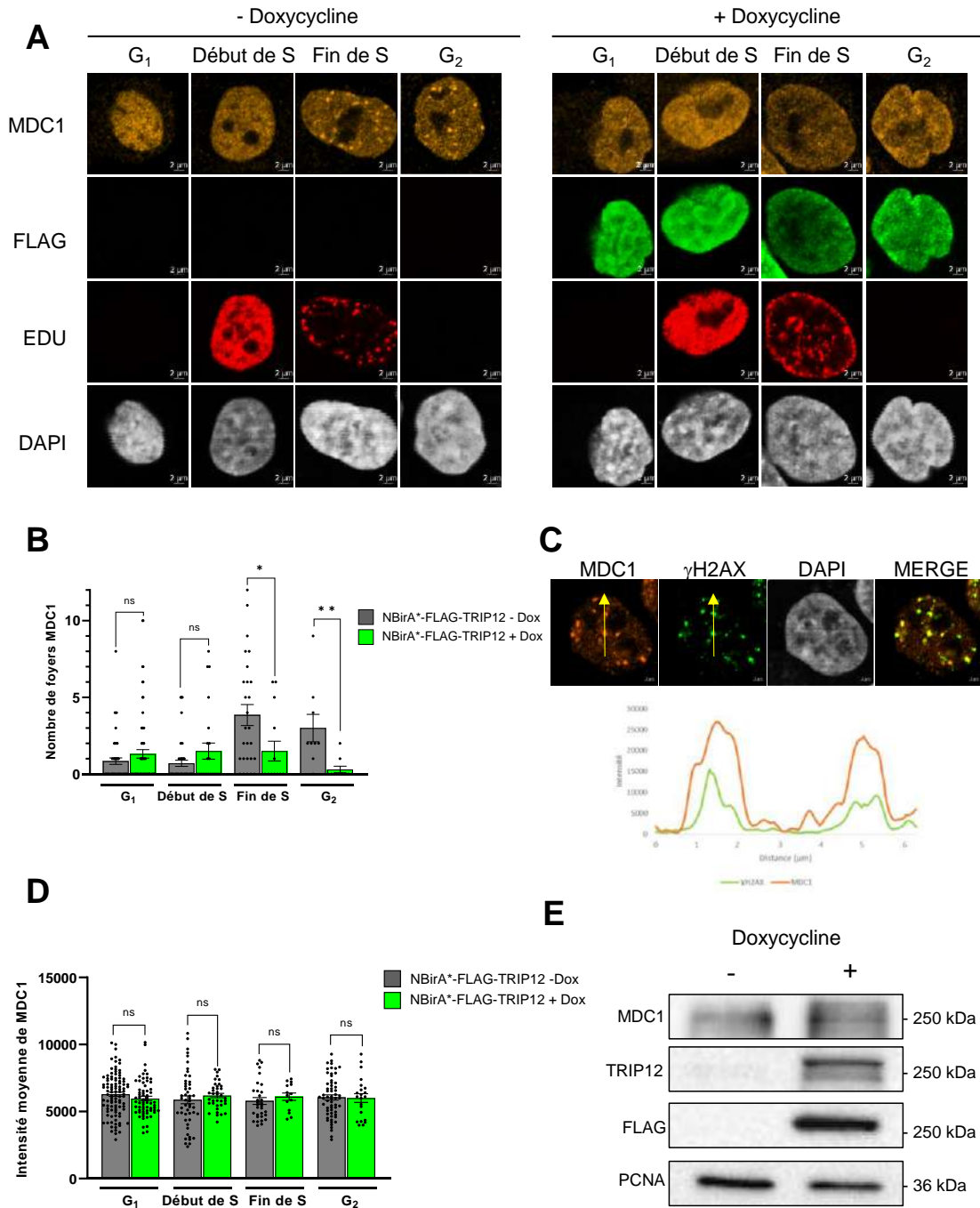
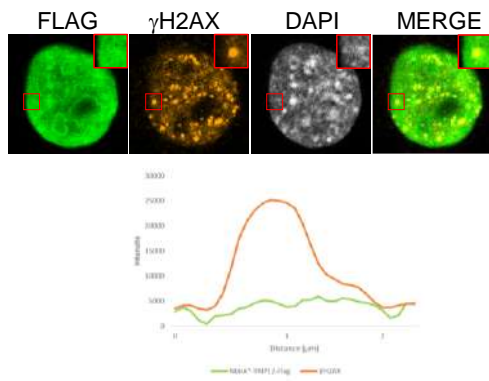


Figure 1 : L'expression de TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures de l'ADN sans modifier son expression protéique.

(A) Localisation de la protéine MDC1 dans des cellules HeLaS3 NBirA*-TRIP12, traitées ou non à la doxycycline pendant 24h déterminée par immunofluorescence. La protéine NBirA*-TRIP12 est visualisée à l'aide de l'anticorps anti-FLAG. L'étape dans le cycle cellulaire est déterminée à l'aide de l'incorporation d'EdU, la taille du noyau et l'intensité du DAPI. (B) Quantification du nombre moyen de foyers MDC1 par cellule au sein de la lignée NBirA*-TRIP12 traitées ou non à la doxycycline selon le stade dans le cycle cellulaire. Chaque point représente une cellule. (C) Localisation de la protéine MDC1 et γ H2AX au sein d'une cellule HeLaS3 NBirA*-EGFP (sans doxycycline), déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. Le graphique représente l'intensité de fluorescence des pixels au niveau de la flèche jaune. (D) Quantification de l'intensité moyenne de fluorescence par cellule au sein de la lignée NBirA*-TRIP12 traitée ou non à la doxycycline selon le stade dans le cycle cellulaire obtenue à l'aide de l'anticorps anti-MDC1. (E) Image de l'expression de MDC1 dans la lignée NBirA*-TRIP12, traitée ou non à la doxycycline déterminée par une expérience de Western Blot. L'expression de la protéine NBirA*-TRIP12 est visualisée à l'aide de l'anticorps anti-FLAG. Le niveau d'expression de la protéine PCNA est utilisé comme contrôle de charge. L'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois.

Figure 2

A



B

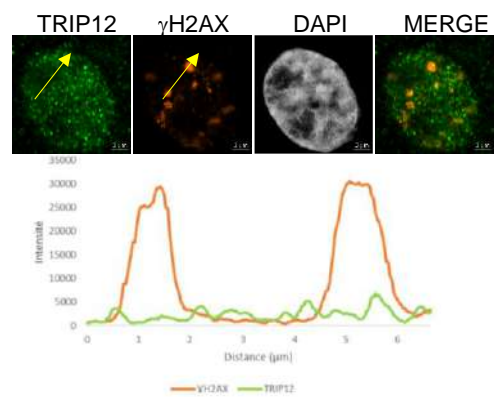


Figure 2 : TRIP12 ne s'accumule pas au niveau des cassures de l'ADN.

(A) Localisation de la protéine γ H2AX et NBirA*-FLAG-TRIP12 au sein d'une cellule HeLaS3 NBirA*-FLAG-TRIP12 (+ Doxycycline) déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. La protéine NBirA*-FLAG-TRIP12 est visualisée à l'aide de l'anticorps anti-FLAG. Le graphique représente l'intensité de fluorescence des pixels au niveau de la flèche jaune. **(B)** Localisation de la protéine TRIP12 et γ H2AX au sein d'une cellule HeLaS3 déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. Le graphique représente l'intensité de fluorescence des pixels au niveau de la flèche jaune.

Figure 3

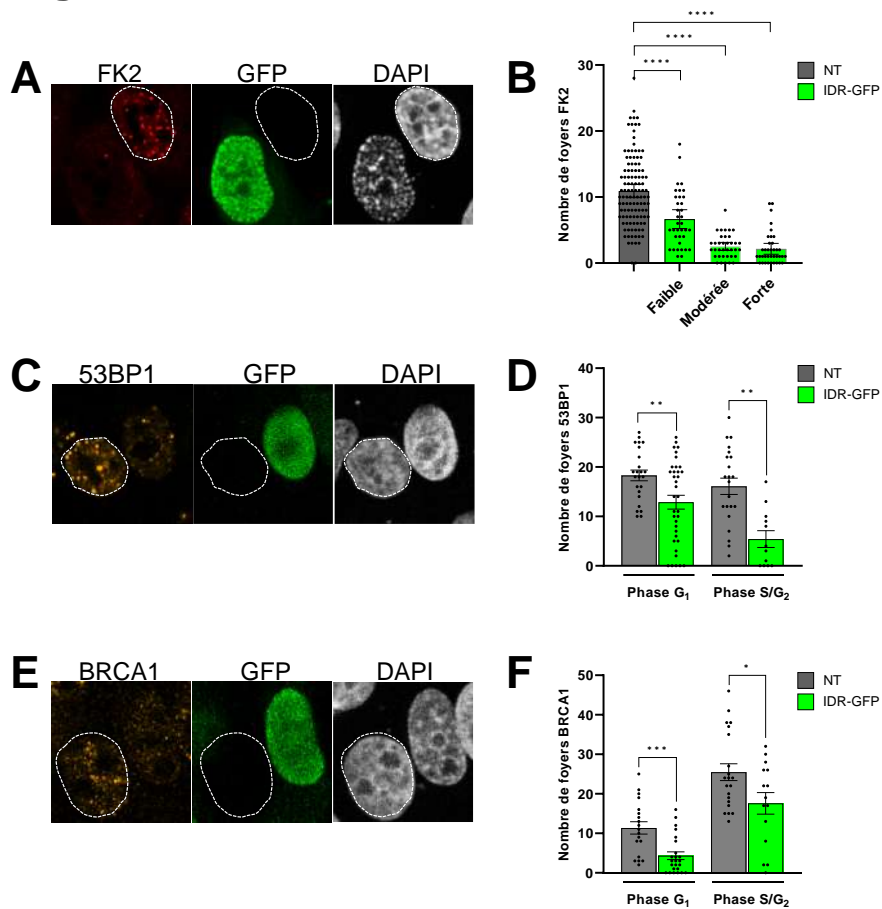


Figure 3 : La surexpression de TRIP12 modifie les signaux de transduction de la DDR en aval de MDC1.

(A) Localisation des protéines ubiquitinées et IDR-GFP après transfection transitoire de IDR-GFP dans des cellules HeLaS3, déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. Les protéines ubiquitinées sont visualisées à l'aide d'un anticorps FK2. **(B)** Quantification du nombre moyen de foyers d'histones ubiquitinées par cellule au sein des cellules HeLaS3 transfectées en **(A)**. Les cellules transfectées ont été catégorisées en « faible », « modérée » et « forte » selon leur niveau de fluorescence GFP. Chaque point représente une cellule. **(C)** Localisation des protéines 53BP1 et IDR-GFP après transfection transitoire de IDR-GFP dans des cellules HeLaS3, déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. **(D)** Quantification du nombre moyen de foyers 53BP1 par cellule au sein des cellules HeLaS3 transfectées en **(C)** en début ou en fin de cycle cellulaire. Chaque point représente une cellule. **(E)** Localisation des protéines BRCA1 et IDR-GFP après transfection transitoire de IDR-GFP dans des cellules HeLaS3, déterminée par immunofluorescence une heure après irradiation. **(F)** Quantification du nombre moyen de foyers BRCA1 par cellule au sein des cellules HeLaS3 transfectées en **(E)** en début ou en fin de cycle cellulaire. Chaque point représente une cellule.

III. Article n°2: The E3 ubiquitin ligase TRIP12 is required for pancreatic acinar cell plasticity and pancreatic carcinogenesis.

SHORT TITLE

TRIP12 is required for pancreatic plasticity and carcinogenesis.

AUTHORS

Manon Brunet¹, Claire Vargas¹, Marjorie Fanjul¹, Naïma Hanoun¹, Dorian Larrieu¹, Damien Varry¹, Guillaume Labrousse¹, Hubert Lulka¹, Florence Capilla², Janick Selves³, Anne Couvelard⁴, Julie Guillermet-Guibert¹, Pierre Cordelier¹, Marlène Dufresne^{1#} and Jérôme Torrisani^{1#}.

¹-CRCT, Université de Toulouse, Inserm, CNRS, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France

²-Service d'Histopathologie expérimentale, INSERM US006-CREFRE, Toulouse, France

³-Département de Pathologie, Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopole, CHU Toulouse, France.

⁴-Département de Pathologie Beaujon-Bichat, Hôpital Bichat, APHP and Université Paris Cité, Paris, France

corresponding authors

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

CORRESPONDANCE

Jérôme Torrisani (jerome.torrisani@inserm.fr), CRCT, 2 Avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse, Phone: +33 (0)5 82 74 16 44..

ABSTRACT

The E3 ubiquitin ligase Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 (TRIP12) has been involved in pancreatic adenocarcinoma (PDAC) by inducing the degradation of PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a), a transcription factor essential for acinar differentiation state that is lost in the early steps of pancreatic carcinogenesis. However, TRIP12 implication in pancreatic carcinogenesis has not been completely demonstrated. Herein, we demonstrate that TRIP12 protein is markedly overexpressed in human pancreatic preneoplastic lesions. We also noticed that TRIP12 overexpression is heterogeneous in PDAC samples as well as PDAC-derived cell lines that we explain, at least in part, by an altered cell cycle regulation. We further demonstrate that TRIP12 is required for PDAC-derived cell growth by controlling the expression of E2F-targeted genes. Acinar-to-ductal cell metaplasia (ADM) is a reversible process that reflects the high plasticity of acinar cells. ADM becomes irreversible in the presence of oncogenic Kras mutations and leads to the formation of preneoplastic lesions. Using two genetically murine models, we showed that a loss of TRIP12 prevents acini to develop ADM in response to pancreatic injury. With two additional murine models, we further showed that the loss of TRIP12 prevents the formation of Kras^{G12D}-induced preneoplastic lesions and impairs metastasis formation in the presence of mutated Kras^{G12D} and TP53^{R172H}.

In summary, our study identifies an overexpression of TRIP12 from the early stages of pancreatic carcinogenesis and proposes this E3 ubiquitin ligase as a novel regulator of acinar plasticity with an important dual role in initiation and metastatic steps of PDAC.

KEYWORDS

Thyroid hormone Receptor Interaction Protein 12, Pancreatic cancer, preneoplastic lesions, acinar-to-ductal metaplasia, TRIP12, E3 ubiquitin ligase

INTRODUCTION

Pancreatic cancer (PDAC) is the fourth cause of death by cancer in Western countries with 5 year-survival rate below 10%¹. This poor prognosis is explained by an absence of early diagnosis markers and efficient therapies. Treatment with gemcitabine is often used for palliative goals. Folfirinox and Nab-Paclitaxel are frequently proposed to metastatic patients². PARP (poly-ADP ribose polymerase) inhibitors-based therapies have emerged for only a subset of patients with deficiency in DNA damage repair³. Therefore, it is still important to better understand the mechanisms that control the initiation and progression of PDAC. Numerous studies revealed the surprising plasticity of acinar cells as a mechanism of defense against sustained stress⁴⁻⁸ but also the plasticity of every pancreatic cell type in the setting of neoplastic transformation⁹⁻¹⁴. They demonstrated that cancer can arise from ductal and non-ductal cells. Moreover, it is known that acinar cells lose their identity upon inflammation or in vitro culture via acinar-to-ductal metaplasia (ADM)¹⁵⁻¹⁷. They dedifferentiate to an intermediate embryonic state and subsequently transdifferentiate to an ductal phenotype^{5,18}. Changes in acinar identity increase malignant transformation¹⁹⁻²³. It is accepted that acinar cells contribute to the development of pancreatic intraepithelial neoplasms (PanIN). Preserving a stable acinar cell differentiation program acts a protective barrier against PDAC²⁴⁻²⁶.

Among the proteins involved in the ubiquitin-mediated degradation pathway, the protein TRIP12 (Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12) belongs to the HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) E3 ubiquitin ligase family. It participates in the control of major biological processes such cell proliferation, chromatin remodeling and DNA damage repair²⁷⁻³³. TRIP12 expression is positively correlated with a poor prognosis in cellular hepatocellular carcinoma³⁴ and affects the radio-sensitivity of HPV (human papilloma virus)-positive head and neck squamous carcinoma³⁵. It also constitutes a potential marker of response to PARP inhibitors in BRCAness patients³². We previously showed that TRIP12 expression is tightly regulated during the cell cycle and is required for mitosis and chromosome stability³⁶. It is reported that TRIP12 controls the stability of key-proteins involved in the determining of cellular types at the origin of PDAC. Indeed, TRIP12 targets the degradation of FBW7 (F-box and WD-40 domain), a major regulator of pancreatic ductal cell fate and a tumor suppressor gene in a subset of PDAC patients³⁷. Moreover, we demonstrated that TRIP12 ubiquitinates PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a), a main gatekeeper of acinar cell differentiation^{38,39} and induces its degradation by the proteasome⁴⁰. However, the expression level and the contribution of TRIP12 in pancreatic carcinogenesis have not been studied yet.

In this study, we investigated TRIP12 protein expression in human preneoplastic lesions and tumor samples. Using different murine transgenic models, we measured the contribution of TRIP12 in acinar cells plasticity and pancreatic carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples

Surgically resected PDAC specimens from 27 patients and a human PDAC macro-array were obtained from the department of pathology of the Cancer University Institute of Toulouse (France) following ethical procedures. Human tissue samples containing intraductal papillary mucinous neoplastic (IPMN) lesions were provided by the department of pathology of Beaujon Hospital (Clichy, France). 77 paraffin-embedded IPMN were included in tissue macro-array. Samples were processed using EnVision Flex kit (DakoCytomation) with a pre-treatment at pH 9 on a DAKO Autostainer link 48 and TRIP12 antibodies (**Suppl. Table 2**). The intensity of TRIP12 nuclear staining in PDAC samples was graded as weak, moderate and strong by four observers (M.B., J.S., M.D. and J.T.)

Cell lines and culture

BxPC-3 (CRL-1687), Capan-1 (HTB79), Capan-2 (HTB80), MiaPACA-2 (CRL-1420) and PANC-1 (CRL-1469) cell lines were obtained from the American Tissue and Cells Collection and cultured as previously described⁴¹. Gaussia Luciferase MiaPACA-2 cell line was previously described⁴¹.

Mouse models, treatments and orthotopic grafts

To generate conditional Trip12 knockout mice, embryonic stem (ES) cell clones carrying the targeted allele (Trip12^{tm1a(KOMP)Wtsi}) were obtained from the KnockOut Mouse Project repository. Targeted ES cell clones were microinjected into blastocysts of C57BL/6 to generate Tm1a line which was crossed with Flippase line to generate Trip12^{tm1c Ciph} mice carrying the floxed allele. All animal studies were approved by the French institutions (APAFIS#3600-201512160838611v3) and performed respecting institutional guidelines. The following strains were previously described: the LSL-Kras^{G12D} and LSL-Trp53^{R172H} knock-in mice were obtained from the Mouse Models of Human Cancers Consortium repository (NCI-Frederick, USA), Pdx1-Cre mice were obtained from DA Melton (Harvard University, Cambridge, MA, USA). Elastase Cre^{ERT2} mice (Elas-CreERT2) were generated by Dr DA. Stoffers (Philadelphia, PA, USA)⁴² and were provided by Pr P. Jacquemin (UCL, Belgium). ZSGreen mice (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze/J}) were obtained from the Jackson laboratory. Mice were interbred on mixed background to obtain Pdx1Cre;Trip12^{f/f} (CT mice), Elas-CreERT2;Trip12^{f/f} (ET mice), LSL-Kras^{G12D};Trip12^{f/f};Elas-CreERT2 (KET mice) and LSL-Kras^{G12D};LSL-Trp53^{R172H};Trip12^{f/f};Pdx1-Cre; (KPCT mice).

Seven week-old ET and control mice were treated with tamoxifen (20 mg/ml; Sigma-Aldrich) dissolved in corn oil with 10% ethanol. Mice received three intra-peritoneal (i.p.) injections (1 mg/15 g) on three consecutive days. Acute pancreatitis was induced at 8 weeks by

two sets of 6 hourly i.p. caerulein injections (50 µg/kg; Sigma-Aldrich) on alternating days. Mice were sacrificed after 2, 24 and 120 h. Blood and tissue samples were collected. Amylase concentration was measured in plasma using alpha-amylase assay (Phadebas). Glycemia was determined using a glucose monitor kit (Accu-Chek Performa). Glucose (2 g/kg) was injected by i.p. and glycemia was measured at the indicated times.

Gaussia Luciferase MiaPACA-2 shScr and shTRIP12#1 (2.10^6 cells/injection) were injected into the pancreas of SCID mice. Luciferase activity was determined after injection of colenterazine (Promega) every 4-5 days post-injection as previously described⁴¹.

Acinar cell isolation and ex vivo ADM formation

Pancreas were resected, 100 mg were placed in cold HBSS (Hank's balanced salt solution) containing 0.01% STI (Soybean Trypsin Inhibitor, Sigma-Aldrich) and 1000 U of collagenase II (Thermofisher). Digestion was performed at 37°C for 20 min with mechanical dissociation. Digested pancreatic tissue was pelleted centrifugation and resuspended in DMEM culture medium containing 4.5 g/l glucose, 10% fetal calf serum (FCS) (Eurobio), 10% penicillin-streptomycin mixture, 0.01% STI. EGF (20 ng/ml; Sigma-Aldrich) was added to the acinar suspension. An equal volume of rat tail collagen (RTC)-type I (Corning) was added. 500 µl were seeded on pre-coated 24 well-dishes with 100 µl of RTC and incubated at 37°C and 5% CO₂. After RTC solidification, complete DMEM culture medium was added and changed at day 1 and day 3. ADM was quantified using Z1 videomicroscope (Zeiss) and Fiji software.

Generation of murine cancer cell lines and vein tail injections

Pancreatic tumors from KPC and KPCT mice were cut in ~1 mm³-pieces and transferred into DMEM-F12 culture medium (with 10% FCS and antibiotics). The medium was renewed every three days. Primary cultures were monitored for 15-35 days for epithelial cell outgrowth. The primary outgrowing epithelial cells were sub-cultured by trypsinization using a 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution (Thermofisher). From the second passage, the cells were maintained in DMEM-F12 medium containing 4.5 g/l glucose, 10% FCS and antibiotics. Murine pancreatic cancer cells (1.10^6) were injected into the tail vein of 8-weeks-old C57/B6 mice. Four-weeks after injection, lungs were inflated then fixed and embedded in paraffin.

Histologic analysis, immunohistochemistry and immunofluorescence

Pancreas were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. For histopathological analysis, pancreas were serially sectioned (3 µm) and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histopathological analysis and scoring of tissue damage were performed using representative serial H&E-stained sections. Immunostainings followed standard protocols.

Antibodies used for immunohistochemical analyses are listed in **Suppl Table 2**. Slides were imaged using a Hamamatsu Nanozoomer 2 slide scanner (Hamamatsu Photonics) or a Panoramic 250 flash II Scanner. Images were analyzed with caseViewer or QPath software.

Synchronized (**See Supplemental Materials and Methods**) and asynchronous PDAC derived-cell populations were treated or not with EdU and were incubated with IntraStain reagent (DAKO) followed by Protein Block reagent (DAKO) and appropriate primary antibodies overnight at 4°C (**Suppl Table 2**). Cells were incubated with AlexaFluor®488 or 555 coupled secondary antibodies (ThermoFisher) (**Suppl Table 2**) for 2 h at room temperature. EdU incorporation was visualized using the Click-it® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging kit (Life technologies). Staining were visualized using a LSM 780 confocal microscope (Zeiss) and analyzed using ZEN 2.3 software. Nuclear TRIP12 fluorescence intensity was determined using a FIJI macro-command. The classification of cells in the different phases of the cell cycle was previously described³⁶.

Agilent microarray gene expression and gene sets enrichment analysis (GSEA)

Four MiaPACA-2 and PANC-1 ShScr and ShTRIP12#1 clones were isolated (See Supplemental Materials and Methods). *Trip12* mRNA depletion in each ShTRIP12 clones was verified by qRT-PCR as described above. Total RNA was hybridized on Agilent SurePrint G3 Human GE V2 8x60K microarrays. Adjustment of the estimated significance level to account for multiple hypothesis testing (BH adjusted value). Data were deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) repository (GSE147717 and GSE147549). Gene set enrichment analysis (GSEA) was performed using the Broad Institute platform (version 4.0.1) P value and a false discovery rate (FDR) were set at 0.001. Fifty gene sets relative to the Hallmarks repertory from Molecular Signature DataBase (MsigDB) were analyzed using the GSEA pre-ranked method.

Protein-protein interaction network analysis

The STRING database v11 (<https://string-db.org>) was used to map the physical interaction networks of proteins encoded by the MsigDB Hallmark E2F-target gene set (n=195), TRIP12 depleted-PANC-1 (n=138) and TRIP12-depleted MiaPACA-2 (n=113) leading edge E2F-target genes obtained from GSEA. Networks were obtained with the following active interaction sources: text mining, experiments, databases with a minimum required interaction score of 0.700 (high confidence).

Statistical analysis

Data were analyzed by 2-tailed, unpaired Student's t-test or Kruskal-Wallis test using a multiple statistics Graph Pad Prism 9 software package. A difference was considered significant when p value was lower than 0.05. Gepia data were analyzed by Mantel-Cox test. Number of independent experiments is indicated in the figure legends. *, **, *** and **** indicate a p value <0.05, 0.01, 0.001 and 0.0001, respectively.

RESULTS

TRIP12 is overexpressed in human preneoplastic lesions and pancreatic tumors.

TRIP12 was detected in the nucleus of exocrine acinar, ductal cells as well as endocrine islets of healthy pancreas although the staining intensity remained weak and heterogeneous (**Fig. 1A**). Interestingly, an overexpression of TRIP12 was measured in pancreatic intraepithelial neoplastic (PanIN) lesions (**Fig. 1B and 1C**) as well as in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) (**Fig. 1D and E**). We also found that TRIP12 is markedly overexpressed in PDAC (**Fig. 1C-F**) which was supported by mRNA expression data from the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) (**Fig. 1G**). Interestingly, tissue macro-arrays revealed a great heterogeneity of TRIP12 expression that was not correlated with gender, age, grade or differentiation state (**Fig. 1H and Suppl. Table 3**). Clinically, high Trip12 mRNA expression in primary tumors was associated with a poorer patient survival rate (**Fig. 1I**).

Altogether, our results were in favor of a role for TRIP12 in the initiation and/or the progression of PDAC.

TRIP12 is required for ADM formation ex vivo and in vivo.

ADM precedes the formation of PanIN in response to inflammation. Given the elevated level of TRIP12 in early stage-preneoplastic lesions (**Fig. 1B-E**), we investigated its implication in the regulation of acinar cells. We used an established ex vivo 3D-acinar cell culture that model the conversion of acinar cells to ductal cells. We engineered two genetic murine models. A Pdx1-Cre model in which *Trip12* gene is deleted in all pancreatic lineage and adult pancreatic cell types from embryonic stages. We verified Cre-mediated recombination by crossing CT (Pdx1-Cre; *Trip12*^{fl/fl}) mice with ZsGreen Cre reporter mice to generate ZsG-CT mice⁴³ (**Fig. 2A**). ZsG-CT mice pancreas exhibit macroscopically normal morphology and ZsGreen is expressed in acinar cells, in ductal and in islet cells as expected (**Fig. 2B**). We generated a second murine model consisting in an Eras-CreER acinar cell-specific conditional disruption of *Trip12* gene by an administration of tamoxifen. We combined the inducible deletion of *Trip12* gene to a ZsGreen reporter lineage tracing (**Fig. 2C**). As expected, the ZsGreen expression was present in acinar cells but absent in ductal cells and islet cells (**Fig. 2D**). TRIP12 depleted-acinar cells (ZsG-ET and ZsG-CT) or controls (ZsG-E and ZsG-C) were isolated from these two models (**Fig. 2E and 2F**). ADM was initiated by addition of epidermal growth factor (EGF). As expected, control acini converted to ductal cyst structures after four days (**Fig. 2E and 2F**). In contrast, TRIP12-depleted acinar cells did not transdifferentiate into ductal cells. Of note, the ductal structures in TRIP12-deficient acinar preparation corresponded to ZsGreen-expressing cells that failed Cre-mediated recombination. The absence of TRIP12 was linked to the presence of fluorescent abnormal cell clusters with a tiny lumen or vacuole

demonstrating that TRIP12 is required for ADM and contributes to acinar cell plasticity (**Fig. 2G and 2H**).

We further investigated the role of TRIP12 in acinar cell dedifferentiation in vivo after caerulein-induced acute pancreatitis (**Fig. 2I**). Induction of pancreatitis was confirmed by an increase of plasma amylase level in both groups (**Suppl Fig. 1A**). Two hours after the last injection, pancreas of both genotypes was edematous and infiltrated by immune cells (**Fig. 2J and Suppl Fig. 1B**). Vacuolization of acinar cells indicative of autophagy, stressed acini or necrosis was noticed in both groups. Distension of acinar lumens related to ADM initiation was observed in control mice whereas acinar hypertrophy, eosinophilic zymogen granular zones more evenly distributed throughout cells and decreased basophilic acinar basal regions were observed in TRIP12-depleted mice (**Fig. 2J**). After one day, entire lobules of control mice displayed extensive ADM. In contrast, TRIP12-depleted acini retained a hypertrophied acinar phenotype with numerous vacuoles. While interstitial edema area was similar in both groups, inflammatory cells were more numerous in control pancreas (**Suppl Fig. 1B**). After five days, most of control acinar tissue reverted back to its original morphology whereas TRIP12 deleted-acinar tissue retained several defects (**Fig. 2J**). As expected during ADM, caerulein treated-control mice displayed an increased CK19 staining in acinar cells (**Fig. 2K**). CK19 expression was observed after two hours, peaks after one day and returned to basal levels after five days in control acini. CK19 expression was also detected in TRIP12-depleted acini but at a lower level and slightly increased after one day confirming the altered differentiation. Unlike in control pancreas, CK19 staining was restricted to centro-acinar lumens and did not extend in basolateral location as observed in ADM (**Fig. 2K**).

Altogether, our experiments demonstrated that TRIP12 is necessary for ADM formation not only ex vivo but also in vivo. Moreover, its depletion alters differentiation response to caerulein in mice pancreas.

The heterogeneous overexpression of TRIP12 is explained by an altered cell cycle regulation.

We described above that TRIP12 is heterogeneously overexpressed in pancreatic cancer samples (**Fig. 1C-H and Suppl. Table 3**). A similar heterogeneity of expression was also measured in a panel of PDAC-derived cell lines (**Fig. 3A, Suppl Fig. 2A and 2B**) that we explained by a different cell cycle regulation (**Fig. 3B and 3C**). Indeed, TRIP12 low expressing-cell lines (i.e.: BxPC-3) express TRIP12 from late S to early G₁ phase while TRIP12 high expressing-cell lines (i.e.: MiaPACA-2) display a sustained TRIP12 level until the end of G₁ phase. This differential regulation of TRIP12 in the cell cycle was confirmed in synchronized cell populations (**Fig. 3D**). Although the molecular mechanisms remain to be discovered, these results demonstrated that TRIP12

heterogeneity among PDAC cell lines is mainly due to a differential regulation during the cell cycle which could explain TRIP12 heterogeneity observed in human PDAC samples.

TRIP12 participates in PDAC-derived cell growth by regulating E2F-targeted genes.

We noticed that TRIP12 low expressing-cells display a lower growth rate suggesting that TRIP12 is an important factor for cellular growth rate (**Fig. 4A**). Therefore, we generated TRIP12 depleted-PANC-1 and MiaPACA-2 cell lines by shRNA lentiviral transduction (**Fig. 4B, Suppl Fig. 3A and 3B**). The main consequence of TRIP12 depletion was a significant inhibition of cellular growth in vitro (**Fig. 4C and Suppl Fig. 3C**) but also *in vivo* (**Fig. 4D and Suppl. Fig. 3D**).

To decipher the mechanisms by which TRIP12 affects PDAC-derived cell growth, transcriptomic and gene set enrichment analyses were performed. Among the MSigDB (Molecular Signatures DataBase) hallmarks gene sets, the most negatively enriched pathways in both TRIP12-depleted cell lines was the E2F-targeted genes (**Fig. 4E, Suppl. Table 4 and Suppl. Fig. 3D**). Among the 195 genes of the E2F target gene set, 90 genes were commonly repressed in both TRIP12 depleted-cell lines (**Fig. 4E**). E2F transcription factor family controls the transcription of genes involved in G₁-to-S, G₂-to-M transition and DNA damage repair that are temporally transcribed during the cell cycle⁴⁴. A physical protein interaction network of the 195 E2F target gene-products clearly depicts the two functional networks implicated in G₁-to-S (DNA replication and DNA repair) and G₂-to-M (G₂/M transition of mitotic cycle and chromosome segregation) transitions (**Fig. 4F, left panel**). The same analysis with the 113 leading edge-repressed genes in TRIP12 depleted-MiaPACA-2 cells revealed that these genes are preferentially involved in G₂-to-M transition (**Fig. 4F, right panel**). Moreover, the consequences of a TRIP12 depletion in MiaPACA-2 cells led to an accumulation of cells in S and G₂ phases associated to a decrease in the proportion of cells in G₁ phase (**Fig. 4G**). Altogether, our results demonstrated that TRIP12 participates in cell growth of pancreatic cancer cells, at in least in part, by regulating the expression of E2F target-genes preferentially involved in G₂-to-M transition.

TRIP12 participates in pancreatic cancer initiation, development and metastatic capacity.

Several studies showed that Kras^{G12D} oncogene expression in adult acinar cells initiates PDAC⁴⁵. We hypothesized that altered ADM observed in absence of TRIP12 affects PDAC initiation. Therefore, we generated TRIP12-deficient KET and TRIP12-expressing KE mice (**Fig. 5A**). The activation of Kras^{G12D} concomitantly with the loss of TRIP12 was obtained by an administration of tamoxifen. After three months, no macroscopic changes between KE and KET mice and their pancreas were observed (**Suppl. Fig. 4A**). However, histological analyses revealed the presence of low grade PanINs in KE control mice but no evidence of PanINs in any of the TRIP12 KO (KET) mice (**Fig. 5B and 5C**) indicating that TRIP12 is necessary for the initiation steps of pancreatic

carcinogenesis. To confirm this claim, we generated mice cohorts of the consensus KPC mouse PDAC model⁴⁶ (simultaneously expressing *Kras*^{G12D} and *Trp53*^{R172H}) with (KPCT) or without (KPC) TRIP12 ablation (**Fig. 5D**). Autopsy and histological analyses revealed that both KPC and KPCT mice develop PDAC (**Fig. 5E**). Clinical analyses showed similar body and tumor weights of KPC and KPCT (**Suppl. Fig. 4B**). Interestingly, KPCT mice display a lower tumor incidence and less frequent metastasis than in KPC control mice (**Fig. 5F**). Median survival of KPCT mice was not statistically different but a death delay of mice with the less aggressive KPCT tumors was observed (**Fig. 5G**). We subsequently generated cell lines from KPC (#99 and #166) and KPCT (#1762 and #1763) tumors (**Fig. 5H**). Using Boyden chambers, we noted that the loss of TRIP12 affects their invasion capacity (**Fig. 5I**). Moreover, to model metastasis formation, vein injections of these cell lines in mice tail revealed that the depletion of TRIP12 inhibits *in vivo* metastatic dissemination (**Fig. 5J**).

Altogether, these findings indicated that TRIP12 is required for pancreatic tumor initiation and participates in tumor progression as well as metastatic capacity.

DISCUSSION

We herein demonstrated that TRIP12 is expressed at a low level in healthy pancreas but markedly overexpressed in pancreatic preneoplastic lesions and PDAC. Using two conditional *Trip12* knockout murine models, we revealed that TRIP12 expression is required for ADM formation. With two additional murine models, we also showed that TRIP12 deficiency impedes PanIN formation in the presence of *Kras*^{G12D} and reduces the metastatic capacity of tumors cells when *Trp53*^{R172H} is concomitantly expressed.

As mentioned earlier, overexpression in PDAC samples is also observed in other studies²⁷. We unveiled a high heterogeneity of TRIP12 expression within PDAC samples that is supported by the human Protein Atlas data. Similarly, TRIP12 heterogeneity was observed in PDAC-derived cell lines which could not be explained by large genomic alterations, DNA hypermethylation or mRNA expression level (Personal unpublished results). Nevertheless, the existence of *Trip12* mRNA variants with a short or a long 3'-UTR (3'-Untranslated Region) that display different translation efficiencies was previously reported; a short form being more efficiently translated than a longer form⁴⁷. A quantification of these mRNA isoforms would permit to determine whether this regulatory process is involved in the heterogeneity of TRIP12 protein expression.

We previously showed that TRIP12 protein expression is tightly regulated during the cell cycle³⁶. Present in the nucleus of HeLaS3 cells in late S and G₂ phases, TRIP12 rapidly disappears from the nucleus in early G₁ to become absent in late G₁ and early S phases. We observed that in low TRIP12-expressing PDAC derived-cell lines, TRIP12 follows a similar cell cycle regulation. The molecular mechanisms that govern this regulation are not elucidated yet. Nevertheless, we noticed that, during mitotic exit, TRIP12 is exported from the nucleus to the cytoplasm (Personal unpublished results). The localization of TRIP12 in the cytoplasm in a subset of early G₁ cells suggest a rapid degradation of TRIP12 in the cytoplasm. In high TRIP12 expressing cells, we did not observe a cytoplasmic localization of TRIP12 but rather the presence in the nucleus of late G₁ cells suggesting a nuclear export default. Post-translational modifications are likely implicated in this mechanism although we cannot exclude that a protein-protein interaction with a nuclear partner retains TRIP12 in the nucleus. Moreover, the deubiquitinase USP7 may participate in the TRIP12 cell cycle regulation³⁴. Indeed, we can speculate that the presence of USP7 in the nucleus of early G₁-phase PDAC cells stabilizes TRIP12 and retains it in the nuclear compartment.

Next, we demonstrated that TRIP12 is necessary for PDAC-derived cell growth. Transcriptomic approaches demonstrated that TRIP12 depletion dramatically repressed the expression genes targeted by E2F. It is known that E2F transcription family controls the expression of genes implicated in G₁-S and G₂/M transition⁴⁸. More interestingly, our analysis revealed that a TRIP12 depletion impacts more specifically the expression of E2F-target genes involved in the G₂-M transition suggesting that TRIP12 participates in the proper expression of

genes necessary for this transition. This observation parallels with the fact that TRIP12 expression is tightly regulated during the cell cycle⁴⁹. Indeed, TRIP12 is absent in the nucleus of cells in late G₁ and early S phases. Its nuclear presence is dramatically increased in late S late to reach a maximum in G₂ phase. Therefore, it is likely that TRIP12 participates specifically to the expression of genes necessary for the transition G₂-M.

Our findings highlighted the key role of TRIP12 in acinar cell identity and plasticity by showing that a loss of TRIP12 prevents the reprogramming process in response to pancreatic inflammation. Of importance, TRIP12 deficiency also impedes the formation of ADM in presence of Kras^{G12D} which is favor of a TRIP12 role in oncogenic transformation by the Kras^{G12D}. During ADM, an epigenetic repression of acinar enzymes and transcription factors is initiated and maintained by repressive histone marks H2AK119Ub and H3K27me3 added by histone modifying enzymes of the Polycomb repressive complexes (PRC) 1 and 2, respectively^{50,51}. TRIP12 is reported to interact with several components of PRC (ex: EED, SUZ12 and ASXL1)⁵²⁻⁵⁴ or to control the stability of chromatin remodeling complexes such as SWI/SNF (Switch/Sucrose Non-Fermentable)^{30,33}. Our recent unpublished study confirmed this pleiotropic role of TRIP12 on chromatin homeostasis. Given these multiple roles on chromatin, it is likely that a TRIP12 depletion in acinar cells perturbs the regulation of transcription that would lead to an inhibition of reprogramming processes required for ADM. Moreover, we demonstrated that TRIP12 induces a poly-ubiquitination-dependent degradation of the transcription factor PTF1a, a maintenance keeper of acinar phenotype⁴⁰. Therefore, it is possible that the ablation of TRIP12 in acinar cells provokes an increase of PTF1a expression that would maintain a acinar phenotype even in the presence of inflammation or Kras^{G12D} expression.

Finally, our work revealed that whereas it is required for cancer initiation, TRIP12 is dispensable for PDAC when the oncogenic Kras^{G12D} is associated with the loss of a TP53 gene. Interestingly, mice survival curves have a pattern similar to that of human patients. Although the median survival is not affected by TRIP12 expression, patients with low TRIP12 expressing-tumors and TRIP12-knockout KPC mice live longer. We also noticed that whereas the absence of TRIP12 does not suppress tumorigenic potential in the presence of Kras^{G12D} and Trp53^{R172H}, TRIP12 is necessary for tumor cells invasive capacity. Previous data from the literature revealed an EMT inhibitory role for TRIP12⁵⁵. We found no impact of TRIP12 on the epithelial features of KPC tumor cell lines (Personal unpublished results).

To summarize, the role of HECT E3 ubiquitin ligases has been poorly investigated in PDAC initiation and progression so far. Our findings identified TRIP12 as an important player in acinar-to-ductal reprogramming, in Kras^{G12D}-driven PanIN formation and in tumoral invasion. Our data may support strategies that aim at preserving the acinar differentiation. Therefore, the targeting of overexpressed TRIP12 would contribute to inhibit Kras^{G12D}-driven tumorigenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Fiore for CIPHE (Centre d'Immunophénomique, Marseille, France) service monitoring, all members of animal facility of CREFRE (UMS 006), Imag'IN platform and pathology department of Institut Universitaire du Cancer de Toulouse, C. Segura from the histology platform of Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires de Toulouse. We thank F. Larminat (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale of Toulouse) and L. Bartholin (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon) for helpful discussions. We also thank the technological platforms of the Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) and the GET-TRI platform (INRAE-Saint Martin du Touch).

FUNDING SOURCES

This project was funded by the « Ligue contre le cancer », the « Fondation Toulouse Cancer-Santé » (TCS2018CS079), the « Association Française pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas » and the « Cancéropôle Grand Sud-Ouest » (2021-EM22). Dr M. Brunet was funded by the University Paul Sabatier (Toulouse) and the « Ligue contre le cancer ». C. Vargas was funded by the University Paul Sabatier (Toulouse) and the « Ligue contre le cancer ». D. Varry was funded by the « Ecole Normale Supérieure (Paris) ». Dr D. Larrieu was funded by the « Ligue contre le cancer ».

STATEMENTS OF AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.B.: Investigation, Conceptualization, Supervision, Writing – original draft; C.V.: Investigation, Conceptualization, Writing – original draft; M.F.: Investigation; N.H.: Investigation; D.L.: Investigation; D.V.: Investigation, Software; G.L.: Investigation; H.L.: Investigation; F.C.: Investigation; J.S.: Investigation, Resources; A.C.: Investigation, Resources; J.G-G.: Conceptualization, Writing-review and editing; P.C.: Funding acquisition, Writing-review and editing; M.D.: Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing – original draft; J.T.: Conceptualization, Investigation, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft.

REFERENCE LIST

1. Siegel DA, King JB, Lupo PJ, Durbin EB, Tai E, Mills K, Van Dyne E, Buchanan Lunsford N, Henley SJ, Wilson RJ. Counts, incidence rates, and trends of pediatric cancer in the United States, 2003-2019. *J Natl Cancer Inst* 2023;djad115.
2. Neuzillet C, Gaujoux S, Williet N, Bachet J-B, Baugeion L, Colson Durand L, Conroy T, Dahan L, Gilibert M, Huguet F, Marthey L, Meilleroux J, De Mestier L, Napoléon B, Portales F, Sa Cunha A, Schwarz L, Taieb J, Chibaudel B, Bouché O, Hammel P. Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCO, GERCOR, UNICANCER, SFCO, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Dig Liver Dis* 2018;50:1257-1271.
3. Sahin IH, Lowery MA, Stadler ZK, Salo-Mullen E, Iacobuzio-Donahue CA, Kelsen DP, O'Reilly EM. Genomic instability in pancreatic adenocarcinoma: a new step towards precision medicine and novel therapeutic approaches. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;10:893-905.
4. Bockman DE, Guo J, Büchler P, Müller MW, Bergmann F, Friess H. Origin and development of the precursor lesions in experimental pancreatic cancer in rats. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2003;83:853-859.
5. Pinho AV, Rooman I, Reichert M, De Medts N, Bouwens L, Rustgi AK, Real FX. Adult pancreatic acinar cells dedifferentiate to an embryonic progenitor phenotype with concomitant activation of a senescence programme that is present in chronic pancreatitis. *Gut* 2011;60:958-966.
6. Strobel O, Dor Y, Alsina J, Stirman A, Lauwers G, Trainor A, Castillo CF-D, Warshaw AL, Thayer SP. In vivo lineage tracing defines the role of acinar-to-ductal transdifferentiation in inflammatory ductal metaplasia. *Gastroenterology* 2007;133:1999-2009.
7. Kong B, Bruns P, Behler NA, Chang L, Schlitter AM, Cao J, Gewies A, Ruland J, Fritzsche S, Valkovskaya N, Jian Z, Regel I, Raulefs S, Irmeler M, Beckers J, Friess H, Erkan M, Mueller NS, Roth S, Hackert T, Esposito I, Theis FJ, Kleeff J, Michalski CW. Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut* 2018;67:146-156.
8. Clerc P, Leung-Theung-Long S, Wang TC, Dockray GJ, Bouisson M, Delisle M-B, Vaysse N, Pradayrol L, Fourmy D, Dufresne M. Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia. *Gastroenterology* 2002;122:428-437.
9. Gidekel Friedlander SY, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, Vasile E, DePinho RA, Jacks T. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 2009;16:379-389.
10. Habbe N, Shi G, Meguid RA, Fendrich V, Esni F, Chen H, Feldmann G, Stoffers DA, Konieczny SF, Leach SD, Maitra A. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18913-18918.
11. Prévot P-P, Simion A, Grimont A, Colletti M, Khalaileh A, Van den Steen G, Sempoux C, Xu X, Roelants V, Hald J, Bertrand L, Heimberg H, Konieczny SF, Dor Y, Lemaigre FP, Jacquemin P. Role of the ductal transcription factors HNF6 and Sox9 in pancreatic acinar-to-ductal metaplasia. *Gut* 2012;61:1723-1732.
12. Ferreira RMM, Sancho R, Messal HA, Nye E, Spencer-Dene B, Stone RK, Stamp G, Rosewell I, Quaglia A, Behrens A. Duct- and Acinar-Derived Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Show Distinct Tumor Progression and Marker Expression. *Cell Rep* 2017;21:966-978.
13. Quilichini E, Fabre M, Dirami T, Stedman A, De Vas M, Ozguc O, Pasek RC, Cereghini S, Morillon L, Guerra C, Couvelard A, Gannon M, Haumaitre C. Pancreatic Ductal Deletion of Hnf1b Disrupts Exocrine Homeostasis, Leads to Pancreatitis, and Facilitates Tumorigenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2019;8:487-511.
14. Lee AYL, Dubois CL, Sarai K, Zarei S, Schaeffer DF, Sander M, Kopp JL. Cell of origin affects tumour development and phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gut* 2019;68:487-498.
15. Arias AE, Bendayan M. Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1993;69:518-530.

16. Rooman I, Real FX. Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* 2012;61:449–458.
17. Vila MR, Lloreta J, Real FX. Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 1994;71:423–431.
18. Fanjul M, Gmyr V, Sengenès C, Ratovo G, Dufresne M, Lefebvre B, Kerr-Conte J, Hollande E. Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2010;58:807–823.
19. Shibata H, Komura S, Yamada Y, Sankoda N, Tanaka A, Ukai T, Kabata M, Sakurai S, Kuze B, Woltjen K, Haga H, Ito Y, Kawaguchi Y, Yamamoto T, Yamada Y. In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nat Commun* 2018;9:2081.
20. Assi M, Achouri Y, Lorient A, Dauguet N, Dahou H, Baldan J, Libert M, Fain JS, Guerra C, Bouwens L, Barbacid M, Lemaigre FP, Jacquemin P. Dynamic Regulation of Expression of KRAS and Its Effectors Determines the Ability to Initiate Tumorigenesis in Pancreatic Acinar Cells. *Cancer Res* 2021;81:2679–2689.
21. Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, Rodríguez-Justo M, Serrano M, Barbacid M. Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 2011;19:728–739.
22. Guerra C, Schuhmacher AJ, Cañamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Pérez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
23. Del Poggetto E, Ho I-L, Balestrieri C, Yen E-Y, Zhang S, Citron F, Shah R, Corti D, Diaferia GR, Li C-Y, Loponte S, Carbone F, Hayakawa Y, Valenti G, Jiang S, Sapio L, Jiang H, Dey P, Gao S, Deem AK, Rose-John S, Yao W, Ying H, Rhim AD, Genovese G, Heffernan TP, Maitra A, Wang TC, Wang L, Draetta GF, Carugo A, Natoli G, Viale A. Epithelial memory of inflammation limits tissue damage while promoting pancreatic tumorigenesis. *Science* 2021;373:eabj0486.
24. Kopp JL, von Figura G, Mayes E, Liu F-F, Dubois CL, Morris JP, Pan FC, Akiyama H, Wright CVE, Jensen K, Hebrok M, Sander M. Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012;22:737–750.
25. Morris JP, Cano DA, Sekine S, Wang SC, Hebrok M. Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice. *J Clin Invest* 2010;120:508–520.
26. Shi G, DiRenzo D, Qu C, Barney D, Miley D, Konieczny SF. Maintenance of acinar cell organization is critical to preventing Kras-induced acinar-ductal metaplasia. *Oncogene* 2013;32:1950–1958.
27. Chen D, Shan J, Zhu W-G, Qin J, Gu W. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* 2010;464:624–627.
28. Chen D, Kon N, Zhong J, Zhang P, Yu L, Gu W. Differential effects on ARF stability by normal versus oncogenic levels of c-Myc expression. *Mol Cell* 2013;51:46–56.
29. An C-I, Ganio E, Hagiwara N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet Muscle* 2013;3:11.
30. Keppler BR, Archer TK. Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J Biol Chem* 2010;285:35665–35674.
31. Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, Toledo L, Dinant C, Grøfte M, Bartkova J, Poulsen M, Oka Y, Bekker-Jensen S, Mailand N, Neumann B, Heriche J-K, Shearer R, Saunders D, Bartek J, Lukas J, Lukas C. TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* 2012;150:697–709.
32. Gatti M, Imhof R, Huang Q, Baudis M, Altmeyer M. The Ubiquitin Ligase TRIP12 Limits PARP1 Trapping and Constrains PARP Inhibitor Efficiency. *Cell Rep* 2020;32:107985.
33. Brunet M, Vargas C, Larrieu D, Torrisani J, Dufresne M. E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions. *Int J Mol Sci* 2020;21:E8515.

34. Cai J-B, Shi G-M, Dong Z-R, Ke A-W, Ma H-H, Gao Q, Shen Z-Z, Huang X-Y, Chen H, Yu D-D, Liu L-X, Zhang P-F, Zhang C, Hu M-Y, Yang L-X, Shi Y-H, Wang X-Y, Ding Z-B, Qiu S-J, Sun H-C, Zhou J, Shi YG, Fan J. Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* 2015;61:1603–1614.
35. Louie RJ, Friez MJ, Skinner C, Baraitser M, Clark RD, Schwartz CE, Stevenson RE. Clark-Baraitser syndrome is associated with a nonsense alteration in the autosomal gene TRIP12. *Am J Med Genet A* 2020;182:595–596.
36. Larrieu D, Brunet M, Vargas C, Hanoun N, Ligat L, Dagnon L, Lulka H, Pommier RM, Selves J, Jády BE, Bartholin L, Cordelier P, Dufresne M, Torrisani J. The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability. *Sci Rep* 2020;10:789.
37. Khan OM, Almagro J, Nelson JK, Horswell S, Encheva V, Keyan KS, Clurman BE, Snijders AP, Behrens A. Proteasomal degradation of the tumour suppressor FBW7 requires branched ubiquitylation by TRIP12. *Nat Commun* 2021;12:2043.
38. Hoang CQ, Hale MA, Azevedo-Pouly AC, Elsässer HP, Deering TG, Willet SG, Pan FC, Magnuson MA, Wright CVE, Swift GH, MacDonald RJ. Transcriptional Maintenance of Pancreatic Acinar Identity, Differentiation, and Homeostasis by PTF1A. *Mol Cell Biol* 2016;36:3033–3047.
39. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CVE. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002;32:128–134.
40. Hanoun N, Fritsch S, Gayet O, Gigoux V, Cordelier P, Dusetti N, Torrisani J, Dufresne M. The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 2014;289:35593–35604.
41. Delpu Y, Lulka H, Sicard F, Saint-Laurent N, Lopez F, Hanoun N, Buscail L, Cordelier P, Torrisani J. The rescue of miR-148a expression in pancreatic cancer: an inappropriate therapeutic tool. *PLoS One* 2013;8:e55513.
42. Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, Farzad C, Hong N, Leach SD, Stoffers DA. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet β cell, regeneration. *J Clin Invest* 2007;117:971–977.
43. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 2010;13:133–140.
44. Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019;19:326–338.
45. Grimont A, Leach SD, Chandwani R. Uncertain Beginnings: Acinar and Ductal Cell Plasticity in the Development of Pancreatic Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2022;13:369–382.
46. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005;7:469–483.
47. Chang J-W, Zhang W, Yeh H-S, de Jong EP, Jun S, Kim K-H, Bae SS, Beckman K, Hwang TH, Kim K-S, Kim D-H, Griffin TJ, Kuang R, Yong J. mRNA 3'-UTR shortening is a molecular signature of mTORC1 activation. *Nat Commun* 2015;6:7218.
48. Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci* 2004;29:409–417.
49. Larrieu D, Brunet M, Vargas C, Hanoun N, Ligat L, Dagnon L, Lulka H, Pommier RM, Selves J, Jády BE, Bartholin L, Cordelier P, Dufresne M, Torrisani J. The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability. *Sci Rep* 2020;10:789.

50. Benitz S, Regel I, Reinhard T, Popp A, Schäffer I, Raulefs S, Kong B, Esposito I, Michalski CW, Kleeff J. Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 2016;7:11424–11433.
51. Benitz S, Straub T, Mahajan UM, Mutter J, Czemmel S, Unruh T, Wingerath B, Deubler S, Fahr L, Cheng T, Nahnsen S, Bruns P, Kong B, Raulefs S, Ceyhan GO, Mayerle J, Steiger K, Esposito I, Kleeff J, Michalski CW, Regel I. Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut* 2019;68:2007–2018.
52. Kweon S-M, Chen Y, Moon E, Kvederaviciutė K, Klimasauskas S, Feldman DE. An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol Cell* 2019;74:1138-1147.e6.
53. Cao Q, Wang X, Zhao M, Yang R, Malik R, Qiao Y, Poliakov A, Yocum AK, Li Y, Chen W, Cao X, Jiang X, Dahiya A, Harris C, Feng FY, Kalantry S, Qin ZS, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM. The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat Commun* 2014;5:3127.
54. Oliviero G, Brien GL, Waston A, Streubel G, Jerman E, Andrews D, Doyle B, Munawar N, Wynne K, Crean J, Bracken AP, Cagney G. Dynamic Protein Interactions of the Polycomb Repressive Complex 2 during Differentiation of Pluripotent Cells. *Mol Cell Proteomics MCP* 2016;15:3450–3460.
55. Lee KK, Rajagopalan D, Bhatia SS, Tirado-Magallanes R, Chng WJ, Jha S. The oncogenic E3 ligase TRIP12 suppresses epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal traits through ZEB1/2. *Cell Death Discov* 2021;7:95.
56. Seo BA, Kim D, Hwang H, Kim MS, Ma S-X, Kwon S-H, Kweon SH, Wang H, Yoo JM, Choi S, Kwon SH, Kang S-U, Kam T-I, Kim K, Karuppagounder SS, Kang BG, Lee S, Park H, Kim S, Yan W, Li Y-S, Kuo S-H, Redding-Ochoa J, Pletnikova O, Troncoso JC, Lee G, Mao X, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS. TRIP12 ubiquitination of glucocerebrosidase contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Neuron* 2021;109:3758-3774.e11.

Figure 1 : TRIP12 is overexpressed in preneoplastic PanIN and IPMN lesions and human pancreatic cancers.

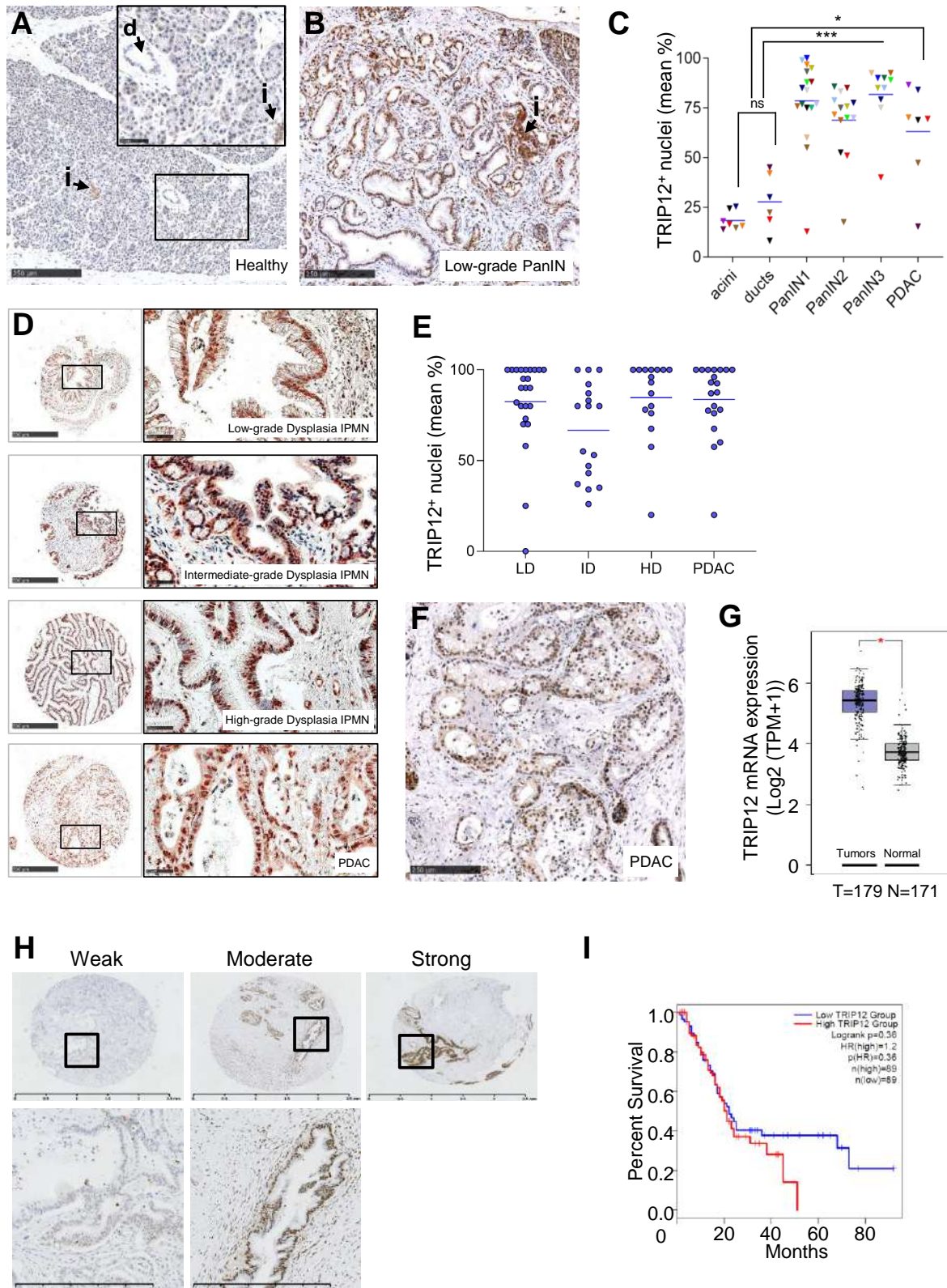
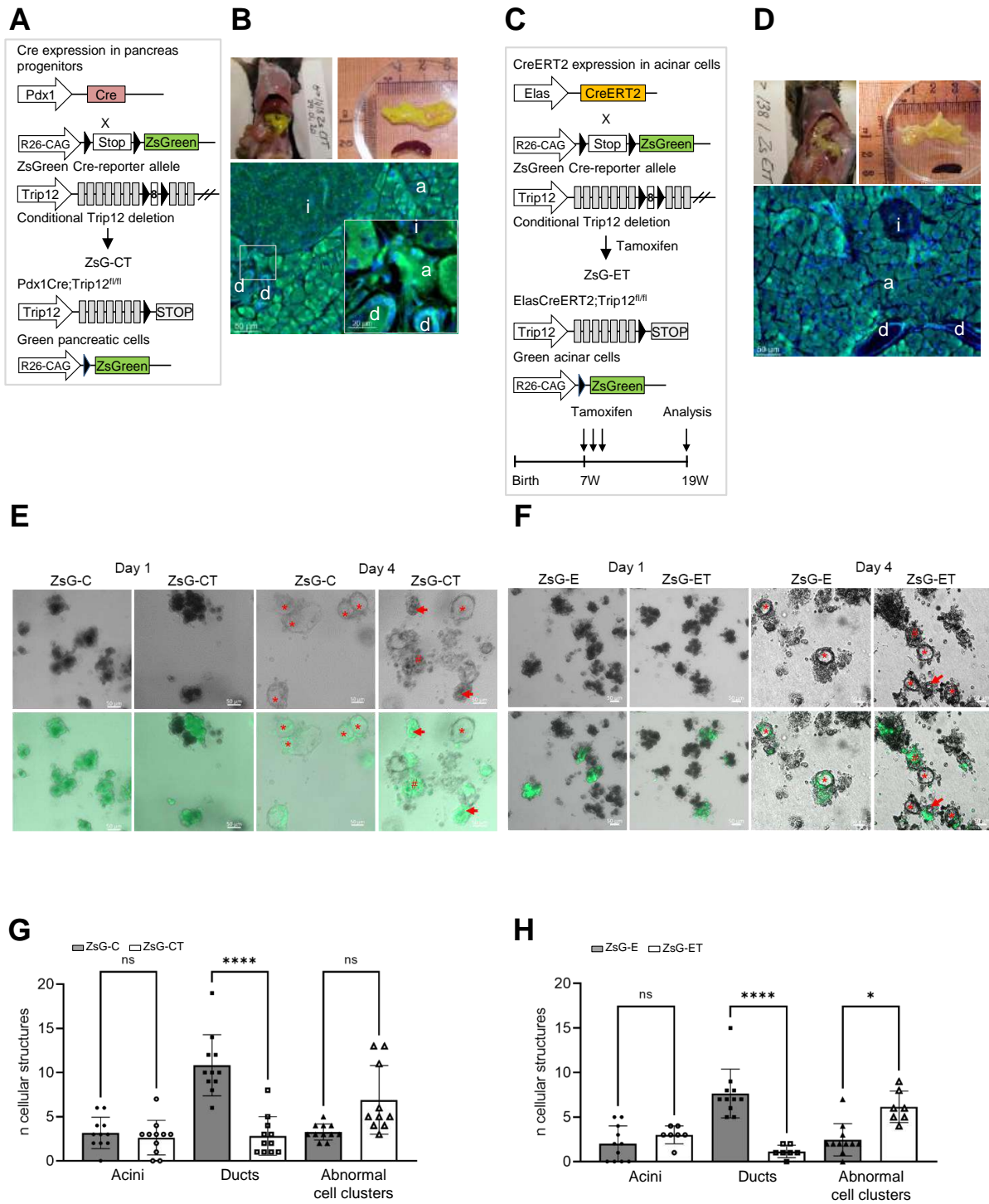


Figure 1: TRIP12 is overexpressed in preneoplastic PanIN and IPMN lesions and human pancreatic cancers.

(A) Representative TRIP12 immunohistochemistry staining in healthy pancreatic tissue (n=7). d=duct and i=islet. **(B)** Representative TRIP12 immunohistochemistry staining in sections of human pancreas containing PanINs (n= 27). **(C)** Quantification of TRIP12 positive nuclei in 85 non neoplastic ducts, 29,000 non neoplastic acinar cells from 7 PDAC patients, in 170 PanIN1, 62 PanIN2 and 29 PanIN3 from 17, 14 and 10 patients, respectively and in 537 neoplastic ducts from 7 PDAC patients. Each symbol represents the mean percentage of TRIP12 positive nuclei in each quantified sample. Each color corresponds to one patient. The blue bars represent the mean of each quantified group. **(D)** Representative TRIP12 immunohistochemistry staining in IPMN with low-grade dysplasia, intermediate-grade dysplasia, high-grade dysplasia and in PDCA. **(E)** Percentage of immunoreactive nuclei scored in 5 cores of 27 IPMN with low-grade dysplasia (LD), 17 IPMN with intermediate-grade dysplasia (ID), 20 IPMN with high-grade dysplasia (HD) and in 21 carcinoma (PDAC) determined by two investigators. The blue bars represent the mean of each quantified group. **(F)** Representative TRIP12 immunohistochemistry staining in human pancreatic adenocarcinoma (n=7). **(G)** Expression of Trip12 mRNA in pancreatic tumors (purple, n=179) and normal pancreas (grey, n= 171), obtained from GEPIA database. **(H)** Representative images obtained by immunocytochemistry on tissue macro-arrays of human pancreatic tumors displaying a weak, moderate and strong TRIP12 expression. The insets emphasize on cancerous cells. **(I)** Kaplan Meyer survival plots of Trip12 mRNA high (red, n=89) and low (blue, n=89) expressing PDAC patients. Data were obtained from GEPIA database.

Figure 2: TRIP12 is required for ADM formation ex vivo and in vivo.



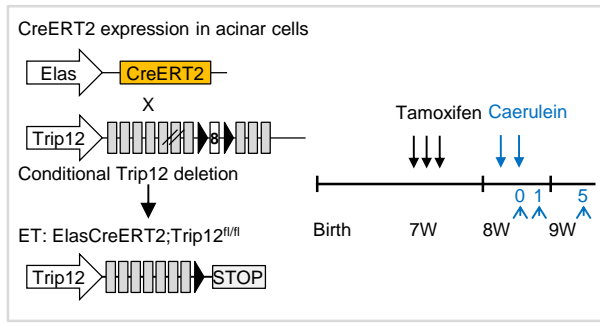
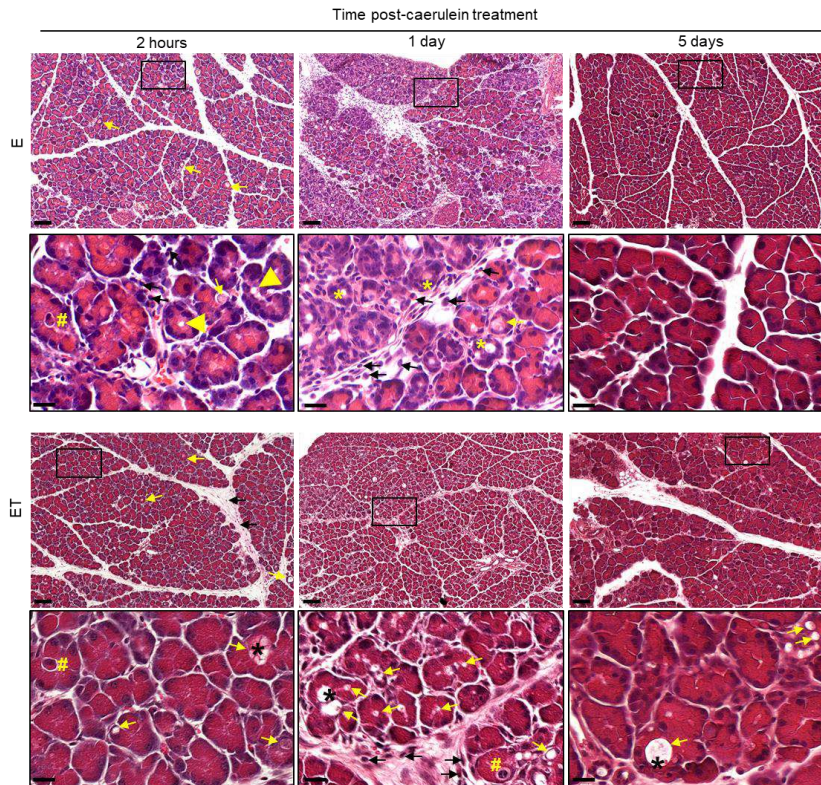
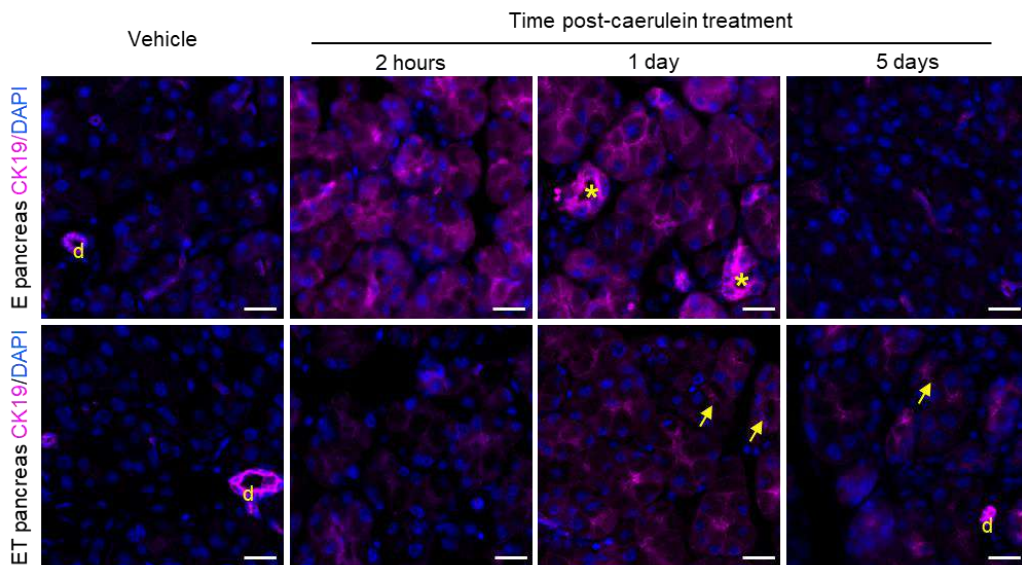
I**J****K**

Figure 2: TRIP12 is required for ADM formation ex vivo and in vivo.

(A) Schematic representation of the Pdx1Cre;ZsGreen^{f/f};Trip12^{f/f} (ZsG-CT) mice. **(B)** Expression of ZsGreen in the pancreas of ZsG-CT mice showing recombination in all pancreatic cells. a =acini, d=duct and i=islet. Nuclei are counterstained with DAPI. **(C)** Schematic representation of the ET model and of ZsGreen conditional expression in acinar cells in which the CreER recombinase expression is driven by the Elastase Cre^{ERT2} promoter. Black triangles indicate loxP sequences. Timing of injections is represented. **(D)** Expression of ZsGreen in the pancreas of ZsG-ET mice showing specific recombination. a =acini, d=duct and i=islet. Nuclei are counterstained with DAPI. **(E-F)** Representative bright field and fluorescence microscopic images of acinar cell clusters and ductal cyst structures from isolated acinar cells from control ZsG-E and ZsG-C and Trip12-deficient ZsG-ET and ZsG-CT pancreas on day 1 and on day 4 after isolation and treatment with EGF. Both Trip12^{+/+} and Trip12^{fl/fl} mice were bred with ZsGreen reporter mice prior crossing with ElasCreERT2 mice or Pdx1Cre mice yielding ZsGreen expression in control ZsG-E and ZsG-C and in ZsG-ET and ZsG-CT Trip12-deficient acinar cells. Red asterisks indicate ductal cysts structures formed after ADM. Red hashes indicate fluorescent acinar cell clusters that do not undergo acinar to ductal metaplasia. Red arrows show abnormal ET and CT acinar cell clusters with enlarged lumen or vacuoles but no ADM. Images are representative of three independent experiments. **(G-H)** Quantification of fluorescent cellular structures: acinar cell clusters, ductal cyst structures and abnormal acinar cell clusters (multilobed or enlarged lumen/vacuoles and absence of ductal flat epithelium) by day 4 after acinar cell isolation from ZsG-E and ZsG-C control (grey bars) and ZsG-ET and ZsG-CT (white bars) pancreas and treatment with EGF. The bars represent the mean \pm SEM of three independent experiments. **(I)** Experimental design of caerulein-induced acute pancreatitis in the ET and E control mice. Inactivation of Trip12 was induced by injections of tamoxifen at the age of seven weeks. Controls were also treated with tamoxifen. Pancreatitis was induced one week later. Mice were sacrificed 2 h (0), 24 h (1) and 5 days (5) from the last injection. **(J)** Representative H&E sections of E and ET mice of 5 ET and 10 E mice treated with tamoxifen and caerulein. **(K)** Representative images CK19 expression at the indicated times after caerulein treatment obtained by immunofluorescence from three experiments with three different mice. Nuclei are counterstained with DAPI. D=duct. Yellow asterisks indicate transdifferentiating acini, yellow arrows show vacuoles.

Figure 3: The heterogeneous overexpression of TRIP12 is explained by an altered cell cycle regulation.

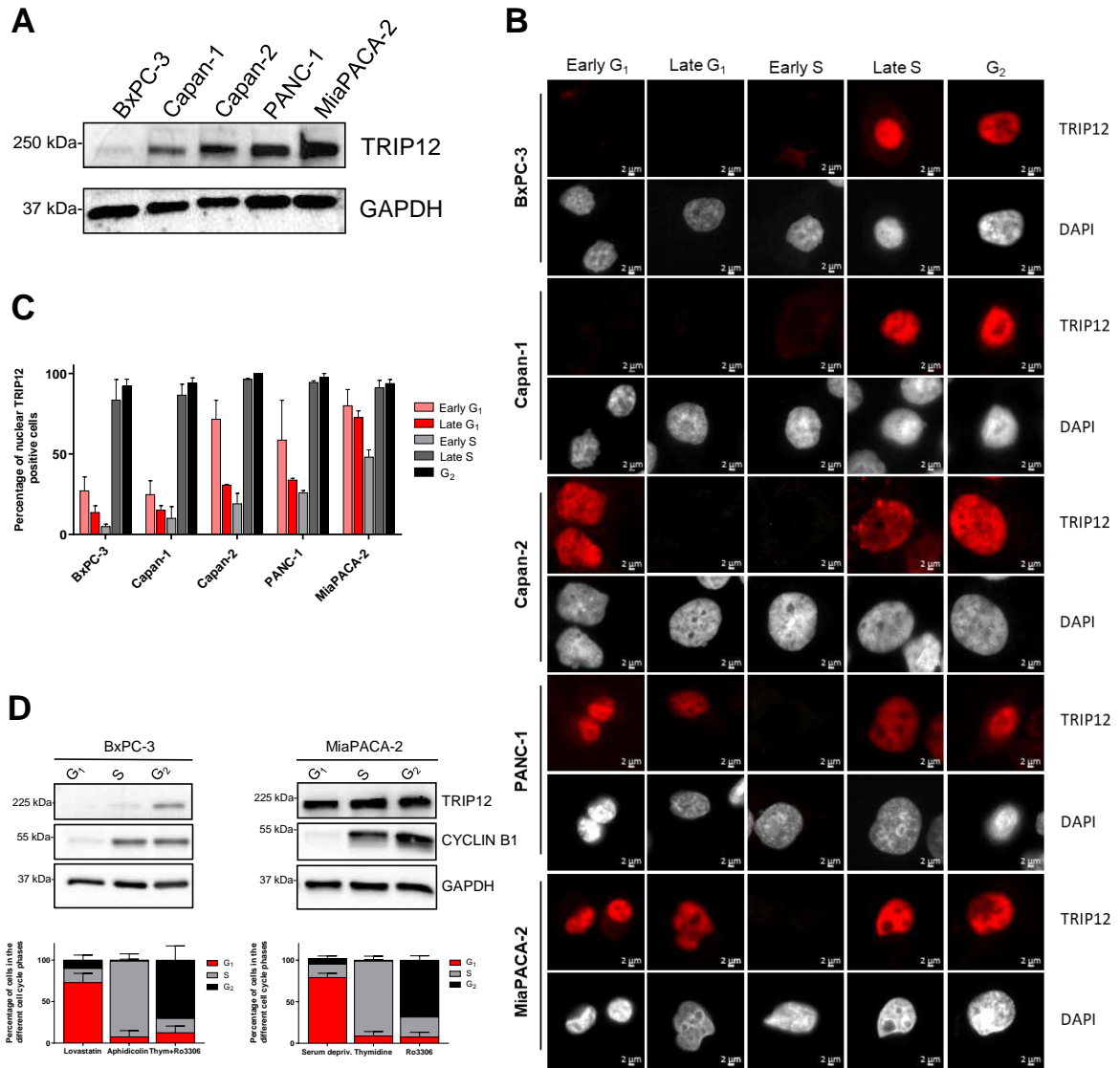
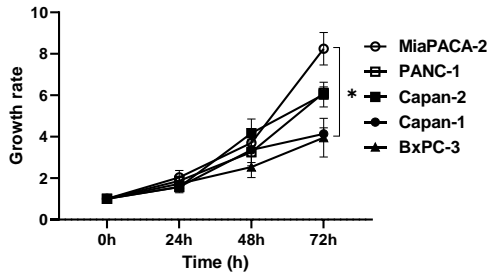


Figure 3: The heterogeneous overexpression of TRIP12 is explained by an altered cell cycle regulation.

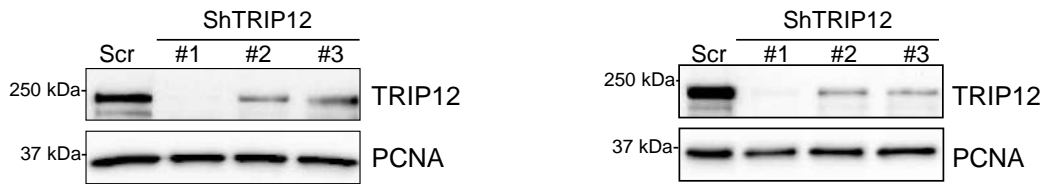
(A) TRIP12 protein expression in five PDAC-derived cell lines was determined by Western blot analysis. GAPDH protein level was used as loading control. The image is representative of at least three separate experiments. **(B)** Representative images of TRIP12 protein cellular localization during the different phases of the cell cycle in asynchronous BxPC-3, Capan-1, Capan-2, PANC-1 and MiaPACA-2 cell population by immunofluorescence. The method to categorize cells in the different phases of the cell cycle is described in **Supplemental Materials and Methods**. Nuclei were counterstained with DAPI. **(C)** The percentage of nuclear TRIP12 positive cells in the different phase of the cell cycle was determined in indicated PDAC-derived cell lines by immunofluorescence as described in Material and Methods. The graph represents the percentage of TRIP12 nuclear positive cells expressed as the mean \pm SEM obtained over more than 500 cells from at least two separate experiments. **(D)** TRIP12 protein expression in BxPC-3 and MiaPACA-2 enriched cell population in G₁, Early S and G₂ phases was determined by Western blot (top panel). CYCLIN B1 and GAPDH level was used control of enrichment and loading control, respectively. The images are representative of at least three independent experiments. Cell cycle distribution of BxPC-3 and MiaPACA-2 enriched cell population in G₁, Early S and G₂ phases by the indicated treatments (bottom panel). Enrichment level was measured by flow cytometry after PI incorporation. The graph represents the percentage of cells in the different phases of the cell cycle expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments.

Figure 4: TRIP12 participates in PDAC-derived cell growth by regulating E2F-targeted genes.

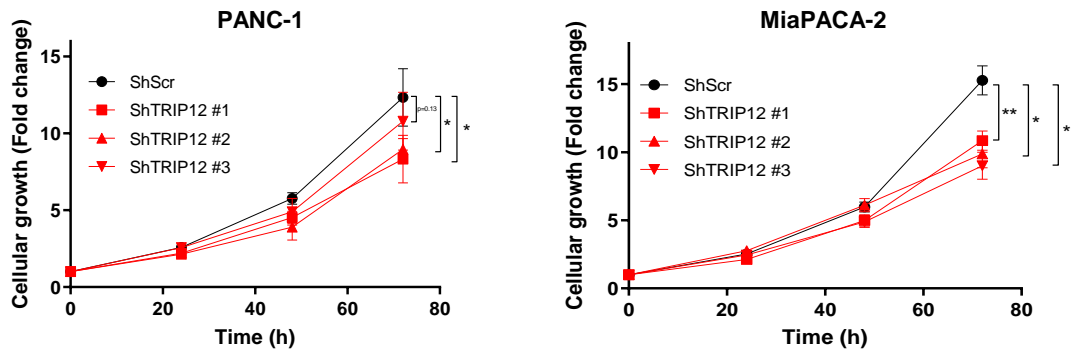
A



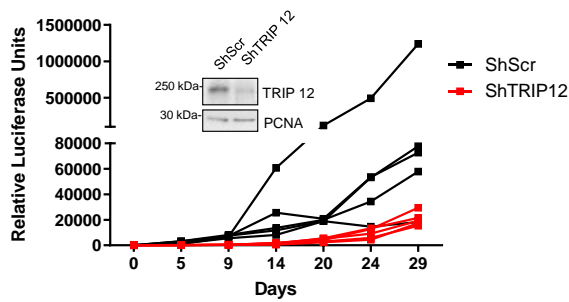
B



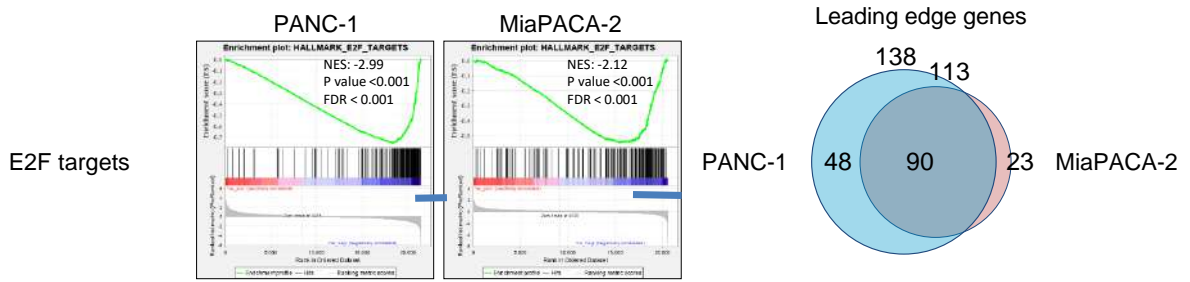
C



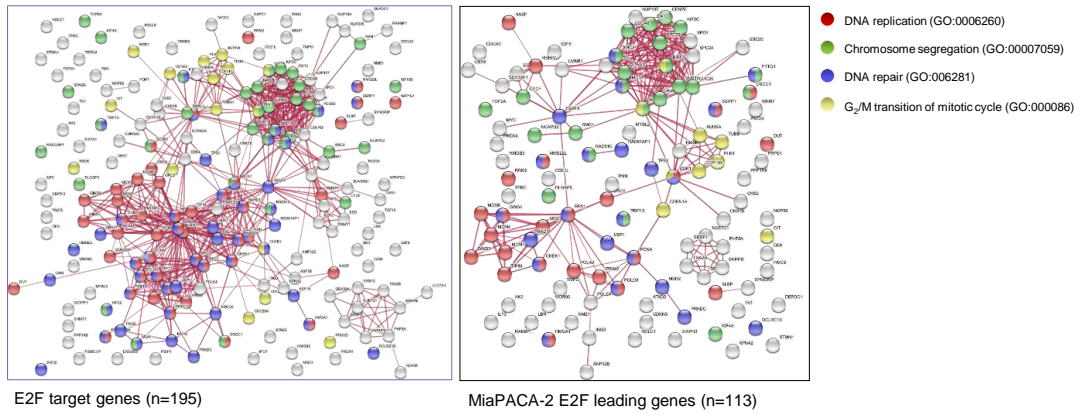
D



E



F



G

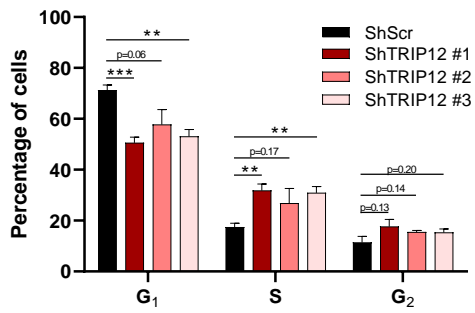
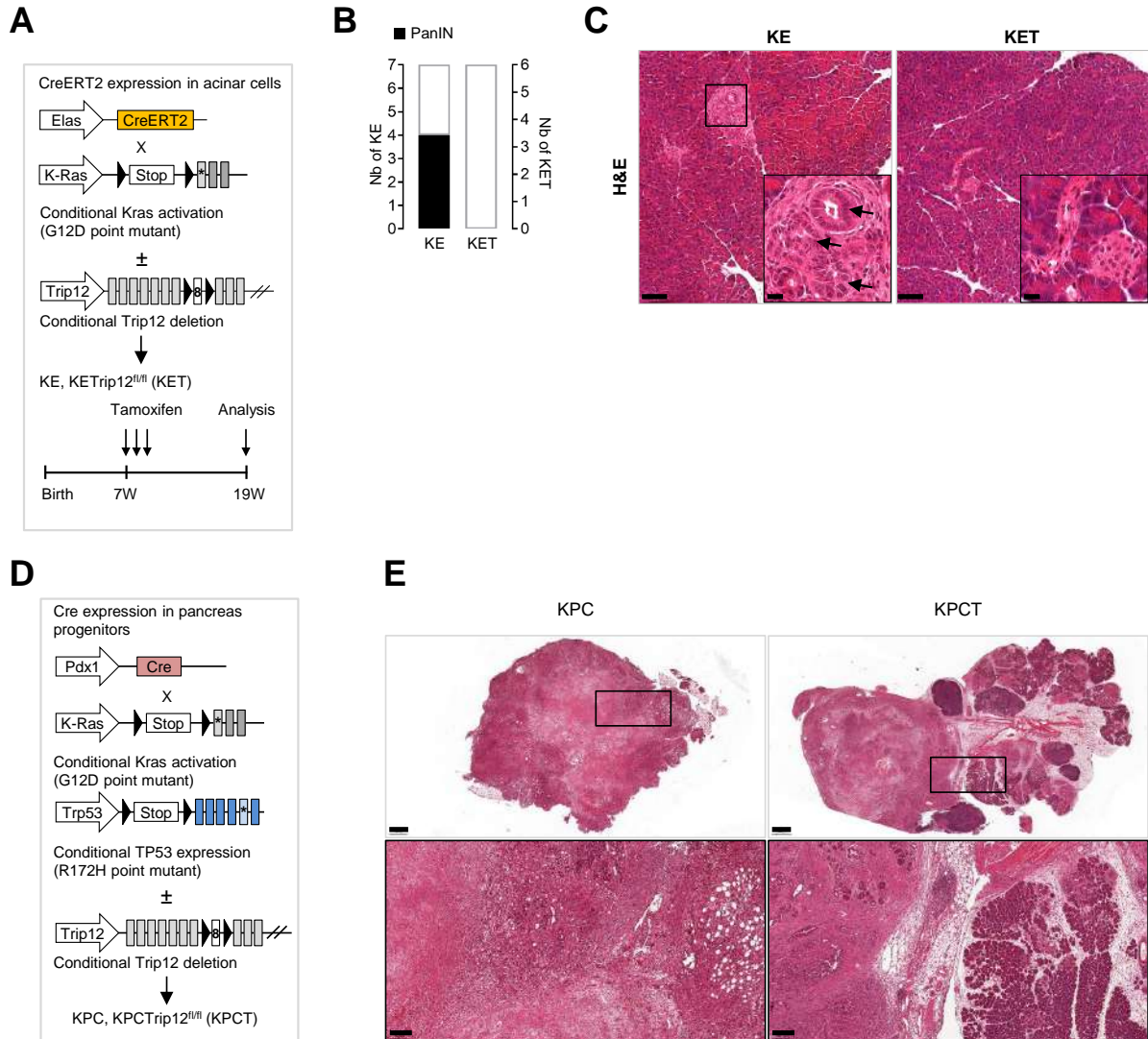


Figure 4: TRIP12 participates in PDAC-derived cell growth by regulating E2F-targeted genes.

(A) Cell growth of PDAC-derived cell lines was determined by cell counting every 24 h during 72 h. The results are expressed as growth rate compared to T=0 h and represent the mean \pm SEM of three independent experiments. **(B)** TRIP12 protein level in PANC-1 and MiaPACA-2 cells stably expressing three different shRNAs directed against Trip12 mRNA (ShTRIP12#1, #2, #3) was measured by Western blot and compared to its level in PANC-1 and MiaPACA-2 expressing a control shRNA (ShScr). PCNA protein level was used as loading control. The image is representative of three independent experiments. **(C)** Cell growth rate of TRIP12 depleted-PANC-1 and MiaPACA-2 was determined by cell counting. Cell were seeded at 5.10^5 cells/well and counted every 24 h for 72 h. Results are expressed as mean \pm SEM compared to t=0h (set as 1). **(D)** In vivo growth of TRIP12 depleted and control MiaPACA-2 cells was determined after orthotopic implantation in the pancreas of Nude mice. Gaussia Luciferase (GLuc) stably expressing MiaPACA-2 cells were stably transfected with ShTRIP12 or Scr shRNA. Luciferase activity in blood was measured every 4-6 days during 29 days. The results represent the luciferase activity (RLU) in four mice per conditions. The inset represents the level of TRIP12 protein in ShScr and ShTRIP12 GLuc MiaPACA-2 cells determined by Western blot. PCNA protein level was used as loading control. **(E)** Graphical representation of E2F target gene set enrichments after TRIP12 depleted-PANC-1 and MiaPACA-2 cell transcriptomic analysis using GSEA software with a nominal p value <0.001 and a false discovery rate (FDR) < 0.001 (left panel). NES Stands for Normalized Enrichment Score. Venn diagram representation of E2F target leading edge genes in TRIP12-depleted PANC-1 and MiaPACA-2 cell transcriptomic analysis (right panel). **(F)** Physical interaction networks of proteins encoded by the E2 target gene set (n=195, left panel) and the TRIP12 depleted-MiaPACA-2 E2F target leading edge genes (n=113, right panel) using STRING software. Nodes represent proteins. The edges indicate that the proteins are part of a physical complex. The line thickness indicates the strength of data. Colored nodes represent proteins that belong to the Gene Ontology biological processes indicated on the figure. **(G)** Cell cycle distribution of TRIP12 depleted (ShTRIP12 #1, #2 and #3) and control (ShScr) MiaPACA-2 cells measured by flow cytometry after propidium iodide treatment. The results are expressed as percentage of cells in the different phase of the cell cycle and are the mean \pm SEM of at least four independent experiments.

Figure 5: TRIP12 participates in pancreatic cancer initiation, development and metastatic capacity.



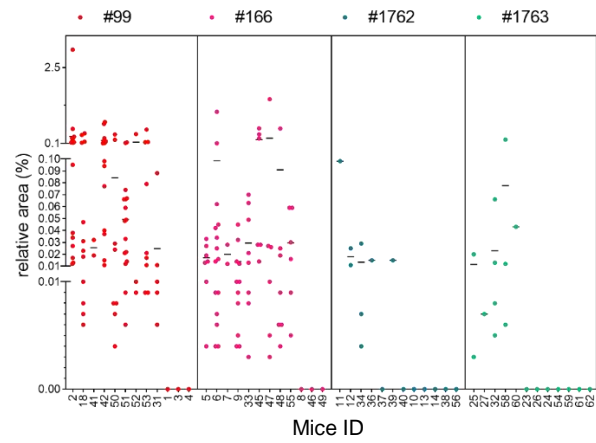
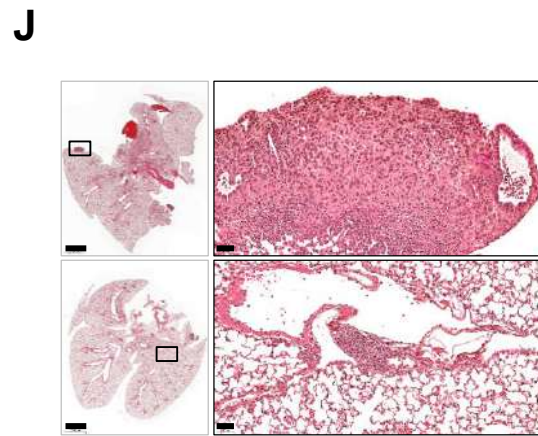
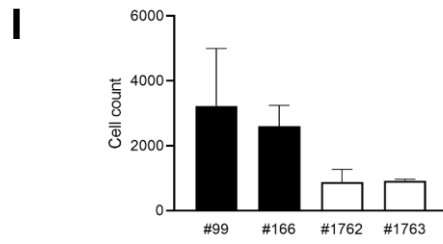
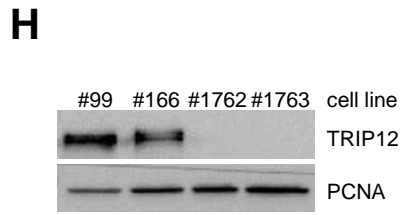
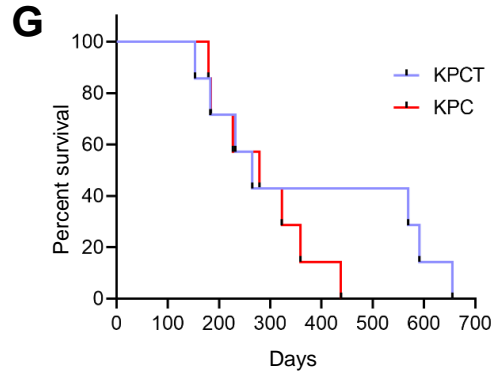
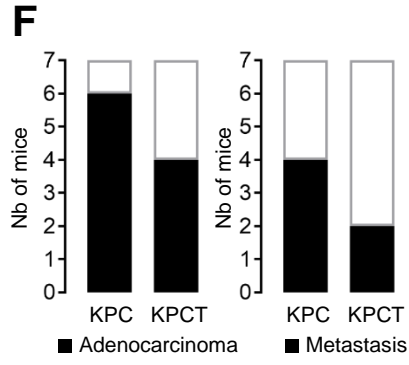
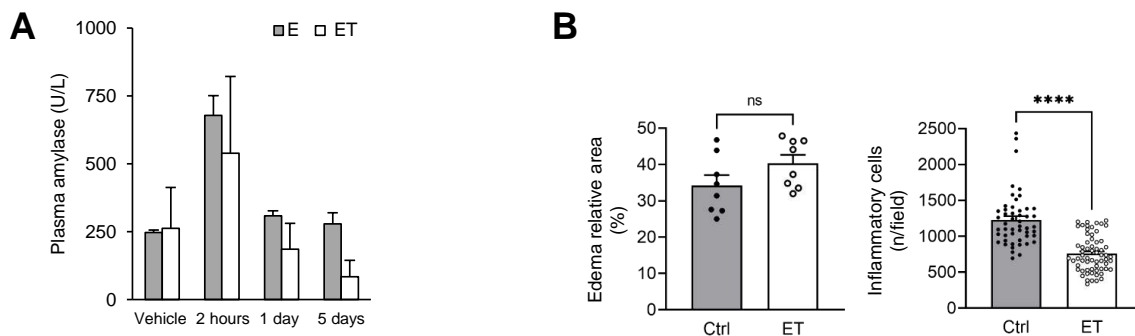


Figure 5: TRIP12 participates in pancreatic cancer initiation, development and metastatic capacity.

(A) Schematic representation of the KET murine model. Black triangles indicate loxP sequences. TRIP12 deletion and *Kras*^{G12D} activation are induced by tamoxifen at seven weeks, mice are sacrificed at 19 weeks. **(B)** Incidence of precancerous PanIN lesions in KE (n=7) and KET mice (n=6). **(C)** Representative histological analysis of KE (n=7) and KET mice (n=6). Boxes indicate enlarged regions in insets. Black arrows indicate PanIN lesions. **(D)** Schematic representation of the KPC and KPCT models. Black triangles indicate loxP sequences. **(E)** Representative H&E staining of KPC and KPCT pancreas. Black boxes indicate enlarged regions. **(F)** Incidence of adenocarcinoma and metastasis in KPC (n=7) and KPCT (n=7) mice. The number of mice with adenocarcinoma and metastasis is represented with black bars. **(G)** Survival of KPC (n=7, red curve) and KPCT (n=7, blue curve) mice. **(H)** TRIP12 protein expression in KPC and homozygous KPCT cell lines derived from pancreatic tumors of KPC and KPCT mice was determined by Western-blot. The image is representative of at least three separate experiments. PCNA is used as a loading control. **(I)** Invasion assay of #99 and #166 cells (black bars) and of #1762 and #1763 cells (white bars). Results are expressed as the mean \pm SEM (n=3). **(J)** Representative H&E staining of lung metastasis from mice that were injected in the tail vein with indicated cell lines (left panel). Black boxes indicate enlarged regions. Relative area of metastasis area in lungs of mice that were injected in the tail vein with indicated cell lines (right panel). Twelve mice were injected with each cell line (KPC #99 and #166; KPCT #1762 and #1763). The metastasis surface was quantified on two whole lung sections for each mouse and normalized with the total area of the lungs. Results are expressed as the relative area of all metastasis for each mouse. Mouse ID are indicated on the x axis.

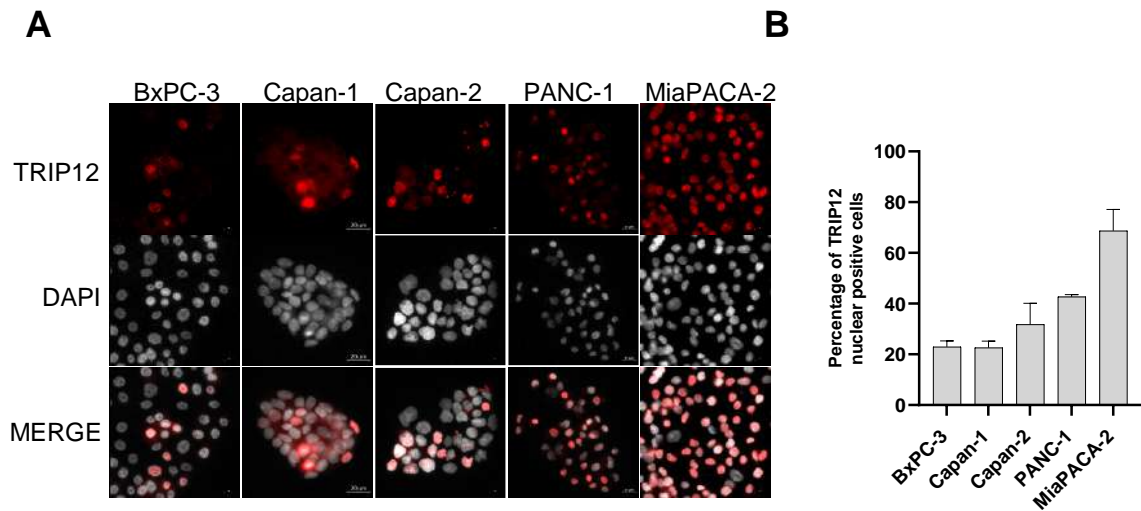
Supplemental figure 1



Supplemental figure 1

(A) Plasma amylase levels of E (grey bars, n=3) and ET (white bars, n=3) mice were determined at 2h, 1 day or 5 days after the last injection. Results are expressed as a mean \pm SEM. **(B)** Quantification of pancreatic injury in E and ET pancreas one day after the last caerulein treatment. Interstitial edema area/pancreas ratio was measured in two sections and inflammatory cells were counted in 10 to 25 20x-fields of three E and three ET mice pancreas using Fiji software. Data are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental figure 2

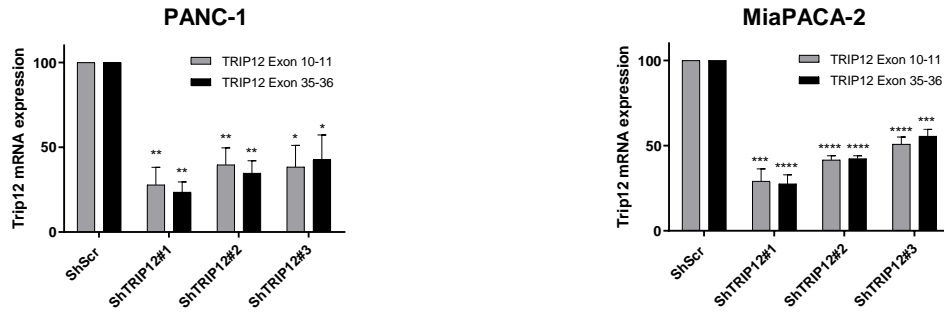


Supplemental figure 2

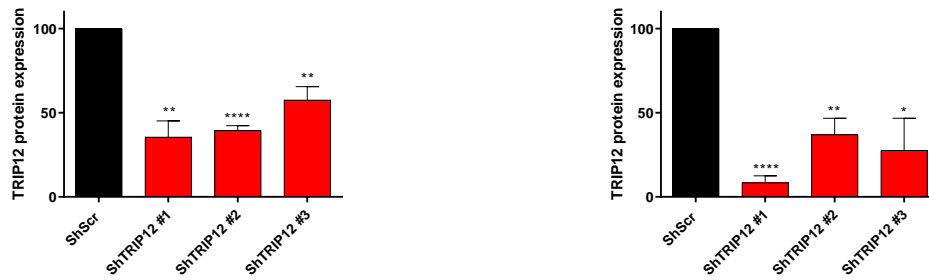
(A) Representative image of TRIP12 protein nuclear expression by immunofluorescence in indicated human PDAC-derived cell lines. The different cell lines were fixed during exponential phase of growth. Nuclei were counterstained with DAPI. **(B)** Percentage of nuclear TRIP12-positive cells quantified in indicated human PDAC-derived cell lines using Fiji software. The quantification was performed on over than 300 cells obtained from three separate experiments. Results are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental figure 3

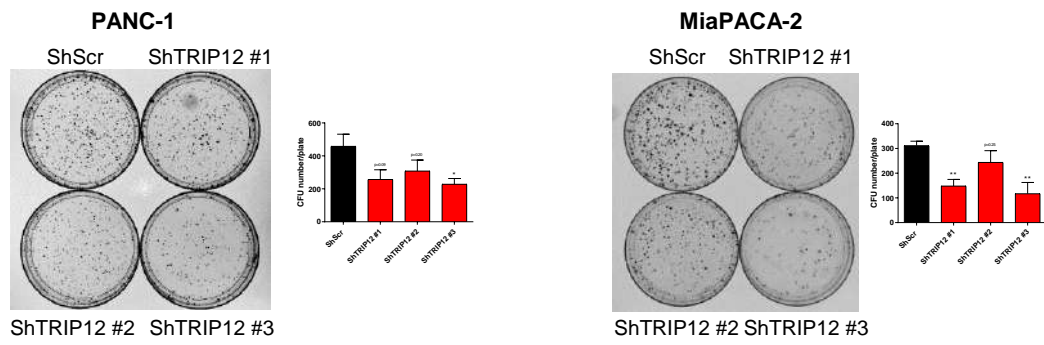
A



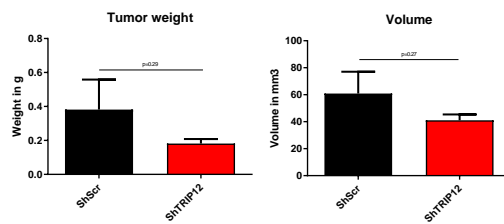
B



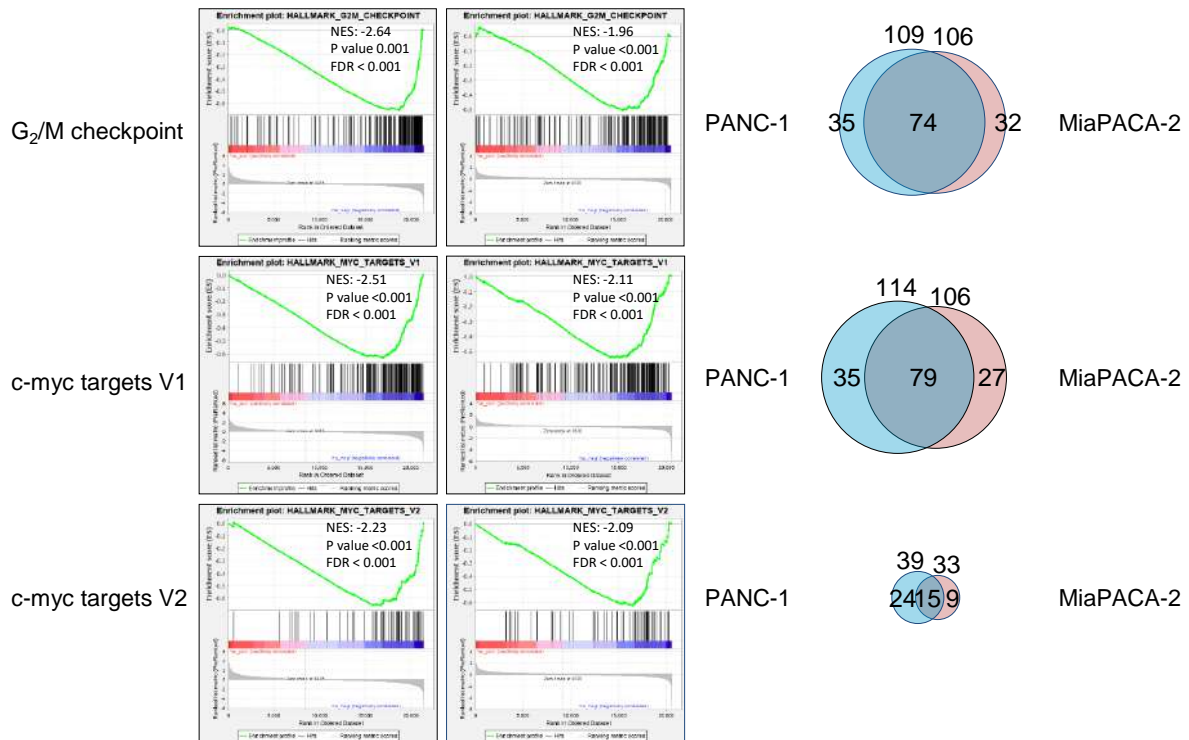
C



D



D

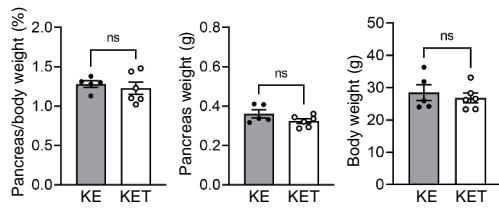


Supplemental figure 3

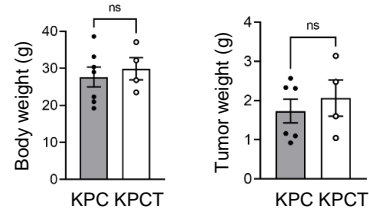
(A) Trip12 mRNA level in PANC-1 and MiaPACA-2 cells stably expressing shRNAs directed against Trip12 mRNA measured by qRT-PCR and compared to PANC-1 and MiaPACA-2 expressing a control shRNA (ShScr). Gapdh, β -Actin and cyclophilin A mRNA levels were used for normalization. Results are expressed as a percentage \pm SEM of Trip12 mRNA level in control cells (set as 100%) and are the mean of at least four separate experiments. **(B)** The graphs represent the quantification of protein levels presented in Fig. 4B. The results are expressed as a percentage \pm SEM of TRIP12 protein level in PANC-1 and MiaPACA-2 control cells (set as 100%) and are the mean of at least three separate experiments. **(C)** Colony formation assay performed with TRIP12 depleted-PANC-1 and MiaPACA-2 cells. Cells were seeded at 10^3 cells per 10 cm-plate. After 9-14 days, colonies were stained using Cristal violet. The graphs represent the quantification of colony number using Fiji software. The results are expressed as mean \pm SEM obtained from at least three separate experiments. **(D)** Weight and volume of ShScr and ShTRIP12 GLuc MiaPACA-2 tumors measured after 29 days. The results are expressed as mean \pm SEM of four tumors for each conditions. **(E)** Graphical representation of G₂/M checkpoint, c-myc targets V1 and V2 gene set enrichments after TRIP12 depleted-PANC-1 and MiaPACA-2 cell transcriptomic analysis using GSEA software with a nominal p value <0.001 and a false discovery rate (FDR) < 0.001. NES Stands for Normalized Enrichment Score (left panel). Venn diagram representation of G₂/M checkpoint, c-myc targets V1 and V2 leading edge genes in TRIP12-depleted PANC-1 and MiaPACA-2 cell transcriptomic analysis (right panel).

Supplemental figure 4

A



B



Supplemental figure 4

(A) Pancreas/body weight ratio, pancreas and mouse weight of KE (n=5) and KET mice (n=6) three months after tamoxifen treatment. Data are presented as mean \pm SEM. **(B)** Body weight of KPC (n=7) and KPCT (n=4) mice, tumor weight in KPC (n=6) and KPCT (n=4) pancreas. Data are presented as mean \pm SEM.

Supplemental table 1: Primer sequences

RT-qPCR	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
hTrip12 exon 10-11	ATATTATGAACCATGCTTGTGCGAG	CTCTGCCACATCAATACACTGAAT
hTrip12 exon 35-36	TTCAGATTGGTGGACCTTCC	GGCTACAACCTGGGTCGATGT
hβActin	AGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGT	GCAATCAAAGTCCTCGGCCACATT
hGapdh	CAATGACCCCTTCATTGACC	GTA CTGCTCCTGGAAGATG
hCyclophilin A	GTCAACCCACCGTGTTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
Genotyping	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
LSL- Trp53	TTACACATCCAGCCTCTGTGGAGCTAGCCACCATGG CTTGAGTAAGTCTGCA	CTTGGAGACATAGCCACACTG
LSL-Kras	AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGTCTGCA	TCCGAATTCAGTGACTACAGATGTACAGAG
ElasCreERT2	CTCTGCTAACCATGTTTCATGCCT	ACGCTAGAGCCTGTTTTG
Pdx1Cre	CCTGGACTACATCTTGAGTTG C	AGGCAAATTTTGGTGTACGG
ZsGreen	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA AACCAGAAGTGGCACCTGAC	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC GGCATTAAAGCAGCGTATCC
Trip12-Tm1a	GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCG	GATGAGCTAGTAGAATTCTGAGATA
Trip12-Tm1c	AATGTAATACTCCTTTGACACTTGG	GATGAGCTAGTAGAATTCTGAGATA

Supplemental table 2: List of antibodies

Antigen	Host	Dilution	References	Manufacturer
TRIP12	Rabbit	1:1000 (IHC) 1:1000 (WB)	Cat# HPA036835, RRID :AB_2675340	Sigma-Aldrich
TRIP12	Rabbit	1:200 (IHC) 1:1000 (WB)	A301-814A RRID:AB_1264344	Bethyl Laboratories
TRIP12	Rabbit	1:1000 (WB)	Bo Am Seo ⁵⁶	N/A
GAPDH	Rabbit	1/2000 (WB)	#5174, RRID :AB_10622025	Cell signaling
CYCLIN B1	Mouse	1/1000 (WB)	MAB3684, RRID:AB_11212375	Millipore
Cytokeratin 19 (Troma III)	Rat	1:100(IHC)	Rolf Kemler (Max-Planck Institute, Freiburg, Germany)	DSHB/NICHD/ The University of Iowa

WB: Western Blot; IF: ImmunoFluorescence; IHC: ImmunoHistoChemistry.

Supplemental table 3: Clinical features of PDAC-patients and tumors.

Case number	Gender	Age	Grade	Differentiation state	TRIP12 expression
P13.19943	F	57	Low	High	+
P13.19946	M	64	Low	Moderate	+
P14.369	F	72	Low	High	+
P11.10243	F	66	Low	High	+
P11.8368	M	71	Low	High	+
P12.12800	F	53	High	Anaplasia	+
P13.19938	M	59	High	Low	++
P13.19939	F	64	Low	Moderate	++
P13.19940	M	59	Low	High	++
P14.366	F	64	Low	High	++
P14.368	M	72	Low	Moderate	++
P14.365	M	77	Low	Moderate	++
P11.12821	M	59	Low	Moderate	++
P11.12520	F	76	Low	High	++
P13.19941	M	66	Low	High	+++
P13.19944	F	72	Low	Moderate	+++
P13.19947	M	42	Low	High	+++
P13.19948	F	59	Low	High	+++
P14.364	F	69	Low	High	+++
P12.10905	F	74	High	Low	+++
P12.13329	F	78	Low	High	+++

Supplemental table 4: GSEA enrichment analysis.

TRIP12 depleted-PANC-1		TRIP12 depleted-MiaPACA-2	
Pathways	NES	Pathways	NES
Interferon α response	2.45	K ras signaling	1.69
Interferon γ response	2.05		
TNF- α signaling via NFKB	1.99		
Epithelial mesenchymal transition	1.91		
E2F targets	-2.99	E2F targets	-2.12
G ₂ /M checkpoint	-2.64	MYC targets V1	-2.11
MYC targets V1	-2.51	MYC targets V2	-2.09
MYC targets V2	-2.23	G ₂ /M checkpoint	-1.96

Nominal p value and FDR q-value < 0.001. NES: normalized enrichment score.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Cell cycle synchronization

BxPC-3 cells were treated with lovastatin (60 μ M; Sigma-Aldrich) for 24 h for late G₁-phase enrichment, with aphidicolin (1 μ M; Sigma-Aldrich) for 24 h for early S-phase enrichment. For G₂-phase enrichment, BxPC-3 cells were subject to a 18 h-treatment with thymidine (2 mM; Sigma-Aldrich), released in complete medium for 5 h followed by a 3 h-treatment with Ro-3306 (9 μ M; Tocris). MiaPACA-2 cells were seeded at 80% of confluence and cultured in 0.1% fetal calf serum (FCS)-supplemented medium for 72 h for late G₁-phase enrichment, with thymidine (2 mM) for two periods of 18 h spaced by a 8 h-period in complete culture medium for early S-phase enrichment. For G₂-phase enrichment, MiaPACA-2 cells were treated with Ro-3306 (9 μ M; Tocris) for 24 h. Cells were treated with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (10 μ M, Life technologies) for 20 min.

shRNA lentiviral plasmids and lentiviral production

The following lentivirus shRNA lentiviral plasmids were purchased from Sigma-Aldrich: pLK01-TRC1 shRNA control SHC002-target sequence CAACAAGATGAAGAGCACCAA, ShTRIP12#1 pLK01-TRC1 TRCN0000022374-target sequence CCTGAGTCAAGGAAACATGTT, ShTRIP12#2 pLK01-TRC1 TRCN0000022375-target sequence CCGGAGTTTGAATCCACCTTT and ShTRIP12#3 pLK01-TRC1 TRCN0000273210-target sequence CCACTACTCAGTCACCTAAAT. Lentiviral particle production using LentiSmart reagents (Invivogen) was previously described³⁶.

Flow cytometry

Cells were fixed in 70% ethanol during the exponential growth phase for asynchronous cells or after treatments for cell-cycle enriched populations. Fixed cells were treated with RNase A (10

µg/ml; Sigma-Aldrich) and propidium iodide (20 µg/ml; Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C. Data were acquired using the MACS Quant® VYB cytometer (Miltenyi Biotech, Paris) and cell cycle distribution was analyzed with MACS Quant and ModFit software.

RNA isolation and semi-quantitative real-time PCR analysis

Total RNA was isolated from cell lines with Trizol® reagent (ThermoFisher) according to supplier's instructions. RNA integrity was measured with a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (ThermoScientific). The RevertAid® minus H (ThermoFisher) kit was used according to the manufacturer's recommendations with 2 µg of total RNA. qPCR duplicates were carried out in a 20 µl-reaction using Sso Fast EvaGreen reagent (BioRad) following supplier's instructions on a StepOne Plus™ Real-Time PCR system (Applied BioSystems). Relative amount of mRNA was calculated by the comparative threshold cycle (Ct) method as $2^{-\Delta Ct}$, where $\Delta Ct = Ct_{\text{target mRNA}} - Ct_{\text{geometric mean of Gapdh, Cyclophilin A and } \beta\text{-Actin mRNA}}$. Amplification efficacy was verified for every sets of primers, primers sequences are listed in **Suppl. Table 1**.

Western blot analysis

Murine and human cell lines were incubated in RIPA lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton-X100® supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) for 20 min on ice, sonicated two times for 30 sec at 25% amplitude (Vibra-Cell sonicator) and centrifuged 20 min at 12 000 rpm. Protein quantity was determined using Bradford assay (BioRad). 30-50 µg of nuclear proteins were loaded onto a 10% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane using TransBlot apparatus (BioRad). Membranes were subsequently incubated with TBS Tween-20® 0.01%, 5% fat milk for 1 h and with indicated antibodies (listed in **Suppl. Table 2**) overnight at 4°C. Membranes were incubated with appropriate HRP-coupled secondary antibodies. Protein abundance was visualized using Clarity™ Western ECL substrate, ChemiDoc™ XRS+ device and ImageLab™ software (BioRad).

Cellular growth rate, colony formation and invasion assays

For cellular growth rate, cell lines were seeded at a density of $5 \cdot 10^5$ cells/35mm-well. After 24 h cells were counted every 24 h for 72 h using a Coulter a Beckman Z1 Coulter apparatus. For colony formation assay, cells were seeded at 10^3 cells per 10 cm-plate. After 9-14 days, colonies were stained using 0.5% crystal violet. Images were acquired with Z1 videomicroscope cell observer (Zeiss) and analyzed using Fiji software. For invasion assay, upper compartment of a Boyden chamber (Falcon) was coated with growth factor reduced Matrigel matrix (Corning) and $3 \cdot 10^5$ cells seeded in serum-free DMEM/F-12 medium. Four hours after seeding, complete DMEM/F-12 medium was added to the lower compartment to launch invasion. Twenty-four hours after, cells were fixed using 4% paraformaldehyde for 20 min and stained with crystal violet 0.5% for 20 min. Non-migrated cells were removed from the insert using a cotton swab. Images were acquired with Z1 videomicroscope cell observer (Zeiss) and analyzed using Fiji software. All experiments were performed three times for each cell line.

IV. Revue n°1: E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions.



International Journal of
Molecular Sciences



Review

E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions

Manon Brunet ^{1,2,†}, Claire Vargas ^{1,2,†}, Dorian Larrieu ^{1,2,†}, Jérôme Torrisani ^{1,2,*,†} and Marlène Dufresne ^{1,2,*}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM Unit 1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, CEDEX 1, 31 037 Toulouse, France; manon.brunet@inserm.fr (M.B.); claire.vargas@inserm.fr (C.V.); dorian.larrieu@gmail.com (D.L.)

² Université Toulouse III-Paul Sabatier, CEDEX 9, 31 062 Toulouse, France

* Correspondence: jerome.torrisani@inserm.fr (J.T.); marlene.dufresne@inserm.fr (M.D.); Tel.: +33-582-741-644 (J.T.); +33-582-741-643 (M.D.)

† These authors have contributed equally to this work.

Received: 25 September 2020; Accepted: 5 November 2020; Published: 12 November 2020



Abstract: The Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 (TRIP12) protein belongs to the 28-member Homologous to the E6-AP C-Terminus (HECT) E3 ubiquitin ligase family. First described as an interactor of the thyroid hormone receptor, TRIP12's biological importance was revealed by the embryonic lethality of a murine model bearing an inactivating mutation in the *TRIP12* gene. Further studies showed the participation of TRIP12 in the regulation of major biological processes such as cell cycle progression, DNA damage repair, chromatin remodeling, and cell differentiation by an ubiquitination-mediated degradation of key protein substrates. Moreover, alterations of TRIP12 expression have been reported in cancers that can serve as predictive markers of therapeutic response. The *TRIP12* gene is also referenced as a causative gene associated to intellectual disorders such as Clark-Baraitser syndrome and is clearly implicated in Autism Spectrum Disorder. The aim of the review is to provide an exhaustive and integrated overview of the different aspects of TRIP12 ranging from its regulation, molecular functions and physio-pathological implications.

Keywords: TRIP12; E3 ubiquitin ligase; cancers; intellectual disorders

1. Introduction

Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 cDNA was cloned from the human myeloid KG-1 cell line and named the unidentified KIAA0045 human gene. The deduced coding sequence of KIAA0045 showed partial identity to that of the *S. cerevisiae* UFD4 protein (Ubiquitin Fusion Degradation 4) [1]. Another study identified Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 (TRIP12) as a member of the structurally and functionally related E3 ubiquitin ligases based on the identification of a domain homologous to the E6-associated protein carboxyl terminus (HECT domain), which is a protein that induces the ubiquitin-dependent degradation of P53 in the presence of the E6 protein from the papillomavirus [2].

TRIP12 was later characterized as a thyroid hormone receptor-interacting protein by the trap yeast interaction system to isolate proteins that interact with the ligand binding/dimerization/transcriptional activation domain of the rat TR-β1 (Thyroid Receptor-β1) [3]. Fifteen cDNAs encoding Thyroid hormone Receptor Interacting Proteins (TRIPs) were isolated. All the TRIPs interacted with the Thyroid hormone Receptor (TR), but only when thyroid hormone T3 was present (TRIP1 to TRIP11) or only when T3 was absent (TRIP12 to TRIP15). Protein sequences of the fifteen TRIPs are unrelated, but sequences similarities with known proteins and functional motifs were found for nine of them

based on blast alignment analyses with no demonstration of functional significance. The TRIP12 sequence was found to show 55% identity with the C-terminus of E6-associated protein, and more than a decade following its identification, TRIP12 was demonstrated to function as an E3 ubiquitin ligase [4]. Evidence of functional roles was later provided for the other TRIPs proteins (Supplemental Table). Among them, TRIP12 is the only TRIP family member bearing an E3 ubiquitin ligase activity.

The biological importance of TRIP12 was revealed by the embryonic lethality of a murine model bearing an inactivating mutation in the *TRIP12* gene [5]. Several molecular functions of TRIP12 in important cellular processes and signaling pathways have been demonstrated in recent years. Accumulating evidence indicate that TRIP12 ubiquitinates key proteins for cell homeostasis, regulates gene expression (See Section 5), and plays important roles in cancers and neurological diseases. Up to now, more than 58 publications related to TRIP12 have been referenced in PubMed, half of them in the last 5 years. We have recently contributed to broadening knowledge on the role of TRIP12 by discovering a new substrate essential for pancreatic acinar cells differentiation [6] and by demonstrating that TRIP12 is a new chromatin-associated protein with several implications in the cell cycle progression and in the maintenance of genome integrity [7]. Due to its implication in several important physiological and pathological processes, TRIP12 now emerges as a protein of interest for molecular mechanisms researches and as a potential new therapeutic target.

In this review, we attempt to comprehensively summarize the current knowledge from the literature and databases on TRIP12. This summary includes the gene and protein expression, the protein structure, the protein interactors and functions. We address the physio-pathological roles of TRIP12 in essential biological pathways in relation with some of its substrates. We also present the alterations of the *TRIP12* gene found in neurodevelopmental disorders and cancers as well as the alterations of TRIP12 protein expression in cancers, and their consequences. Finally, we discuss the potential role of TRIP12 as a therapeutic target and highlight the need for further research studies on this protein.

2. TRIP12 mRNA and Protein Expression

2.1. TRIP12 Gene Organization

In the human genome, the gene encoding for *TRIP12* mRNA is located on the long arm of chromosome 2 at the locus q36.3. It spreads over nearly 168 kb (Genome Browser (see Section Software and databases)). *TRIP12* mRNA expression is driven by a bidirectional promoter that also initiates the transcription of *FBXO36* (F-box Only protein 36) mRNA in a head-to-head opposite direction. Bidirectional promoters are often used to control genes sharing the same regulation or encoding proteins exhibiting a similar biological process [8]. The *FBXO36* gene encodes a protein that belongs to the F-box protein family. F-box is a ≈ 50 aa-domain that functions as a site for protein–protein interaction. Up to now, the functions of *FBXO36* are unknown. In general, F-box proteins are part of SCF (SKP1, Cullin, F-box protein) ubiquitin ligase complexes, in which they bind to substrates for ubiquitin-mediated proteolysis [8,9]. This would be consistent with the fact that *TRIP12* and *FBXO36* expression are co-regulated. The 555 bp-bidirectional promoter is embedded in a 1753 bp long-CG-rich region also called CpG (Cytosine-phosphate-Guanosine) island, but the regulatory regions and methylation level of *TRIP12/FBXO36* promoter remain unstudied.

2.2. TRIP12 mRNA Expression

To date, 26 different *TRIP12* splicing mRNA variants have been identified (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Table 1). Their length fluctuates from 9,065 (variant 4) to 10,492 nt (variant 20) with 41 to 43 exons with the exception of variants 24, 25, and 26 that contain only the first six (variants 24 and 25) or seven exons (variant 26) with a length of 5,951 (variant 26) to 6,052 nt (variant 25). Little is known regarding the expression level of the different splicing variants in human cells. It is suggested *TRIP12* mRNA transcripts are a mixture of all possible isoforms, although the variant NM_001284215.1 seems to be predominant in peripheral leukocytes [10]. For the long variants, while the 5'-Untranslated Region

(5'-UTR) is ≈ 180 nt-long, the 3'-Untranslated Region (3'-UTR) represents approximately one-third of the total mRNA length (≈ 3700 nt), which likely indicates a regulatory function for this region (Figure 1). In fact, the existence of a short (340 nt) and a long form (3716 nt) of *TRIP12* 3'-UTR mRNA was reported [11]. The different sites of transcriptional termination are explained by the presence of two consensus polyadenylation signals (Figure 1). These two variants display different translation efficiency in response to an activation of the mTORC (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) signaling pathway where the short form is more efficiently translated [11]. With reference to the Human Protein Atlas (see Section Software and databases), the expression of *TRIP12* mRNA is ubiquitous in human tissues even if levels of mRNA vary between tissues. For example, *TRIP12* mRNA is highly expressed in testis and in muscles but weakly expressed in pancreatic tissue [1,12,13].

Table 1. List of the human mRNA variants and protein isoforms of *TRIP12*.

mRNA Variant	Accession Number	mRNA Length	Exon Number	Protein Isoform	Protein ID	aa Number	Theoretical kDa
1	NM_001284214.2	10019	42	a	NP_001271143.1	2040	224
2	NM_001284215.2	9974	41	b	NP_001271144.1	2025	223
3	NM_004238.3	9875	41	c	NP_004229.1	1992	219
4	NM_001284216.2	9065	39	d	NP_001271145.1	1722	189
5	NM_001348315.2	10408	42	a	NP_001335244.1	2040	224
6	NM_001348316.2	10070	41	b	NP_001335245.1	2025	223
7	NM_001348317.1	9959	41	e	NP_001335246.1	2020	222
8	NM_001348318.2	10348	41	e	NP_001335247.1	2020	222
9	NM_001348319.1	10085	42	f	NP_001335248.1	2062	227
10	NM_001348320.2	10474	42	f	NP_001335249.1	2062	227
11	NM_001348321.1	10088	42	g	NP_001335250.1	2063	227
12	NM_001348322.1	10218	43	h	NP_001335251.1	2067	227
13	NM_001348323.3	10100	42	h	NP_001335252.1	2067	227
14	NM_001348324.2	10196	42	h	NP_001335253.1	2067	227
15	NM_001348325.2	10611	43	h	NP_001335254.1	2067	227
16	NM_001348326.2	10486	42	h	NP_001335255.1	2067	227
17	NM_001348327.2	10489	42	h	NP_001335256.1	2067	227
18	NM_001348328.1	10103	42	i	NP_001335257.1	2068	227
19	NM_001348329.2	10454	42	i	NP_001335258.1	2068	227
20	NM_001348330.2	10492	42	i	NP_001335259.1	2068	227
21	NM_001348331.1	9878	41	j	NP_001335260.1	1993	219
22	NM_001348332.1	9998	43	k	NP_001335261.1	2033	224
23	NM_001348333.1	10022	42	l	NP_001335262.1	2041	225
24	NM_001348335.1	5955	6	m	NP_001335264.1	440	48
25	NM_001348336.1	6052	6	m	NP_001335265.1	440	48
26	NM_001348334.1	5951	7	n	NP_001335263.1	411	45

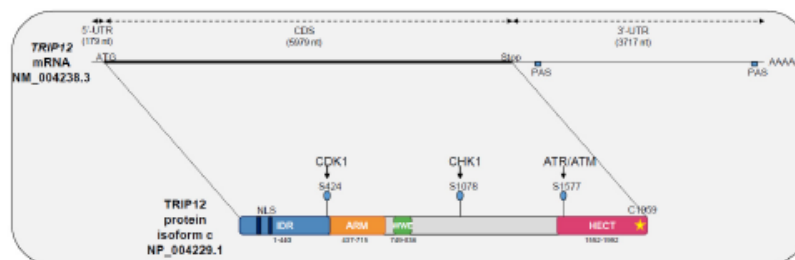


Figure 1. Schematic representation of Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12 (*TRIP12*) mRNA (NM_004238.3) and *TRIP12* protein (isoform c, NP_004229.1) with functional domains, kinase associated-phosphorylated residues and cysteine catalytic site (yellow star). UTR: Untranslated Region, CDS: Coding Sequence, PAS: Poly-Adenylation Signal, AAA: Poly-adenylated tail, ATG: translation Start codon, Stop: translation Stop codon, NLS: Nuclear Localization Signal, S: serine residue, aa: amino acid, IDR: Intrinsically Disordered Regions, ARM: Armadillo repeats, HECT: Homologous to the E6-AP C-Terminus.

2.3. TRIP12 Protein Expression and Cellular Localisation

TRIP12 protein translation can occur from 26 different mRNA splicing variants (Table 1). This leads to the generation of 14 different TRIP12 protein isoforms (isoforms a to m) with a length comprised between 1722 aa and 2068 aa for the long isoforms a to l (Figure 2). The two short isoforms (m and n) contain only 440 and 411 aa, respectively. Multiple alignment analysis COBALT (Constraint-based Multiple Alignment Tool) (see Section Software and databases) reveals a high similarity between the long isoforms (Figure 2). The two most studied isoforms b and c (2025 and 1992 aa, respectively) only differ by a six aa deletion in the IDR domain and a 27 aa deletion in the WWE domain in the isoform c that potentially modifies the protein–protein interaction capacity of this isoform (see Section 3.2.). For further description of the TRIP12 protein, the 1992 aa isoform c (NP_004229.1) will be used as a reference. Even though several protein isoforms of TRIP12 potentially exist in human cells, it is still unknown whether the different isoforms are cell-specific or if they co-exist and in what proportion in the same type of cells. Unfortunately, commercially available antibodies are directed against epitopes that are common to the long isoforms of TRIP12 (except the isoform d). Therefore, they cannot discriminate the different long isoforms. However, immunostaining analysis using these antibodies reveals a nuclear localization of TRIP12 in several cell lines [7,14] and in human tissues (Human Protein Atlas). It can be explained by the presence of two putative bipartite variants of the classical basically Nuclear Localization Signals (NLS) (aa 73–94 and 136–152) (ELM software (see Section Software and databases)) (Figure 1). The importance of the N-terminal region in the maintenance of TRIP12 nuclear localization was demonstrated in our recent study [7]. Within the nucleus, two studies noted an absence of TRIP12 in the nucleoli [7,15].

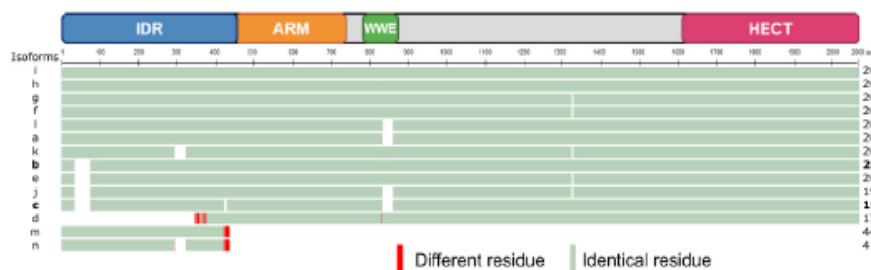


Figure 2. Schematic representation of a multiple alignment of human TRIP12 isoforms using the COBALT multiple alignment tool (see Section Software and databases). TRIP12 isoform i (2068 aa) was defined as the sequence of reference (master sequence). The two most studied isoforms b and c (and size) are written in bold. Residues in green are identical and in red are different. The different domains of TRIP12 are indicated above the alignment.

3. TRIP12 Protein Structure and Domains

TRIP12 is a large protein with an apparent molecular weight estimated between 189 and 227 kDa for the long forms (Table 1). It comprises several characterized protein domains: a catalytic HECT domain, two protein/protein interaction domains (WWE (Tryptophan-Tryptophan-Glutamate) and ARM (Armadillo repeats)), and a recently identified intrinsically disordered region (IDR) (Figure 1). These domains confer structure and functional roles to the protein. TRIP12 protein domains are conserved during evolution and are subject to post-translational modifications that likely modulate its structure and activity. Several studies reported HECT, ARM repeats, and WWE crystal structure of other proteins [16–18]. However, TRIP12 has yet to be recovered in crystal form to establish its complete 3D structure.

3.1. The HECT Domain

HECT domains (≈ 40 kDa) were first identified in the C-terminal part of the viral E6-AP protein; hence their name, Homologous to the E6-AP C-Terminus [2]. They are generally located in the C-terminal extremity of proteins and are constituted of two lobes: N-lobe domains (N-terminal end) and a C-lobe (C-terminal end) linked by a hinge domain [19,20]. The N-lobe is responsible for the interaction with the ubiquitin-conjugating enzyme E2 during the ubiquitination reaction (detailed in Section 4.1). The C-lobe carries the characteristic catalytic cysteine residue [21,22], which is highly conserved between species and essential to the ubiquitination reaction [2]. The TRIP12 HECT domain is located at residues 1552–1592, is structured in N and C-lobes, and contains a cysteine in position 1959 for which the replacement by an alanine residue abolishes TRIP12 ubiquitin ligase activity (Figure 1) [2,23]. Mechanistically, the 28 known HECT E3 ubiquitin ligases form an intermediate complex with ubiquitin before linking it to a lysine substrate via a thioester bond [20].

By ensuring the ubiquitin ligase catalytic activity, the HECT domain allows the implication of TRIP12 in different modes of protein degradation and signaling pathways (detailed in Sections 4 and 5).

3.2. The WWE Domain

A WWE domain is a globular region of ≈ 80 amino acids characterized by an enrichment with hydrophobic and aromatic residues in its two extremities and the conservation of two tryptophan residues (W) and one glutamate (E) [24]. The C- and N-terminal parts of WWE domains form β -sheets, while the central part is an α -helix. WWE domains are required for protein–protein interaction. They are essential for two families of proteins: E3 ubiquitin ligases (HECT, RING, and RING-H2 types) and in a sub-family of poly (ADP-ribose) polymerases (PARP). PARPs add multiple ADP-ribose moieties to protein targets (parylation) and participate in various cellular functions such as DNA repair and chromatin dynamics. The WWE domains were demonstrated as poly(ADP-ribose) (PAR) binding domains [25]. The WWE domain of TRIP12 is located between the residues 749 and 836 (InterProScan) [26] and is required for the interaction of TRIP12 with APP-BP1 (Amyloid Protein-Binding Protein 1) [4], PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a) [6], and parylated PARP1 (Poly-(ADP ribose) polymerase 1) [27] (Figure 1).

3.3. The Armadillo-Repeats Domain

Armadillo (ARM) repeat-containing proteins are characterized by the presence of imperfect tandem repeats of 42 hydrophobic amino acids. An ARM repeat is composed of three α -helices (H1, H2, and H3). Successive ARM repeats are able to assemble themselves to form a super-helix also named a solenoid. As such, ARM-repeat motifs are strongly implicated in protein/protein interactions. ARM repeat-containing proteins are involved in pleiotropic functions (cell/cell adhesion, cell signaling, cytoskeleton organization, nuclear trafficking, and ubiquitination) [28]. ARM repeats were first identified in the TRIP12 orthologues KAKTUS (*Arabidopsis thaliana*) and UFD4 (Ubiquitin Fusion Degradation 4) (*Saccharomyces cerevisiae*) (detailed in Section 4.3) [29,30]. The InterProScan database shows that ARM repeats are also present in the human TRIP12 protein. Slightly different ARM-repeat boundaries are found in this database; we arbitrarily chose to represent the smallest and the most quoted one between residues 437 and 715 (Figure 1). Functional studies demonstrated the role of ARM repeats of UFD4 in the recognition of the ubiquitin degradation signal (detailed in Section 4.3) of the substrates in *Saccharomyces cerevisiae* [30].

3.4. The IDR Domain

Intrinsically disordered regions (IDR) are common in the human proteome, whereby an estimated 44% of the proteome carries an IDR. These regions can be functional but interestingly lack a defined 3D conformation in physiological conditions [31]. The interaction of an IDR-containing protein with a partner can stabilize and/or fold the disordered region into a stable secondary structure. IDRs are

sequences enriched in basic, positively charged, and hydrophilic amino acids such as lysine (K), arginine (R), serine (S), and histidine (H). IDR-containing proteins are mostly involved in protein, DNA, and RNA binding/interaction [32–34]. Moreover, the presence of N-terminal IDRs is linked to DNA interaction [33–35]. We previously showed that TRIP12 interacts with chromatin through an IDR, which corresponds to the N-terminal quarter of the protein (aa 1–440) (Figure 1), and that the deletion of this domain leads to a loss of TRIP12 interaction with chromatin [7]. E3 ubiquitin ligases containing IDR structures are infrequent. Indeed, the IDEAL database (see Section Software and databases) references only 25 E3 ubiquitin ligases containing IDR among the ~600 E3 ubiquitin ligases. According to the IDEAL (Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature) database, TRIP12 IDR displays identity with well-characterized IDR-containing proteins such as MED1 (Mediator Complex Subunit 1, 25% of identity), AF9 (ALL1-Fused gene from chromosome 9, 23% of identity), and AF4/FMR2 (ALL1-Fused gene from chromosome 4/Fragile X Mental Retardation, 22% of identity). Numerous IDR-containing proteins are involved in transcription regulation [36], and these three proteins promote RNA polymerase II catalytic activity by being a coactivator (i.e., MED1) or by being part of the Super Elongation Complex (i.e., AF9, AF4/FMR2) [37,38]. Taken together with the discovery of TRIP12 chromatin interaction, TRIP12 may act as a new transcriptional regulator. Liu et al. described an APC (Adenomatous polyposis coli) domain, which is known to be positively charged and involved in microtubules interaction, within TRIP12 IDR [39]. However, the function of this APC domain was not further explored. It is also now well documented that IDRs can confer to proteins the particular biophysical property of the liquid-liquid phase separation (LLPS) by which two liquids form two different phases such as oil droplets in water [40,41]. This biophysical process was linked to genome organization and expression [42].

3.5. Conservation of TRIP12 Protein Domains during Evolution

TRIP12 orthologues were differently named depending on the species. For example, the TRIP12 orthologue is CTRIP (Circadian TRIP) in *Drosophila melanogaster*, KAKTUS (KAK also known as UPL3), in *Arabidopsis thaliana* (UniProt (see Section Software and databases)) and Ubiquitin Fusion Degradation protein 4 (UFD4) in *Saccharomyces cerevisiae* (UniProt). The size of TRIP12 orthologues also varies per species. The largest form is found in *Drosophila melanogaster* (3140 aa), while the smallest sequence is in *Saccharomyces cerevisiae* (1483 aa) (Figure 3). The TRIP12 amino-acid sequence is highly conserved in vertebrates, demonstrating 82% identity for the zebrafish to 97.7% for the mouse when compared to the human c isoform. This percentage of identity with the human sequence decreases in invertebrates, 38% for *Drosophila melanogaster*, 31.4% for *Arabidopsis thaliana*, 28% for *Schmidtea mediterranea*, and 27.2% for *Saccharomyces cerevisiae*. HECT and ARM-repeats domains are found in all species, whereas the WWE domain is found among all vertebrates and *Schmidtea mediterranea* but not in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. The HECT domain, which is required for polyubiquitination, is present in less evolved species, underlying the importance of E3 ubiquitin ligase activity of TRIP12 during evolution. IDRs are fast evolving regions. Their evolution rate is higher than of structured domains due to the lack of 3D structure [31]. Highly conserved IDRs are often found in proteins involved in transcription regulation and DNA binding [31]. An N-terminal IDR is present in all the TRIP12 orthologues mentioned above. According to IUPred (see Section Software and databases), the TRIP12 IDR length varies from 1,042 aa in *Drosophila melanogaster* CTRIP to 117 aa in *Schmidtea mediterranea*. Vertebrate TRIP12 orthologues showed an IDR average size of 440 residues. Taken together, the high conservation of TRIP12 domains during evolution assumes essential functions for this protein in living organisms.

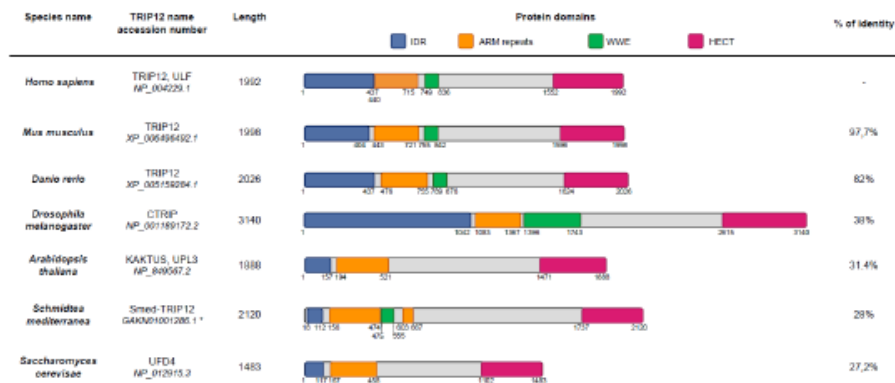


Figure 3. Schematic representation of protein domains in TRIP12 orthologues. Domain boundaries were defined using InterProScan analysis. Percentage of identity was determined by Emboss matcher (see Section Software and databases) pairwise sequence alignment (using *Homo sapiens* TRIP12 protein sequence as reference [43]). *: *Schmidtea mediterranea* cDNA sequence was manually corrected to perform the analysis.

3.6. Post-Translational Modifications of TRIP12

Similar to many other proteins, TRIP12 is post-translationally modified. The PhosphoSitePlus[®] database (see Section Software and databases) provides an exhaustive list of the post-translationally modified residues identified by mass spectrometry and other approaches (Figure 4). Among the modifications, the most abundant are the phosphorylation and the ubiquitination. TRIP12 can also be acetylated and mono-methylated. TRIP12 IDR is subject to abundant post-translational modifications, since it is a common feature of IDR domains [31], which is in contrast to the ARM repeats-domain that is poorly modified. Only few phosphorylation sites were attributed to specific kinases such as the serine S424, S1078, and S1577 to the kinases CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1), CHK1 (Checkpoint Kinase 1), and ATM/ATR (Ataxia-Telangiectasia-Mutated/Ataxia Telangiectasia and Rad3-related), respectively [44–46] (Figure 1). Despite two independent studies that reported the ubiquitination of TRIP12 [47,48] and numerous identified ubiquitinated residues, the ubiquitin ligases responsible for TRIP12 ubiquitination are unknown. Moreover, we cannot exclude that TRIP12 may exhibit functions of self-ubiquitination. It was demonstrated that the Ubiquitin-Specific Peptidase USP7 deubiquitinates and stabilizes the TRIP12 protein [47,48]. Despite numerous studies dedicated to TRIP12, none of the post-translational modifications are shown to function in the regulation of catalytic activity, interacting capacity, nor in the cellular localization of this E3 ubiquitin ligase.

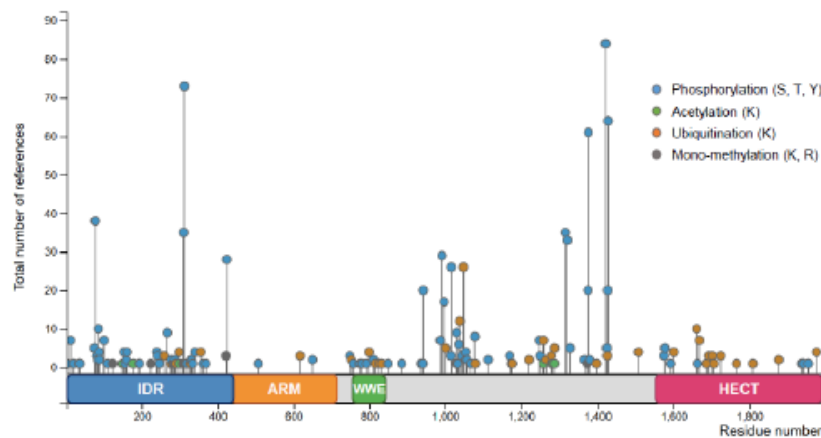


Figure 4. Post-translational modifications of TRIP12 (isoform c) adapted from PhosphoSitePlus[®] (see Section Software and databases). Total number of references represents the number of records in which this modification site was assigned using proteomic discovery mass spectrometry and using other methods. S stands for serine, T stands for threonine, Y stands for tyrosine, and K stands for lysine.

4. Functions of TRIP12 in Ubiquitin-Mediated Proteolysis

A detailed description of ubiquitination process, different ubiquitin ligase families, and functions are excellently reviewed elsewhere [20,49–51]. In this section, we will provide an overview of the essential information on TRIP12 actions in ubiquitin-dependent proteolytic pathways.

4.1. Ubiquitination

Ubiquitination is an essential ATP-requiring process leading to protein modification by the covalent conjugation of ubiquitin, which is a highly conserved 76 aa polypeptide (≈ 8.5 kDa) [49]. Although best known for targeting proteins to degradation by the 26S proteasome, ubiquitination is potentially linked to all cellular processes. Canonical ubiquitin conjugation involves the attachment of the C-terminal glycine 76 (G76) of ubiquitin (Ub) to the ϵ -amino group of a lysine on the protein substrate. Substrates can be either modified by a single ubiquitin on one (monoubiquitination) or more sites (multi-mono-ubiquitination) or by chains of ubiquitin [51]. In the case of poly (or multi) Ub chains, the C-terminal G76 of one Ub molecule is linked to the ϵ -NH₂ group of one of the seven lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, or K63) of the preceding ubiquitin. The poly-Ub chains can have different lengths and topologies resulting in different consequences on the fate of the modified protein substrate. For instance, K48-linked polyubiquitination primes proteins for proteolytic destruction by the proteasome, whereas non-K48 linkages target proteins for various cellular functions and responses [50,51].

Ubiquitination is ensured by a three step-concerted action of three enzymes. An Ub-activating enzyme (E1) catalyzes the formation of a thio-ester linkage between the C-terminal lysine G76 of Ub and the active cysteine (C) residue of E1; the Ub molecule is transferred to the cysteine of the Ub-conjugating enzyme (E2). E3 ligases are classified into three major classes, the RING (Really Interesting New Gene), the RBR (RING-between RING-RING), and the HECT ligases. For HECT and RBR E3 ligases, the transfer of Ub to the substrate lysine-amino group involves a thioester intermediate with a conserved cysteine in the catalytic site of the HECT domain or the Rcat domain, respectively [20]. The RING E3 ligases catalyze the direct transfer of ubiquitin from a thioester-linked E2-ubiquitin conjugate to a substrate [20]. In some cases, the cooperation of an additional E4 ubiquitin ligase, which may encode for independent ligase activity or enhance the processivity of the E3, is required.

To act as catalysts, E3s recruit their substrates for degradation by recognizing a specific portion in the protein sequence or degron. Ubiquitin conjugation can be reversed by deubiquitinating enzymes (DUBs) [52].

4.2. Known TRIP12 Substrates

Based on the literature, TRIP12 regulates the stability and promotes the proteolysis of nine protein substrates: ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1) [53], USP7 (Ubiquitin-Specific Peptidase 7) [39], PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a) [6], SOX6 (SRY-Box Transcription Factor 6) [12], RNF168 (Ring Finger Protein 168) [14], BAF57 (BRG1-Associated Factor 57) also known as SMARCE1 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin-Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily E, Member 1) [54], P14/ARF (P14/Alternate Reading Frame) also known as CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), for which TRIP12 was named ULF (Ubiquitin Ligase for ARF) [15], APP-BP1 (Amyloid Protein-Binding Protein 1) also known as NAE1 (NEDD8-Activating Enzyme E1 Subunit 1) [4] and PARP1 (Poly-(ADP ribose) polymerase 1) [27]. These proteins exert important functions in biological and/or pathological processes that will be outlined in Section 5.

The TRIP12 HECT domain (detailed in Section 3.4) is essential for the degradation of these proteins, but the role of TRIP12 as direct interacting E3 ligase is still questionable for ASXL1 [53] and RNF168 [14] for which experimental approaches that prove ubiquitination by TRIP12 are lacking. TRIP12 polyubiquitinates its substrates with the exception of APP-BP1, which is monoubiquitinated [4]. APP-BP1 polyubiquitination requires an additional E4 activity [4]. TRIP12 mediated-K48-linked polyubiquitination was demonstrated only for USP7 [39] and PTF1a [6]. While the interaction between the E3 ligase and its substrates was validated, the interaction domains of TRIP12 have been mapped only in few cases. Although these studies used different isoforms of TRIP12, they all emphasize the role of consensus protein/protein interaction domains of TRIP12. A region (aa 611–1259 of isoform c) that includes the WWE domain but not ARM repeats is responsible for the interaction with APP-BP1 [4]. A sequence of 577 aa (aa 234–810 of isoform a) preceding the WWE domains interacts with USP7 [39]. In addition, TRIP12 interacts with polyubiquitinated PARP1 via its WWE (aa 797–911 of isoform a) domain. TRIP12 is freshly considered as an identified PAR-targeted ubiquitin ligase (PTUbl) controlling PARP1 turnover [27]. Finally, we demonstrated that PTF1a binds a region containing ARM repeats and the WWE domain (aa 446–1552 of isoform c) [6].

Interacting domains or ubiquitinated residues were identified for certain proteins regulated by TRIP12. A sequence of 80 aa within and flanking the central coiled-coil region of BAF57 was found to be critical for BAF57 stabilization and to contain lysine residues essential for ubiquitination [55]. The N-terminal part of Tumor necrosis factor-receptor associated factor (TRAF), also known as the Meprin And TRAF-C Homology (MATH) domain of USP7, is responsible for its interaction with TRIP12 [39]. We found that the lysine 312 of PTF1a is essential for its TRIP12-mediated degradation [6]. It was previously reported that the tumor suppressor ARF is a natural lysine-less protein that undergoes N-terminal polyubiquitination [56].

Intriguingly, TRIP12 targets several proteins that are unbound to their physiological binding partners. This is the case for BAF57, which is a subunit of the SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) chromatin remodeling complex (detailed in Section 5.4.) [54]. Most if not all SWI/SNF subunits are assembled into a complex for which maintenance of the stoichiometry is essential and no free subunits exist in the cell; otherwise, they are degraded. The stabilization and protection of BAF57 from proteasome-mediated degradation operates via protein-protein interaction with the BAF155 subunit [57]. TRIP12 was demonstrated to compete with BAF155 for BAF57 and to degrade only an unbound form of BAF57 [55]. The same type of interaction was found for the ubiquitination of the neddylation E1 enzyme subunit APP-BP1 [4]. In fact, TRIP12 does not interact with APP-BP1 in the heterodimeric form bound to Uba3 (Ubiquitin-Like Modifier-Activating Enzyme 3), which is the specific active E1 of the NEDD8 pathway. A similar scheme is described for ARF, which is stabilized and protected from TRIP12 ubiquitination when sequestered by nucleophosmin and

TRADD (NFR1-Associated Death Domain Protein) in the nucleolus (detailed in Section 5.2.) [15,58]. Indirect evidence suggests a similar mode of action for the degradation of RNF168 [14]. Indeed, the destabilization of RNF168 induced by a silencing of its binding partner HERC2 (HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2) could be mitigated by a depletion of TRIP12. The TRIP12-ubiquitinated lysine 312 of PTF1a is located near the domain interacting with RBP (mammalian suppressor of Hairless) essential for the transcriptional activity of PTF1a. One may hypothesize that free PTF1a could be ubiquitinated, while binding to RBP could prevent TRIP12-mediated PTF1a degradation. Therefore, TRIP12 appears as a regulator of the balance between bound and unbound forms of its protein substrates to maintain them in their complexed forms.

4.3. Role of TRIP12 in Ubiquitin Fusion Degradation and N-Degron Pathways

TRIP12 is sequeologous to the UFD4 HECT E3 ligase, which catalyzes the ubiquitination of Ubiquitin Fusion Degradation (UFD) substrates in yeast [59]. These substrates are artificial fusion proteins consisting of an N-terminal uncleavable ubiquitin moiety that acts as a degron. The UFD pathway consists in the poly-ubiquitination of the uncleavable N-terminal ubiquitin. TRIP12 was shown to mediate the degradation of the aberrant form of ubiquitin named UBB⁺¹ [60]. UBB⁺¹ is a physiological human UFD substrate resulting from a dinucleotide deletion in the mRNA of the ubiquitin B gene. UBB⁺¹ accumulates in the brain in neurodegenerative disorders [61]. The HECT E3 HUWE1 (HECT, UBA, and WWE domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1) was reported to cooperate with TRIP12 for the degradation of UBB⁺¹ [62]. Although the conservation of the UFD pathway from yeast to human attests its importance for proteolysis in cells, except for UBB⁺¹, no other native substrates have been identified. Most studies use artificial substrates for specific applications. In particular, enhanced immune response after UFD ubiquitination of antigens opens up interesting perspectives in the development of tumor vaccines [63].

The N-degron pathway (formerly N-end rule pathway) is another ubiquitin-dependent proteolytic pathway that regulates the half-life of proteins according to N-terminal degradation signals or N-degrons. UBR1, UBR2, UBR4, and UBR5 (ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin) are the four E3s (or N-recognins) encoded by the mammalian genomes that can recognize Arg/N-degrons [64]. Interestingly, a study demonstrated that UBR1 and UFD4 E3s interact and cooperate to enhance substrate ubiquitination in both pathways in yeast [65]. This mutually cooperative physical interaction between E3s operating in parallel pathways are likely to be relevant to all eukaryotes and might apply to TRIP12 and UBR5 control of RNF168 accumulation [14].

5. The Physio-Pathological Roles of TRIP12

Proteomic approaches have allowed for the identification of several TRIP12 binding partners (Figure 5 and Table 2). However, the molecular function of only a restricted number of these interactions is known. Thus far, TRIP12 was implicated in the regulation of several important molecular pathways such as cell cycle progression, DNA damage repair (DDR), chromatin remodeling, and cell differentiation via a small number of identified protein interactors, which leaves wide open the field of investigation of molecular processes implicating TRIP12.

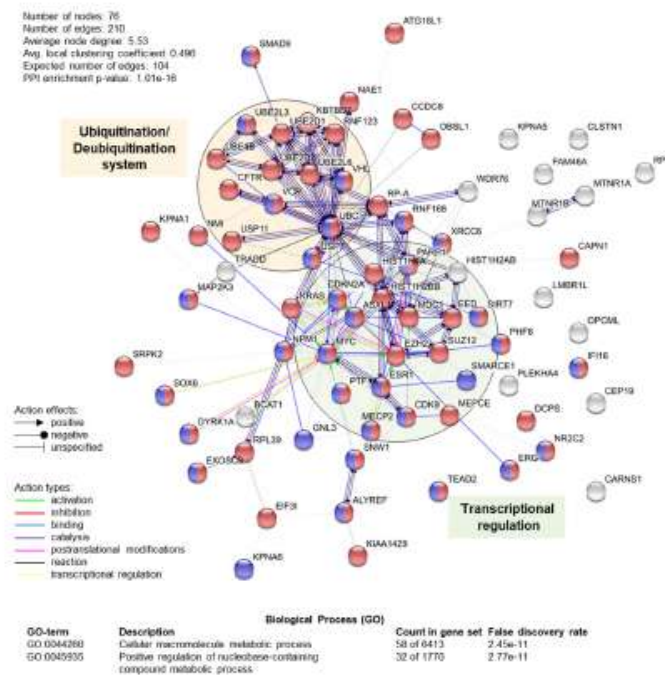


Figure 5. Schematic representation of human TRIP12-interacting protein–protein network ($n = 76$) and functional enrichment analysis using STRING software (see Section Software and databases). Network nodes represent proteins. Red nodes represent proteins belonging to cellular macromolecule metabolic process (GO term: 0044260), and purple nodes represent proteins belonging to the positive regulation of the nucleobase-containing compound metabolic process (GO-term: 0045935). Edges represent protein–protein molecular actions (indicated in the figure). Line shape indicates the predicted mode of action (indicated in the figure). Active interaction sources: text mining, experiments, database, co-expression, neighborhood and co-occurrence. Minimum required interaction score: medium confidence (0.400). Green and orange filled circles indicate proteins implicated in “transcriptional regulation” and “ubiquitination/deubiquitination system”, respectively.

Table 2. List of the different protein interactors of human TRIP12.

#	Interactor Gene	Interactor Name	Bait and/or Hit	Interaction Detection Method	Interaction Type	References
1	ALYREF	Aly/REF export factor	bait	aff tech	co-localization	[66]
2	ASXL1	Additional Sex Combs-Like Protein 1	bait	biochemical	ph ass	[53]
3	ATG16L1	Autophagy-related protein 16 like 1	bait	aff tech	ph ass	[67]
4	BCAT1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	bait	ph ass	ph ass	[68,69]
5	CAPN1	Calpain-1 catalytic subunit	bait	aff tech	ph ass	[69]
6	CARNS1	Carnosine synthase 1	bait	two hybrid	dir int	[70]
7	CCDC8	Coiled-coil domain-containing protein 8	bait	aff tech	ph ass	[71]
8	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9	bait, hit	aff tech	ph ass	[72]
9	CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/p14ARF	bait	aff tech, pd, ph ass	ph ass, dir int, ph int	[15,58,73–75]
10	CEP19	Centrosomal protein of 19 kDa	bait	bioid	ph ass	[76]
11	CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	bait	aff tech	ph ass	[77]
12	CLSTN1	Calsynenin-1	bait	two hybrid	dir int	[70]
13	DCPS	Decapping scavenger enzyme	bait	aff tech	ph ass	[78]
14	DYRK1A	Dual specificity Tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	bait	aff tech	ph ass	[79]
15	EED	Embryonic ectoderm development protein	bait	aff tech	ph ass	[80]
16	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	bait	aff tech	ph ass	[68,69]
17	ERG	Transcriptional regulator ERG	bait	pd	dir int	[81]
18	ESR1	Estrogen receptor alpha	bait	aff tech	ph ass	[82]
19	EXOSC9	Exosome complex component RRP45	bait	aff tech	ph ass	[83]
20	EZH2	Histone-lysine N-methyltransferase	bait	aff tech	ph ass	[84]
21	FAM46A	HBV X-transactivated gene 11 protein)	bait	aff tech	ph ass	[83]
22	GNL3	Guanine nucleotide-binding protein-like 3/Nucleostemin	hit	aff tech	ph ass, dir int, ph int	[75]
23	HIST1H2AB	Histone H2A	bait	aff tech	ph ass	[85]
24	HIST1H2BB	Histone H2B	bait	aff tech, bioid	ph ass	[85,86]
25	HIST1H4A	Histone H4	bait	aff tech	ph ass	[85,87]
26	IFI16	Gamma-interferon-inducible protein 16	bait	aff tech	ph ass	[88]
27	KBTBD7	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 7	bait	aff tech	ph ass	[69]
28	KIAA1429	Protein virilizer homolog	bait	aff tech	ph ass	[89]
29	KPNA1	Importin subunit alpha-5 (Karyopherin subunit alpha-1)	hit	aff tech	ph ass	[90]
30	KPNA5	Importin subunit alpha-6 (Karyopherin subunit alpha-5)	hit	aff tech	ph ass	[90]
31	KPNA6	Importin subunit alpha-7 (Karyopherin subunit alpha-6)	hit	aff tech	ph ass	[90]
32	KRAS	GTPase KRas	bait	aff tech	ph ass	[91]
33	LMBRL1	Limb development membrane protein 1-like	bait	aff tech	ph ass	[92]
34	MAP2K3	Dual specificity mitogen-activated protein kinase 3	bait	aff tech	ph ass	[91]
35	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	bait	aff tech	ph ass	[93]
36	MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2	bait	aff tech	ph ass	[69]

Table 2. Cont.

#	Interactor Gene	Interactor Name	Bait and/or Hit	Interaction Detection Method	Interaction Type	References
37	MEPCE	7SK snRNA methylphosphate capping enzyme	bait	aff tech	ph ass	[72]
38	MTNR1A	Melatonin receptor type 1A	bait	two hybrid	dir int	[94]
39	MTNR1B	Melatonin receptor type 1B	bait	two hybrid	dir int	[94]
40	MYC	Myc proto-oncogene protein	bait, hit	aff tech, pd	ph ass, dir int	[15,95]
41	NAE1	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit/APP-BP1	hit	aff tech, enz study	ph ass, dir int	[4]
42	NMI	N-myc-interactor	bait, hit	aff tech, pd	ph ass, dir int	[74]
43	NPM	Nucleophosmin	bait, hit	aff tech, pd	ph ass, dir int	[96]
44	NR2C2	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	bait	aff tech	ph ass	[97]
45	OBSL1	Obscurin-like protein 1	bait	aff tech	ph ass	[71]
46	OPCML	Opioid-binding protein/cell adhesion molecule	bait	aff tech	ph ass	[69]
47	PARP1	Poly-(ADP Ribose) polymerase 1	bait, hit	aff tech, pd, enz study	ph ass, dir int	[27]
48	PHF8	Histone lysine demethylase	bait	aff tech	ph ass	[83]
49	PLEKHA4	Peckstrin homology domain containing, family member 4	bait	aff tech	ph ass	[98]
50	PTF1A	Pancreas transcription factor 1 subunit alpha	bait, hit	aff tech, FRET, two hybrid	ph ass, dir int, dir int	[6]
51	RNF123	E3 ring finger ubiquitin ligase 123	bait	aff tech	ph ass	[99]
52	RNF168	E3 ring finger ubiquitin ligase168	bait	aff tech	ph ass	[14]
53	RP2	Protein XRP2	bait	aff tech	ph ass	[68,69]
54	RPA	Replication protein A	bait	aff tech	ph ass	[100]
55	RPL39	60S ribosomal protein L39	hit	aff tech	ph ass	[90]
56	SIRT7	Sirtuin 7	bait	aff tech	ph ass	[101]
57	SMAD9	SMAD family member 9	bait	two hybrid	dir int	[102]
58	SMARCE1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1/BAF57	bait	aff tech	ph ass	[54]
59	SNW1	SNW domain-containing protein 1	bait	aff tech	ph ass	[103]
60	SOX6	Transcription factor SOX-6	bait, hit	enz study, aff tech, two hybrid	dir int, ph ass	[12]
61	SRPK2	SRSF protein kinase 2	bait	enz study	dir int	[104]
62	SUZ12	Polycomb protein SUZ12	bait	aff tech	ph ass	[84]
63	TEAD2	Transcriptional enhancer factor TEF-4	bait	aff tech	ph ass	[105]
64	TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain	bait, hit	aff tech	ph ass	[58]
65	UBC	Ubiquitin-C	bait, hit	enz study, aff tech	dir int, ph ass	[60,106,107]
66	UBE2D1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1	hit	pd	dir int	[4,12,60,108]
67	UBE2D2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2	bait	pd	dir int	[109]
68	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	bait, hit	pd	dir int	[108,109]
69	UBE2L6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L6	bait	aff tech	ph ass	[91]
70	UBE4B	Ubiquitin conjugation factor E4 B	bait	pd	dir int	[4]

Table 2. Cont.

#	Interactor Gene	Interactor Name	Bait and/or Hit	Interaction Detection Method	Interaction Type	References
71	USP7	Ubiquitin-specific-peptidase 7	bait, hit	aff tech, ph ass	ph ass	[39,48,110,111]
72	USP11	Ubiquitin-specific peptidase 11	bait	aff tech	ph ass	[110]
73	VCP	Valosin-containing protein	bait	aff tech	ph ass	[112]
74	VHL	von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase	bait	aff tech	ph ass	[83]
75	WDR76	WD repeat-containing protein 76	bait	aff tech	ph ass	[85]
76	XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein	bait	bioid	ph ass	[113]

Human TRIP12 protein interactors based on Biogrid database (see Section Software and databases) and the literature. Interactors in bold ($n = 9$) were further characterized as TRIP12 ubiquitinated substrates. Proteins used to capture protein complexes in which TRIP12 was identified were designated as “bait”. Hits are proteins detected only in the immunoprecipitation (IP) of the TRIP12 protein but not in a vector control IP. Aff tech: affinity techniques, bioid: biotin identification, dir int: direct interaction, enz study: enzymatic study, FRET: fluorescence resonance energy transfer, pd: pull down, ph ass: physical association and ph int: physical interact.

5.1. TRIP12 Protein Interactors

According to BioGrid resources (see Section Software and databases) and the literature, 76 unique proteins interact with human TRIP12 (Table 2). They were identified by different experimental approaches using either these proteins ($n = 58$), either TRIP12 ($n = 7$) or both as bait ($n = 11$). Among them, eight were further classified as TRIP12-ubiquitinated substrates (detailed in Section 4.2). A STRING protein-protein network and functional enrichment analyses (see Section Software and databases) reveals that 76% (58 out of 76) are implicated in cellular macromolecule metabolic process (red circles), which corresponds to proteins involved in the adding of low molecular mass protein units (i.e., ubiquitin) (Figure 5). In parallel, 42% (32 out of 76) are involved in the positive regulation of nucleobase-containing compound metabolism (purple circles), which corresponds to cellular processes that activate chemical reactions/pathways involving nucleic acid-related compounds. Moreover, we can clearly distinguish two protein-protein functional clusters including proteins involved in transcriptional regulation (i.e., PTF1a, EZH2, SUZ12, etc.) and in the ubiquitination/deubiquitination system (i.e., USP7, VHL, USP11, etc.). However, it is important to keep in mind that all the interactions of the TRIP12 with protein partners might depend on the type of cells, the stage of differentiation, or the cell cycle phase. Altogether, these analyses position TRIP12, via its interacting partners, as a potential central regulator of protein stability and genome expression.

5.2. Roles in Cell Cycle Progression

The P53 dependent-activating P14/ARF (P14/Alternative Reading Frame also known as CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)) pathway plays a major activating role in cell cycle progression. Chen et al. identified TRIP12 as the E3 ubiquitin ligase responsible for the degradation of ARF and renamed it ULF for Ubiquitin ligase for ARF [96]. TRIP12 decreases the stability of ARF after polyubiquitination and degradation by the proteasome. This leads to a proteasome-mediated destabilization of P53 by the E3 ubiquitin ligase MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) and a cell cycle progression (Figure 6, left panel). The authors further showed the relationship between TRIP12 and two positive regulators of ARF: the nucleophosmin (NPM), a major component of nucleoli, and the transcription factor c-MYC. They reported that NPM sequesters ARF in the nucleoli, isolating it from the ubiquitinating action of TRIP12 present only in the nucleoplasm (Figure 6, left panel). Then, they demonstrated that c-MYC enhances the ARF half-life by destabilizing the TRIP12/ARF nucleoplasmic complex (Figure 6, right panel). Therefore, the interaction of ARF with MDM2 prevents the ubiquitination-mediated degradation of P53, which in turn, induces a cell cycle arrest and apoptosis [114]. Later, the nucleostemin (also known as Guanine nucleotide-binding protein-like 3) was demonstrated to stabilize the NPM/ARF complex in the nucleoli and to destabilize the TRIP12/ARF complex in the nucleoplasm to inhibit ARF degradation by TRIP12 ubiquitination [75]. The translocation of TRADD (TNF-R Associated Death Domain Protein) from the cytoplasm to the nucleus was also shown to protect ARF from degradation by inhibiting its interaction with TRIP12 [58]. The participation of TRIP12 in cell cycle progression was assessed in non-cancerous cells subject to an oncogenic stress provoked by an overexpression of c-MYC [115]. Paradoxical properties of c-MYC overexpression have been reported in oncogenic processes [116]. Indeed, a mild expression of c-MYC stimulates cell proliferation, whereas a strong overexpression inhibits cell proliferation by activating the ARF/P53 response. In both cases, ARF mRNA levels were induced. However, the authors demonstrate that only a high concentration of c-MYC is able to inhibit the degradation of ARF mediated by TRIP12, which in turn leads to the activation of the ARF/P53 pathway and cell cycle arrest. Moreover, Kajiro et al. generated TRIP12 knock-in mutant mice by homozygous mutation in *TRIP12* exon 33 (*TRIP12^{mt/mt}*) disrupting the ubiquitin ligase activity [5]. This resulted in embryonic lethality at the embryonic stage E11.5. *TRIP12^{mt/mt}* ES cells exhibited a significant decrease of growth rate caused by the abnormal induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor P16 and ARF associated to a P53 protein increased stability. *TRIP12^{mt/mt}* ES cells also display an abnormal accumulation in G₂/M and sub-G₁ phases. These data support that TRIP12 functions in the cell cycle control in vivo.

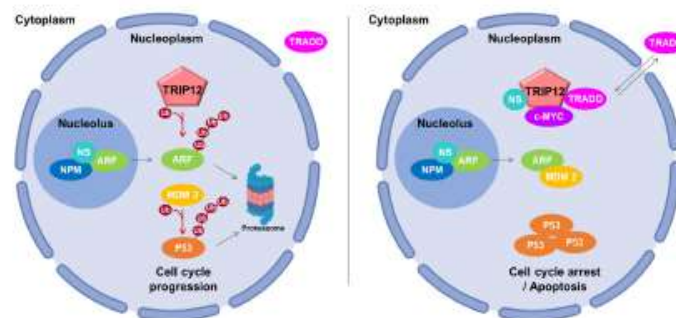


Figure 6. Schematic representation of TRIP12, ARF, and P53 pathway. On the left, TRIP12 controls ARF and indirectly P53 ubiquitination degradation by proteasome, while TRIP12 participates in cell cycle progression [58,75,96,115]. On the right, ARF is protected from TRIP12 when bound to nucleophosmin (NPM)/nucleostemin (NS) and localized in the nucleolus. Moreover, in the nucleoplasm, TRIP12 is sequestered by different proteins (in the presence of NS or TRADD and in high level c-MYC condition), blocking its interaction with ARF. ARF binds and inhibits MDM2, which leads to P53 accumulation and cell cycle arrest.

TRIP12 is tightly implicated in the control of cell cycle progression. Until very recently, little was known on cell cycle regulation of TRIP12 expression. We showed that the presence of TRIP12 in the nucleus strongly depends on the phase of the cell cycle. The TRIP12 protein appears in the nucleus in the late S phase and endures during the G₂ phase [7]. We found that while tightly bound to the chromosomes during mitosis, TRIP12 is rapidly degraded in the early G₁ phase and disappears in the nucleus in the late G₁ and early S phase. We further demonstrated that TRIP12 plays a role in phase S by controlling DNA replication timing. Via its chromatin-interacting IDR, TRIP12 coordinates mitotic entry and progression [7]. The important function of TRIP12 during mitosis was reinforced by mass spectrometry-based approaches showing that TRIP12 is specifically retained to mitotic chromatin [117]. With regard to variations to TRIP12 expression during the cell cycle, it would be important to reconsider TRIP12 molecular functions according to its presence or absence from the nucleus.

5.3. Roles in DNA Damage Response

5.3.1. Via the ARF/P53 Signaling Pathway

Oncogenic stimuli trigger the activation of checkpoints that delay or prevent tumorigenesis. The DNA damage repair (DDR) pathway and ARF protein are two major checkpoints that both act by the protein P53. Initially studied independently, the interconnection between these two checkpoints in tumorigenesis is gaining notoriety. For example, Velimezi et al. discovered that the key DDR kinase ATM negatively regulates the abundance of ARF with the implication of TRIP12 [118]. In response to DNA damage, the kinase ATM activates the protein phosphatase 1 (PP1), which in turn, dephosphorylates the nucleolar protein NPM (Figure 7). This dephosphorylation liberates ARF from NPM, rendering it susceptible to degradation via the action of TRIP12 in the nucleoplasm. Chen et al. further reported the contribution of TRIP12 in ARF degradation in response to DNA damage induced by doxorubicin [115]. The data showed that after DNA damage, the degradation of ARF is strongly attenuated in TRIP12 knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Another study identified the serine S1577 of TRIP12 (Figure 1) as phosphorylated by the kinases ATM/ATR, which suggests that post-translation modifications are possibly critical for a proper implication of TRIP12 in the DDR network [45].

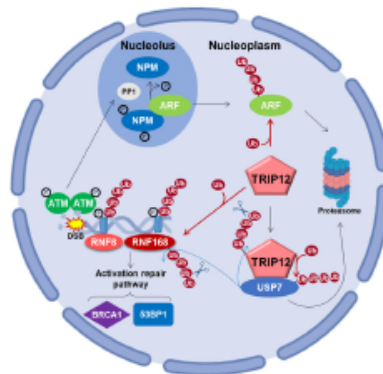


Figure 7. Schematic representation of TRIP12 in the DNA damage repair (DDR) pathway in response to DNA double-strand break (DSB) [14,39,115,118–121]. In response to double-strand breaks (DSB), ATM, RNF8, and RNF168 are recruited on the damage and trigger the propagation of the ubiquitination of H2A and H2AX far from the initial DNA lesions. TRIP12 controls the nuclear pool of RNF168 for the ubiquitination of chromatin after DNA disruption. Indeed, TRIP12 ubiquitinates and induces the degradation of RNF168 by the proteasome. TRIP12 controls Ubiquitin-Specific Peptidase 7 (USP7) ubiquitination, which in turn stabilizes it.

5.3.2. Via the Control of Histone Ubiquitination Spreading by RNF168

Histone ubiquitination plays a crucial role in the recruitment of proteins responsible for the detection and the repair of DNA damage. The E3 ubiquitin ligase RNF8 (Ring Finger Protein 8) initiates the ubiquitination of histones H2A and H2AX at the damaged sites (Figure 7) [119]. This priming of ubiquitination reaction is amplified by another E3 ubiquitin ligase, RNF168. The produced polyubiquitination (K63 chain) acts as a platform for the interaction of repair signaling factors, such as 53BP1 and the complex RAP80/BRCA1 (Receptor-Associated Protein 80/Breast Cancer 1) [122]. If not properly controlled, RNF168 over-amplifies the ubiquitination signal beyond the DNA breakage on neighboring chromatin, which can have dreadful consequences, notably by sequestering the genome keepers 53BP1 (P53 Binding Protein 1) and BRCA1. The retention of 53BP1 and BRCA1 at a non-damaged DNA site prevents their recruitment at damaged DNA sites and subsequent repair. It was shown that TRIP12 and UBR5 are two proteins that prevent this over-amplification after the DNA damage induction of double-strand break (DSB) [14]. In physiological conditions, TRIP12 and UBR5 control the quantity of RNF168 required to restrain histone ubiquitination around DNA lesions (Figure 7). A depletion of TRIP12 and UBR5 provokes an accumulation of RNF168 to supra-physiological levels that amplifies histone ubiquitination beyond the DSB sites. Moreover, TRIP12 was demonstrated as the E3 ubiquitin ligase implicated in the stability of RNF168.

5.3.3. Via the Deubiquitinase USP7

It is accepted that the deubiquitinase USP7 plays a major role in the response of DNA damage by stabilizing the expression of key proteins such as P53 and RNF168 [120,121]. TRIP12 interacts with USP7 and polyubiquitinates (K48 chain) it to induce its degradation by the proteasome (Figure 7) [39]. Consequently, the TRIP12-mediated degradation of USP7 affects the stability of 53BP1 and CHK1 proteins, which are two important regulators of DDR regulated by USP7. Importantly, as mentioned in Section 3.6, the TRIP12 protein is also stabilized by USP7, suggesting a relevant interconnected feedback between these proteins. Taken together, these studies show that TRIP12 and USP7 mutually control their expression level. In addition, they both regulate the expression level of RNF168, which is

a key factor in DSB repair. This indicates that a fine-tuning of these three enzymes is certainly required to ensure a proper managing of DNA damage repair via RNF168 quantity control.

5.4. The Roles of TRIP12 in Chromatin Remodeling

5.4.1. Via the Control of SWI/SNF Complex Integrity

The level of chromatin compaction participates in highly dynamic processes such as transcription, DNA repair, and recombination. When the chromatin is compacted, genes are globally transcriptionally inactive due, in part, to a low accessibility of the transcriptional machinery to promoters [123]. The modification of chromatin compaction and consequently the modulation of transcriptional activity is partially controlled by the SWI/SNF complex [124]. It is a multi-protein complex constituted by a dozen sub-units. The sub-units BRG1 (hSWI/SNF Brahma-related Gene) and BRM-1 (BRachyury Modifier 1) ensure the ATPase catalytic activity. The function of the SWI/SNF complex is to remodel nucleosome positioning by sliding, inserting, or ejecting histone octamers into DNA in an ATPase-dependent manner. As such, it controls numerous cellular processes [125]. To reach an optimal efficiency, the SWI/SNF complex requires the presence of BAF proteins (BRG-1 associated factors), which interact with BRG-1. Therefore, the regulation of expression of BAF proteins by proteasome-dependent degradation is crucial. It was demonstrated that TRIP12 is the main E3 ubiquitin ligase that polyubiquitinates the free cellular pool of BAF57 (also known as SMARCE1 (SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member)) by a mechanism that we described in Section 4.2. [54]. Therefore, TRIP12 appears to be involved in a protein quality control system of the SWI/SNF complex. The TRIP12 mediated-degradation of BAF57 could affect the loading of SWI/SNF on its target genes and consequently disturb gene expression.

5.4.2. Via the Maintenance of Silenced Genes by the Polycomb Complex

Epigenetic modifications of DNA bases play a crucial role in the control of gene transcription. Most of these modifications were first identified in prokaryotes and then in higher eukaryotes. The methylation of the nitrogen atom in position 6 of an adenine (6mA) is the most frequent modification in prokaryotes. This modification was recently described in eukaryotes and particularly in vertebrates [126]. In mammals, the methyltransferase METTL4 (Methyltransferase Like 4) and the dioxygenase ALKBH4 (ALKB Homolog 4, Lysine Demethylase) are responsible for the deposit and the suppression of the 6mA on DNA, respectively [53]. In mammals, the 6mA is associated with epigenetic repressive marks such as the mono-ubiquitination on the K119 of histone H2A (K119 Ub-H2A) and the trimethylation on K27 of histone H3 (K27me3-H3). These repressive marks are used for silencing promoters during the stem cells differentiation and embryonic development. They are mainly added on the chromatin by the Polycomb Repressive Complexes (PRC1 and PRC2) [127,128]. These two marks are reversible. The K119 Ub-H2A is removed by the deubiquitinase complex PR-DUB (Polycomb Repressive-Deubiquitinase complex) formed by the proteins ASXL1 (Additional Sex Combs like 1) and BAP1 (BRAC1 Associated Protein 1) [129]. The BAP1 protein bears the deubiquitinase activity, and it is stabilized by ASXL1 [130]. Mass spectrometry based-proteomic analyzes identified the protein-protein interaction between TRIP12 and major components of PRCs such as SUZ12 (Polycomb protein SUZ12), EZH2 (Histone-lysine N-methyltransferase) [84] and EED (Embryonic Ectoderm Development protein) [80] but with no mechanistic findings. A recent study characterized the role of 6mA deposit and the implication of the E3 ubiquitin ligase TRIP12 in the maintenance of the repressive marks added by the Polycomb complex [53]. The addition of 6mA on PRC1/PRC2-inactivated genes leads to the recruitment of the PR-DUB complex. This recruitment on the chromatin leads to the degradation of the complex by TRIP12-mediated polyubiquitination of ASXL1 (discussed in Section 4.2.) and preserves the level of K119 Ub-H2A. A homozygous deletion of the *METTL4* gene in a murine model induces a decrease of 6mA deposit and provokes a craniofacial dysmorphism in a subset of pups. Interestingly, de novo nonsense mutations of the *ASXL1* gene were identified in patients

with Bohring–Opitz syndrome who display facial dysmorphism [131]. In humans, mutations of the *TRIP12* gene are also associated to craniofacial dysmorphism (detailed in Section 6.1). Therefore, we can speculate that an inactivation of *TRIP12* could provoke an accumulation of ASXL1 and a stabilization of the PR-DUB complex that would subsequently alter the expression of genes implicated in facial development.

5.5. Roles in Cell Differentiation

Different studies have proven the strong involvement of *TRIP12* in the cell differentiation. Differentiation is the process by which dividing cells change their functional or phenotypical type. It involves the coordinated regulation of genes by a multitude of cellular pathways. The first study showing the participation of *TRIP12* in stem cells and regeneration mechanisms was performed in the freshwater planarian *Schmidtea mediterranea* [132]. *Schmidtea mediterranea* is a model for regeneration, stem cells, and the development of tissues. This worm is able to replace cell loss during normal cellular turnover or tissue loss through the regenerative capacity of adult stem cells called neoblasts. The authors demonstrated that 11 genes of HECT E3 ubiquitin ligases were expressed in neoblasts. Using RNA interference (RNAi), the authors showed that the *TRIP12* orthologue also known as “*smed-TRIP12*” is essential for the establishment and the maintenance of posterior tissues.

TRIP12 displays another important function in the control in muscle fiber homeostasis. An et al. showed that the transcription factor SOX6 (SRY-Box Transcription Factor 6) is a target of *TRIP12* in mammals. SOX6 is involved in muscle fiber homeostasis by the transcriptional repression of “slow switch muscle fiber” genes in fetal mice [133]. They showed that a *TRIP12* knockdown in myotubes-derived cell lines leads to an increase of SOX6 protein levels and results in a dysregulation of muscle fiber homeostasis. *TRIP12* binds to SOX6 protein, inducing its polyubiquitination and its degradation by the proteasome [12].

TRIP12 is also implicated in the homeostasis of pancreatic epithelial cells. We demonstrated that *TRIP12* polyubiquitinates and provokes the degradation of the transcription factor PTF1a (Pancreas Transcription Factor 1a) by the proteasome [6]. PTF1a is a transcription factor that controls the expression of pancreatic acinar specific genes such as amylase and chymotrypsin genes. This factor is essential in pancreatic development and pancreatic cell homeostasis by maintaining the acinar phenotype. The expression of PTF1a is lost during acinar to ductal cells transdifferentiation [133,134]. PTF1a is also required for the specification of inhibitory neurons in various regions of the developing central nervous system including the spinal cord, brainstem, cerebellum, and retina [135–137]. Thus, it is possible that *TRIP12* regulates neuronal specification via PTF1a degradation.

6. *TRIP12* in Pathologies

6.1. Alterations of *TRIP12* Gene in Autism and Intellectual Disability

TRIP12 (OMIM 604506 (Online Mendelian Inheritance in Man) (see Section Software and databases)) is a neurodevelopmental disorder (NDD)-associated gene. Several publications allowed its identification as a primary gene for Intellectual Disability (ID), which is the most common developmental disorder affecting 1–3% of the world’s population. Most IDs are monogenic with 1,396 genes causing ID [138]. The *TRIP12* gene is referenced as a causative gene associated with Clark–Baraitser syndrome (CLABARS; OMIM617752), formerly autosomal-dominant mental retardation-49 (MRD49) in the OMIM database. Although originally thought to be an X-linked disorder [139], Clark–Baraitser syndrome was shown to have an autosomal dominant mode of inheritance [140]. In addition to mental retardation, craniofacial dysmorphism, behavioral psychiatric manifestations, and obesity are the main clinical features of the syndrome. CLABARS is caused by heterozygous mutation in the *TRIP12* gene.

The first indication of a putative role of the *TRIP12* gene in ID was the report of a large interstitial ≈5.6-Mb deletion on the long arm of chromosome 2 (2q36.2q36.3) in a 17-year-old girl. Twenty-four genes were located in the deleted fragment where *TRIP12* was disrupted. The phenotype included

severe mental retardation, facial dysmorphism, and multiple renal cysts [141]. The identification of *TRIP12* among 10 new ID genes was later accomplished by meta-analysis of large-scale exome sequencing data of a combined cohort including 2104 patient-parent trios [142] where two different de novo heterozygous mutations in the *TRIP12* gene were identified in two unrelated patients.

Of importance, several de novo mutations (DNM) of the *TRIP12* gene were associated with a broader phenotype than ID in line with the overlap of genes and pathways involved in NDDs. Mutual comorbidities of ID and Autism Spectrum Disorder (ASD) also raised the question of whether *TRIP12* can be validated as a gene associated with ASD. Resequencing sixty-four ASD risk genes in two ASD cohorts newly identified mutations in the *TRIP12* gene, thus proposing that it could be a novel candidate gene for clinical follow-up [143,144]. Recent detailed clinical information characterizing the phenotype of 11 individuals with mild to moderate ID or learning disability finally demonstrated that *TRIP12* is a risk gene for ID with (8/11) or without ASD [10]. However, there is no correlation for the presence or absence of autistic features with the type of mutations in this study. Other typical clinical features of the *TRIP12*-associated spectrum such as unspecific craniofacial dysmorphism, speech delay, and seizures were reported in another cohort of nine pathogenic variants that further documented that *TRIP12* haploinsufficiency causes childhood-onset neurodevelopmental disorders [145]. Recent exome sequencing of Japanese trios and integrative analysis conducted by combining published DNM data identify *TRIP12* among 61 significant genes for ASD and suggest that it is a genuine disease-causative gene [146]. The *Trip12* gene is a high confidence gene for autism in the SFARI GENE database (see Section Software and databases).

Pathogenic *TRIP12* variants are now documented in gene variant databases related to human health LOVD (Leiden Open Variation Database (see Section Software and databases)) and ClinVar (Clinical Variation (see Section Software and databases)) and can be also found in ID/autism websites. According to the LOVD, most pathogenic variants (87%) have DNA changes in coding regions, 8% in spliced regions, 5% in multiple regions. These changes are substitutions (53%), deletions (29%), duplications (13%), and 5% of these variants have still unknown modifications. Consequences at the protein level include stop changes (32% of variants) and frame shifts (26%) generating premature termination, missense changes (18%), no protein production (8%), or unknown (16%). Selected variants are placed on the *TRIP12* protein sequence according to the transcript variant 3, NM_004238.3 (Figure 8).

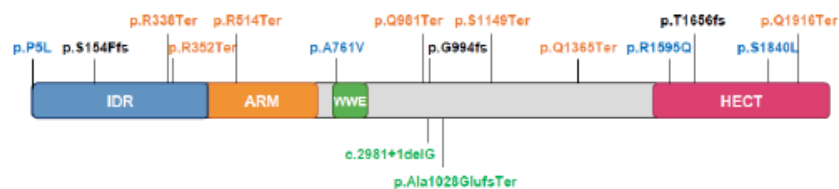


Figure 8. Schematic illustration of published *TRIP12* gene mutations in intellectual disorders. Mutations in blue are missense, mutations in orange are nonsense, mutations in black are frameshift. Mutations in green are located in splice donor sites. From [10,142–145].

Analysis was performed to identify protein/protein interaction networks and signaling pathways associated with a set of autism and ID genes. These frequently implicate neuronal signaling and development, chromatin remodeling, transcriptional regulation, mRNA splicing, ion transport, cell cycle, and microtubule cytoskeleton. They converge on neuronal and cognitive functions such as the regulation of synaptic transmission, learning, and memory [146–148]. To date, only one pilot study in *Drosophila melanogaster* investigated the role of *TRIP12* using inducible RNA interference. This study reported no significant change in behavioral assay after *TRIP12* knock-down, suggesting no role in the development of the nervous system [148]. Given the important function for protein degradation in the nervous system, the synaptic plasticity, and the maintenance of neuronal structures, one might speculate that *TRIP12* regulates the synaptic proteome. However, physiological roles of *TRIP12* suggest

Another study aiming to identify the genetic loci with an elevated risk of breast cancer related to menopausal hormone therapy (MHT) in post-menopausal women showed a strong linkage between a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) located in the exon 1-2 intronic region of the *TRIP12* gene and MHT [152]. However, they were not successful in replicating *TRIP12* SNP \times MHT interaction in an independent cohort. Corresponding analyses of public data of global RNA expression were obtained from 12 lung adenocarcinomas and six controls to identify mutated genes with high-frequency-risk expression [153]. They identified the *TRIP12* gene as the most frequently mutated (missense mutation on exon 16) (nine cases out of 12). A recent study reported somatic mutations of the *TRIP12* gene in three out of 20 cases of HPV-positive anal squamous cell carcinoma (HPV-ASCC) [154]. A missense mutation, a frameshift internal deletion, and a nonsense mutation were identified on exons 3, 37, and 33, respectively. However, the functional consequences of these mutations were not further investigated. A RNA-seq analysis of 139 patients with pediatric Acute Myeloid Leukemia (AML) revealed the existence in one patient of a new gene rearrangement leading to the fusion between *TRIP12* and *NPM* (nucleophosmin) proteins [155]. Although the properties of this new fusion protein were not further studied, the authors suggest that the *TRIP12*-*NPM* protein may inhibit the function of ARF. *TRIP12* somatic mutations at splice sites were identified in pancreatic cancer recurrence of two patients but not in matched originally resected primary tumor and were qualified as subclonal mutations [156].

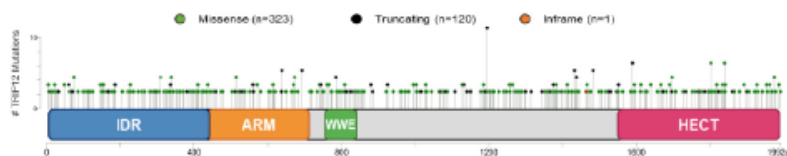


Figure 10. Schematic representation of mutations on the *TRIP12* gene in human cancers in cBioPortal (see Section Software and databases) obtained from 176 non-redundant studies containing more than 100 cases with both mutations and CNA data (27,235 patients and 28,253 samples). Mutation diagram circles are colored with respect to the corresponding mutation types indicated in the legend. In case of different mutation types at a single position, the color of the circle is determined with respect to the most frequent mutation type. Truncating mutations include nonsense, nonstop, frameshift deletion, frameshift insertion, and splice site. Inframe mutations include inframe deletion and inframe insertion.

Altogether, these studies suggest that although the *TRIP12* gene is found mutated in various type of tumors at variable frequencies, the functional consequences of these mutations in cancer development remain largely unidentified. Possible applications to detect these mutations as diagnostic, prognostic, or predictive still remain to be demonstrated.

6.2.2. Alteration of *TRIP12* mRNA Expression in Cancers

If we refer to the Gepia2 database (see Section Software and databases), the *TRIP12* mRNA level compared to normal corresponding tissues varies depending on the type of cancer. Indeed, among 27 different types of cancer, the down-regulation of *TRIP12* mRNA is found in 12 cancer types compared to normal corresponding tissues but reached a statistical importance only in testicular germ cell tumors. In contrast, an overexpression of *TRIP12* mRNA is found in 15 types of cancer with a statistical significance for lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma, thymoma and pancreatic adenocarcinoma (Figure 11). Of note, the *TRIP12* mRNA level is decreased in tumor types for which *TRIP12* mRNA is elevated in normal corresponding tissue, and inversely, it is up-regulated in tumors for which the *TRIP12* mRNA level is low in corresponding normal tissues (i.e., pancreatic adenocarcinoma). However, the mechanisms responsible for the alteration of *TRIP12* mRNA in tumor samples remain largely unknown. In certain types of cancer, a high level of *TRIP12* mRNA is associated with a shorter disease-free survival (i.e., bladder urothelial carcinoma, pancreatic adenocarcinoma), which suggests that the *TRIP12* mRNA level could be a useful prognostic marker. Additionally,

is associated with a poor survival rate. These results were confirmed recently by the same group [160]. Recently, Gatti et al. identified that the TRIP12 protein level could provide a useful marker for PARP inhibitors (PARPi) sensitivity [27]. Indeed, responses to this therapy are promising, but predictions based on PARP1 gene expression abundance and/or activity are not accurate enough. TRIP12 limits PARP1 presence at the chromatin by polyubiquitinating it and, as a consequence, it decreases the efficiency of PARP1 trapping by PARPi. Of importance, the TRIP12 protein level is negatively correlated with PARP1 protein abundance in two cohorts of breast and ovarian cancer patients.

We described in Section 5.2. the essential role of ARF in the activation of the P53 pathway and its degradation mediated by TRIP12. We also described how the nucleophosmin (NPM) protects ARF from TRIP12-mediated degradation by sequestering it into the nucleoli [15]. The NPM gene is mutated in one-third of Acute myeloid leukemia (AML), which provokes the translocation of NPM protein into the cytoplasm and the loss of its capacity to maintain ARF localization in the nucleolus [96]. Combined with an overexpression of TRIP12, a frequent loss of NPM nucleolar localization strongly impedes the activation of the ARF/P53 pathway in AML-derived cells and favors their proliferation.

7. Conclusions and Perspectives

In this review, we provide a synthesis of the different knowledge on the E3 ubiquitin ligase TRIP12. First described as a thyroid hormone receptor interacting protein, it appears that the TRIP12 protein displays several important functions in essential cellular processes such as cell cycle progression, DNA damage repair, chromatin remodeling, and cell differentiation. Although the number of studies related to this E3 ubiquitin ligase is constantly growing, numerous aspects of its regulation and functions in physiology and pathologies are not entirely clear.

High-throughput sequencing analyses have determined the level of expression of *TRIP12* mRNA in a myriad of healthy and pathological human tissues such as cancers. However, the molecular mechanisms that regulate the production and the stability of *TRIP12* mRNA remain largely unknown. The same observation can be made for the post-translational regulation of TRIP12. Indeed, mass spectrometry approaches identified numerous post-translationally modified residues in TRIP12. Unfortunately, none of them have been linked to biological functions, even if three phosphorylation sites are attributed to specific kinases involved in cell cycle (CDK1) and DNA damage response (ATR/ATM, CHK1). We can speculate that these phosphorylated residues modify the protein-interacting properties or the ubiquitin ligase capacity of TRIP12, which in turn participates in cell cycle control and DDR. We could also envisage the possibility that TRIP12 phosphorylated residues result from the activity of kinases implicated in other signaling pathways (i.e., MAP kinases, PI3 kinases). The development of antibodies specific to TRIP12-phosphorylated residues is crucial to decipher the biological consequences of these post-translational modifications. Likewise, the identification of the ubiquitin ligase(s) responsible for the ubiquitinated residues of TRIP12 would certainly help to better perceive the regulation of the TRIP12 protein during the cell cycle. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) system ubiquitinates several cell cycle-regulated proteins early after mitosis (i.e., CYCLIN A and B), thereby mediating degradation by the proteasome. TRIP12 possesses putative KEN box (aa 1496–1570/UniProt source) and Destruction boxes (aa 859–867 and aa 1546–1554/ELM resource) specifically recognized by the APC/C, system making this degradation system a legitimate candidate for the control of TRIP12 stability. To confirm these multiple hypotheses, a complete and exhaustive interactome/substratome of TRIP12 is required, keeping in mind that due to its ubiquitous expression, the interactome of TRIP12 will possibly vary depending on the cell type. We can logically expect other important cellular functions for this E3 ubiquitin ligase depending on the cell type or the cellular context.

This review raises questions, one of which is whether TRIP12 is an appropriate therapeutic target. In the case of cancers in which TRIP12 is overexpressed (i.e., pancreatic cancer) and given its role in the maintenance of a low level of P53 mediated by ARF degradation, it seems logical that the inhibition of TRIP12 could be a promising therapeutic strategy. The inhibition of TRIP12 ubiquitin ligase activity or

its interaction with protein partners might counteract the proliferation rate of cancer cells or sensitize them to chemotherapies (by affecting DNA damages repair induced by chemotherapies). To this purpose, the crystallization of the entire TRIP12 protein is a prerequisite to obtain the 3D structure of the protein to facilitate the screening and/or the design of specific inhibitors. PROTACs that are bifunctional molecules made up of an E3 ubiquitin ligase and a target protein connected via a linker could also be used to target TRIP12.

In pathological contexts where the *TRIP12* gene is mutated or truncated (numerous types of cancer and intellectual disorders), we do not yet understand whether the TRIP12 protein is indeed expressed or if the mRNA is degraded. If expressed, the functional consequences of mutated and truncated forms of TRIP12 in these pathologies are still unknown. We can only speculate that mutant proteins would act as dominant negative proteins, leading to an alteration of genome expression. The development of murine transgenic models expressing *Trip12* mutated forms could address these issues. Moreover, several truncating mutations identified in cancers and IDs theoretically lead to TRIP12 proteins lacking the HECT catalytic domain or protein–protein interacting domains (WWE/ARM). Therefore, therapeutic strategies inhibiting its catalytic activity or protein interaction might be useless or, even worse, deleterious for the patients.

To conclude, the TRIP12 protein is emerging as an important protein in several essential cellular processes as well as in pathological alterations. Uncovering the function of TRIP12 offers a glimpse for potential exciting therapeutic strategies. However, numerous aspects of its regulations and functions need to be better described prior to its application in therapeutic objectives.

8. Software and Data Bases

BioGrid: The Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGrid) is an open access database that houses genetic and protein interactions curated from the primary biomedical literature for all major model organism species and humans (<https://thebiogrid.org/>).

cBioPortal: The cBio Cancer Genomics Portal is an open-access resource for the interactive exploration of multidimensional cancer genomics datasets, currently providing access to data from more than 5000 tumor samples from 20 cancer studies (www.cbioportal.org).

ClinVar: ClinVar is a public database of variant interpretations that has steadily grown to become the largest publicly available genetic variant database and provides an ever-growing resource to study genotype–phenotype correlations (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

COBALT: The constraint-based Multiple Alignment Tool is a multiple sequence alignment tool that finds a collection of pairwise constraints derived from conserved domain database, protein motif database, and sequence similarity, using RPS-BLAST, BLASTP, and PHI-BLAST. Then, pairwise constraints are incorporated into a progressive multiple alignment (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi).

EMBOSS matcher: EMBOSS Matcher identifies local similarities in two input sequences using a rigorous algorithm based on Bill Pearson's lalign application (www.ebi.ac.uk).

ELM: The Eukaryotic Linear Motif resource is a computational biology resource for investigating short linear motifs (SLiMs) in eukaryotic proteins. It is currently the largest collection of linear motif classes with annotated and experimentally validated linear motif instances (<http://elm.eu.org/>).

Genome browser: A genome browser is a graphical interface for the display of information from a biological database for genomic data (www.genome.ucsc.edu).

Gepia2: The Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2 web server is a valuable and highly cited resource for gene expression analysis based on tumor and normal samples from the TCGA and the GTEx databases (<http://gepia2.cancer-pku.cn>).

Human Protein Atlas: The Human Protein Atlas is a program with the aim to map all the human proteins in cells, tissues, and organs using an integration of various omics technologies, including antibody-based imaging, mass spectrometry-based proteomics, transcriptomics, and systems biology (www.proteinatlas.org).

IDEAL: Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature is a collection of knowledge on experimentally verified intrinsically disordered proteins. IDEAL contains manual annotations by curators on intrinsically disordered regions, interaction regions to other molecules, post-translational modification sites, references, and structural domain assignments (www.ideal-db.org).

InterProScan: InterProScan is a tool that scans given protein sequences against the protein signatures of the InterPro member databases, currently—PROSITE, PRINTS, Pfam, ProDom, and SMART (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

IUPred: Intrinsically unstructured/disordered proteins have no single well-defined tertiary structure in their native, functional state. This server recognizes such regions from the amino acid sequence based on the estimated pairwise energy content (<https://iupred.elte.hu/>).

LOVD: The Leiden Variation Database is a free, flexible web-based open source database developed in the Leiden University Medical Center in the Netherlands, which is designed to collect and display variants in the DNA sequence. The focus of an LOVD is usually the combination between a gene and a genetic (heritable) disease (<https://www.lovd.nl/>).

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man is a comprehensive, authoritative compendium of human genes and genetic phenotypes that is freely available and updated daily (<https://www.omim.org/>).

PhosphoSitePlus®: PhosphoSitePlus® provides comprehensive information and tools for the study of protein post-translational modifications (PTMs) including phosphorylation, acetylation, and more (<https://phosphosite.org/>).

SFARI GENE: SFARI GENE is an evolving database for the autism research community that is centered on genes implicated in autism susceptibility (<https://gene.sfari.org/>).

STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins is a biological database and web resource of known and predicted protein–protein interactions. The STRING database contains information from numerous sources, including experimental data, computational prediction methods, and public text collections. It is freely accessible and it is regularly updated (<https://string-db.org/>).

UniProt: UniProt is the Universal Protein resource, a central repository of protein data created by combining the Swiss-Prot, TrEMBL and PIR-PSD databases. (www.uniprot.org).

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8515/s1>.

Author Contributions: M.B., C.V., D.L., J.T., M.D. conception, drafting, critical revising of the review (text, figures and tables). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: University Paul Sabatier (Toulouse, France). Ligue Nationale contre le Cancer. Fondation Toulouse Cancer Santé (2018CS079). Ligue Régionale contre le Cancer (comité Haute-Garonne, comité Ariège). Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Acknowledgments: C. Vargas is funded by the University Paul Sabatier (Toulouse, France). M. Brunet is funded by the University Paul Sabatier (Toulouse, France) and the Ligue Nationale contre le Cancer. D. Larrieu was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer. We thank the “Fondation Toulouse Cancer Santé” and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité Haute-Garonne, comité Ariège) for financial support. We thank Dina Arvanitis (Inserm U1038, Institute of Cardiovascular and Metabolic Disease, Toulouse, France) for the critical reading of the manuscript. We apologize for all the studies that were not quoted in this manuscript due to a lack of space.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nomura, N.; Nagase, T.; Miyajima, N.; Sazuka, T.; Tanaka, A.; Sato, S.; Seki, N.; Kawarabayashi, Y.; Ishikawa, K.-I.; Tabata, S. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. II. The Coding Sequences of 40 New Genes (KIAA0041-KIAA0080) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1. *DNA Res.* **1994**, *1*, 223–229. [[CrossRef](#)]
2. Huibregtse, J.M.; Scheffner, M.; Beaudenon, S.; Howley, P.M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 2563–2567. [[CrossRef](#)]
3. Lee, J.W.; Choi, H.S.; Gyuris, J.; Brent, R.; Moore, D.D. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **1995**, *9*, 243–254.

4. Park, Y.; Yoon, S.K.; Yoon, J.-B. TRIP12 functions as an E3 ubiquitin ligase of APP-BP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 294–298. [[CrossRef](#)]
5. Kajiro, M.; Tsuchiya, M.; Kawabe, Y.-I.; Furumai, R.; Iwasaki, N.; Hayashi, Y.; Katano, M.; Nakajima, Y.; Goto, N.; Watanabe, T.; et al. The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Trip12 Is Essential for Mouse Embryogenesis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25871. [[CrossRef](#)]
6. Hanoun, N.; Fritsch, S.; Gayet, O.; Gigoux, V.; Cordelier, P.; Dusetti, N.; Torrisani, J.; Dufresne, M. The E3 Ubiquitin Ligase Thyroid Hormone Receptor-interacting Protein 12 Targets Pancreas Transcription Factor 1a for Proteasomal Degradation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35593–35604. [[CrossRef](#)]
7. Larrieu, D.; Brunet, M.; Vargas, C.; Hanoun, N.; Ligat, L.; Dagnon, L.; Lulka, H.; Pommier, R.M.; Selves, J.; Jady, B.E.; et al. The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Trinklein, N.D.; Aldred, S.E.; Hartman, S.J.; Schroeder, D.I.; Otilar, R.P.; Myers, R.M. An Abundance of Bidirectional Promoters in the Human Genome. *Genome Res.* **2003**, *14*, 62–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tekchan, D.S.; Chen, D.; Liu, Y.; Ling, T.; Zhang, Y.; Chen, H.; Wang, W.; Otkur, W.; Qi, H.; Xia, T.; et al. F-box proteins and cancer: An update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects. *Theranostics* **2020**, *10*, 4150–4167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Bramswig, N.C.; Lüdecke, H.-J.; Pettersson, M.; Albrecht, B.; Bernier, R.A.; Cremer, K.; Eichler, E.E.; Falkenstein, D.; Gerds, J.; Jansen, S.; et al. Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Qual. Life Res.* **2017**, *136*, 179–192. [[CrossRef](#)]
11. Chang, J.-W.; Zhang, W.; Yeh, H.S.; De Jong, E.P.; Jun, S.; Kim, K.H.; Bae, S.S.; Beckman, K.; Hwang, T.H.; Kim, K.S.; et al. mRNA 3'-UTR shortening is a molecular signature of mTORC1 activation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. An, C.-I.; Ganio, E.; Hagiwara, N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet. Muscle* **2013**, *3*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sadkowski, T.; Jank, M.; Zwierzchowski, L.; Oprzadek, J.; Motyl, T. Comparison of skeletal muscle transcriptional profiles in dairy and beef breeds bulls. *J. Appl. Genet.* **2009**, *50*, 109–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gudjonsson, T.; Altmeyer, M.; Savic, V.; Toledo, L.; Dinant, C.; Grefte, M.; Bartkova, J.; Poulsen, M.; Oka, Y.; Bekker-Jensen, S.; et al. TRIP12 and UBR5 Suppress Spreading of Chromatin Ubiquitylation at Damaged Chromosomes. *Cell* **2012**, *150*, 697–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chen, D.; Shan, J.; Zhu, W.-G.; Qin, J.; Gu, W. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *464*, 624–627. [[CrossRef](#)]
16. Huber, A.H.; Nelson, W.J.; Weis, W.I. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **1997**, *90*, 871–882. [[CrossRef](#)]
17. Ries, L.K.; Liess, A.K.L.; Feiler, C.G.; Spratt, D.E.; Lowe, E.D.; Lorenz, S. Crystal structure of the catalytic C-lobe of the HECT-type ubiquitin ligase E6AP. *Protein Sci.* **2020**, *29*, 1550–1554. [[CrossRef](#)]
18. Zweifel, M.E.; Leahy, D.J.; Barrick, D. Structure and Notch Receptor Binding of the Tandem WWE Domain of Deltex. *Structure* **2005**, *13*, 1599–1611. [[CrossRef](#)]
19. Sluimer, J.; Distel, B. Regulating the human HECT E3 ligases. *Cdl. Md. Life Sci.* **2018**, *75*, 3121–3141. [[CrossRef](#)]
20. Zheng, N.; Shabek, N. Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, *86*, 129–157. [[CrossRef](#)]
21. Huang, L. Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science* **1999**, *286*, 1321–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Scheffner, M.; Huibregtse, J.M.; Vierstra, R.D.; Howley, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **1993**, *75*, 495–505. [[CrossRef](#)]
23. Wang, Y.; Argiles-Castillo, D.; Kane, E.L.; Zhou, A.; Spratt, D.E. HECT E3 ubiquitin ligases—Emerging insights into their biological roles and disease relevance. *J. Cdl Sci.* **2020**, *133*, jcs228072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aravind, L. The WWE domain: A common interaction module in protein ubiquitination and ADP-ribosylation. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 273–275. [[CrossRef](#)]
25. Wang, Z.; Michaud, G.A.; Cheng, Z.; Zhang, Y.; Hinds, T.R.; Fan, E.; Cong, F.; Xu, W. Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribose)ylation-dependent ubiquitination. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 235–240. [[CrossRef](#)]

26. Mitchell, A.L.; Attwood, T.K.; Babbitt, P.C.; Blum, M.; Bork, P.; Bridge, A.; Brown, S.D.; Chang, H.-Y.; El-Gebali, S.; Fraser, M.I.; et al. InterPro in 2019: Improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D351–D360. [[CrossRef](#)]
27. Gatti, M.; Imhof, R.; Huang, Q.; Baudis, M.; Altmeyer, M. The Ubiquitin Ligase TRIP12 Limits PARP1 Trapping and Constrains PARP Inhibitor Efficiency. *Cell Rep.* **2020**, *32*, 107985. [[CrossRef](#)]
28. Tewari, R.; Bailes, E.; Bunting, K.A.; Coates, J.C. Armadillo-repeat protein functions: Questions for little creatures. *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 470–481. [[CrossRef](#)]
29. El Refy, A.; Perazza, D.; Zekraoui, L.; Valay, J.-G.; Bechtold, N.; Brown, S.; Hülskamp, M.; Herzog, M.; Bonneville, J.-M. The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol. Genet. Genom.* **2003**, *270*, 403–414. [[CrossRef](#)]
30. Ju, D.; Wang, X.; Xu, H.; Xie, Y. The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins. *FEBS Lett.* **2006**, *581*, 265–270. [[CrossRef](#)]
31. Van Der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R.J.; Daughdrill, G.W.; Dunker, A.K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D.T.W.; et al. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6589–6631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Toretsky, J.A.; Wright, P.E. Assemblages: Functional units formed by cellular phase separation. *J. Cell Biol.* **2014**, *206*, 579–588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Levy, Y. Intrinsically Disordered Regions as Affinity Tuners in Protein-DNA Interactions. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 632a. [[CrossRef](#)]
34. Watson, M.; Stott, K. Disordered domains in chromatin-binding proteins. *Essays Biochem.* **2019**, *63*, 147–156. [[CrossRef](#)]
35. Vuzman, D.; Levy, Y. DNA search efficiency is modulated by charge composition and distribution in the intrinsically disordered tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21004–21009. [[CrossRef](#)]
36. Sabari, B.R.; Dall’Agnese, A.; Boija, A.; Klein, I.A.; Coffey, E.L.; Shrinivas, K.; Abraham, B.J.; Hannett, N.M.; Zamudio, A.V.; Manteiga, J.C.; et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **2018**, *361*, eaar3958. [[CrossRef](#)]
37. Leach, B.L.; Kuntimaddi, A.; Schmidt, C.R.; Cierpicki, T.; Johnson, S.A.; Bushweller, J.H. Leukemia Fusion Target AP9 Is an Intrinsically Disordered Transcriptional Regulator that Recruits Multiple Partners via Coupled Folding and Binding. *Structure* **2013**, *21*, 176–183. [[CrossRef](#)]
38. Chen, Y.; Cramer, P. Structure of the super-elongation complex subunit AFF4 C-terminal homology domain reveals requirements for AFF homo- and heterodimerization. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 10663–10673. [[CrossRef](#)]
39. Liu, X.; Yang, X.; Li, Y.; Zhao, S.; Li, C.; Ma, P.; Mao, B. Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA damage response. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 4213–4222. [[CrossRef](#)]
40. Banani, S.F.; Lee, H.O.; Hyman, H.O.L.A.A.; Rosen, S.F.B.M.K. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 285–298. [[CrossRef](#)]
41. Posey, A.E.; Holehouse, A.S.; Pappu, R.V. Phase Separation of Intrinsically Disordered Proteins. *Methods Enzymol.* **2018**, *611*, 1–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Gallego, L.D.; Schneider, M.; Mittal, C.; Romanuska, A.; Carrillo, R.M.G.; Schubert, T.; Pugh, B.F.; Köhler, A. Phase separation directs ubiquitination of gene-body nucleosomes. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *579*, 592–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Pottier, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Blasius, M.; Forment, J.V.; Thakkar, N.; Wagner, S.A.; Choudhary, C.; Jackson, S.P. A phospho-proteomic screen identifies substrates of the checkpoint kinase Chk1. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R78. [[CrossRef](#)]
45. Matsuoka, S.; Ballif, B.A.; Smogorzewska, A.; McDonald, E.R.; Hurov, K.E.; Luo, J.; Bakalarski, C.E.; Zhao, Z.; Solimini, N.; Leventhal, Y.; et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* **2007**, *316*, 1160–1166. [[CrossRef](#)]
46. Petrone, A.; Adamo, M.E.; Cheng, C.; Kettenbach, A.N. Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteom.* **2016**, *15*, 2448–2461. [[CrossRef](#)]

47. Cai, J.-B.; Shi, G.-M.; Dong, Z.-R.; Ke, A.-W.; Ma, H.-H.; Gao, Q.; Shen, Z.-Z.; Huang, X.-Y.; Chen, H.; Yu, D.-D.; et al. Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14 ARF degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* **2015**, *61*, 1603–1614. [[CrossRef](#)]
48. Georges, A.; Marcon, E.; Greenblatt, J.; Frappier, L. Identification and Characterization of USP7 Targets in Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15833. [[CrossRef](#)]
49. Hershko, A.; Ciechanover, A. The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425–479. [[CrossRef](#)]
50. McClellan, A.J.; Laugesen, S.H.; Ellgaard, L. Cellular functions and molecular mechanisms of non-lysine ubiquitination. *Open Biol.* **2019**, *9*, 190147. [[CrossRef](#)]
51. Swatek, K.N.; Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **2016**, *26*, 399–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wilkinson, K.D. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J.* **1997**, *11*, 1245–1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kweon, S.-M.; Chen, Y.; Moon, E.; Kvederaviciute, K.; Klimasauskas, S.; Feldman, D.E. An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol. Cell* **2019**, *74*, 1138–1147.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Keppler, B.R.; Archer, T.K. Ubiquitin-dependent and Ubiquitin-independent Control of Subunit Stoichiometry in the SWI/SNF Complex. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 35665–35674. [[CrossRef](#)]
55. Hah, N.; Kolkman, A.; Ruhl, D.D.; Pijnappel, W.W.M.P.; Heck, A.J.R.; Timmers, H.T.M.; Kraus, W.L. A Role for BAF57 in Cell Cycle-Dependent Transcriptional Regulation by the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4402–4411. [[CrossRef](#)]
56. Kuo, M.-L.; Besten, W.D.; Sherr, C.J. N-Terminal Polyubiquitination of the ARF Tumor Suppressor, A Natural Lysine-Less Protein. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 1367–1369. [[CrossRef](#)]
57. Chen, J.; Archer, T.K. Regulating SWI/SNF Subunit Levels via Protein-Protein Interactions and Proteasomal Degradation: BAF155 and BAF170 Limit Expression of BAF57. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 9016–9027. [[CrossRef](#)]
58. Chio, I.I.C.; Sasaki, M.; Ghazarian, D.; Moreno, J.; Done, S.J.; Ueda, T.; Inoue, S.; Chang, Y.-L.; Chen, N.-J.; Mak, T.W. TRADD contributes to tumour suppression by regulating UFL1-dependent p19Arf ubiquitylation. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 625–633. [[CrossRef](#)]
59. Johnson, E.S.; Ma, P.C.M.; Ota, I.M.; Varshavsky, A. A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17442–17456. [[CrossRef](#)]
60. Park, Y.; Yoon, S.K.; Yoon, J.-B. The HECT Domain of TRIP12 Ubiquitinates Substrates of the Ubiquitin Fusion Degradation Pathway. *J. Biol. Chem.* **2008**, *284*, 1540–1549. [[CrossRef](#)]
61. Van Leeuwen, F.; De Kleijn, D.P.; Hurk, H.H.V.D.; Neubauer, A.; Sonnemans, M.A.; Sluijs, J.A.; Köycü, S.; Randjiel, R.D.; Salehi, A.; Martens, G.J.; et al. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* **1998**, *279*, 242–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Poulsen, E.G.; Steinhauer, C.; Lees, M.; Lauridsen, A.-M.; Ellgaard, L.; Hartmann-Petersen, R. HUWE1 and TRIP12 Collaborate in Degradation of Ubiquitin-Fusion Proteins and Misframed Ubiquitin. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Setz, C.; Friedrich, M.; Hahn, S.; Dörrie, J.; Schaft, N.; Schuler, G.; Schubert, U. Just One Position-Independent Lysine Residue Can Direct MelanA into Proteasomal Degradation following N-Terminal Fusion of Ubiquitin. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55567. [[CrossRef](#)]
64. Varshavsky, A. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hwang, C.-S.; Shemorry, A.; Auerbach, D.; Varshavsky, A. The N-end rule pathway is mediated by a complex of the RING-type Ubr1 and HECT-type Ufd4 ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 1177–1185. [[CrossRef](#)]
66. Havugimana, P.C.; Hart, G.T.; Nepusz, T.; Yang, H.; Turinsky, A.L.; Li, Z.; Wang, P.I.; Boutz, D.R.; Fong, V.; Phanstiel, S.; et al. A Census of Human Soluble Protein Complexes. *Cell* **2012**, *150*, 1068–1081. [[CrossRef](#)]
67. Arbogast, F.; Arnold, J.; Hammann, P.; Kuhn, L.; Chicher, J.; Murera, D.; Weishaar, J.; Müller, S.; Fauny, J.-D.; Gros, F. ATG5 is required for B cell polarization and presentation of particulate antigens. *Autophagy* **2018**, *15*, 280–294. [[CrossRef](#)]
68. Huttlin, E.L.; Ting, L.; Bruckner, R.J.; Gebrieab, F.; Gygi, M.P.; Szpyt, J.; Tam, S.; Zarraga, G.; Colby, G.; Baltier, K.; et al. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. *Cell* **2015**, *162*, 425–440. [[CrossRef](#)]

69. Huttlin, E.L.; Bruckner, R.J.; Paulo, J.A.; Cannon, J.R.; Ting, L.; Baltier, K.; Colby, G.; Gebreab, F.; Gygi, M.P.; Parzen, H.; et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *545*, 505–509. [[CrossRef](#)]
70. Nakayama, M.; Kikuno, R.; Ohara, O. Protein-Protein Interactions between Large Proteins: Two-Hybrid Screening Using a Functionally Classified Library Composed of Long cDNAs. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1773–1784. [[CrossRef](#)]
71. Hanson, D.; Stevens, A.; Murray, P.; Black, G.C.M.; Clayton, P.E. Identifying biological pathways that underlie primordial short stature using network analysis. *J. Mol. Endocrinol.* **2014**, *52*, 333–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Jeronimo, C.; Forget, D.; Bouchard, A.; Li, Q.; Chua, G.; Poitras, C.; Thérien, C.; Bergeron, D.; Bourassa, S.; Greenblatt, J.; et al. Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 262–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Lee, S.; Cho, Y.-E.; Kim, S.-H.; Kim, Y.-J.; Park, J.-H. GLTSCR2 promotes the nucleoplasmic translocation and subsequent degradation of nucleolar ARF. *Oncotarget* **2016**, *8*, 16293–16302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Li, Z.; Hou, J.; Sun, L.; Wen, T.; Wang, L.; Zhao, X.; Xie, Q.; Zhang, S.Q. NMI mediates transcription-independent ARF regulation in response to cellular stresses. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 4635–4646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Lo, R.; Zhang, Y.; Dai, M.-S.; Sun, X.-X.; Zeng, S.X.; Lu, H. Nucleostemin stabilizes ARF by inhibiting the ubiquitin ligase ULE. *Oncogene* **2014**, *34*, 1688–1697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gupta, G.D.; Coyaud, É.; Gonçalves, J.; Mojarad, B.A.; Liu, Y.; Wu, Q.; Gheiratmand, L.; Comartin, D.; Tkach, J.M.; Cheung, S.W.; et al. A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface. *Cell* **2015**, *163*, 1484–1499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Wang, X.; Venable, J.; Lapointe, P.; Hutt, D.M.; Koulov, A.V.; Coppinger, J.; Gurkan, C.; Kellner, W.; Matteson, J.; Plutner, H.; et al. Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. *Cell* **2006**, *127*, 803–815. [[CrossRef](#)]
78. Yamauchi, T.; Masuda, T.; Carver, M.C.; Seiler, M.; Semba, Y.; Shboul, M.; Al-Raqad, M.; Maeda, M.; Schoonenberg, V.A.; Cole, M.A.; et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 Screen Identifies Leukemia-Specific Dependence on a Pre-mRNA Metabolic Pathway Regulated by DCPS. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 386–400.e5. [[CrossRef](#)]
79. Guard, S.E.; Poss, Z.C.; Ebmeier, C.C.; Pagnatis, M.; Simpson, H.; Taatjes, D.J.; Old, W.M. The nuclear interactome of DYRK1A reveals a functional role in DNA damage repair. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
80. Cao, Q.; Wang, X.; Zhao, M.; Yang, R.; Malik, R.; Qiao, Y.; Poliakov, A.; Yocum, A.K.; Li, Y.; Chen, W.; et al. The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–13. [[CrossRef](#)]
81. Wang, S.; Kollipara, R.K.; Humphries, C.G.; Ma, S.-H.; Hutchinson, R.; Li, R.; Siddiqui, J.; Tomlins, S.A.; Raj, G.V.; Kitterer, R. The ubiquitin ligase TRIM25 targets ERG for degradation in prostate cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64921–64931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tarallo, R.; Bamundo, A.; Nassa, G.; Nola, E.; Paris, O.; Ambrosino, C.; Facchiano, A.; Baumann, M.; Nyman, T.A.; Weisz, A. Identification of proteins associated with ligand-activated estrogen receptor α in human breast cancer cell nuclei by tandem affinity purification and nano LC-MS/MS. *Proteom. Clin. Appl.* **2011**, *5*, 470. [[CrossRef](#)]
83. Hein, M.Y.; Hubner, N.C.; Poser, I.; Cox, J.; Nagaraj, N.; Toyoda, Y.; Gak, I.A.; Weisswange, I.; Mansfield, J.; Buchholz, E.; et al. A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances. *Cell* **2015**, *163*, 712–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Oliviero, G.; Cagny, G.; Waston, A.; Streubel, G.; Jerman, E.; Andrews, D.; Doyle, B.; Munawar, N.; Wynne, K.; Crean, J.; et al. Dynamic Protein Interactions of the Polycomb Repressive Complex 2 during Differentiation of Pluripotent Cells. *Mol. Cell. Proteom.* **2016**, *15*, 3450–3460. [[CrossRef](#)]
85. Gilmore, J.M.; Sardi, M.E.; Groppe, B.D.; Thornton, J.L.; Liu, X.; Dayebgadah, G.; Banks, C.A.; Slaughter, B.D.; Unruh, J.R.; Workman, J.L.; et al. WDR76 Co-Localizes with Heterochromatin Related Proteins and Rapidly Responds to DNA Damage. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155492. [[CrossRef](#)]
86. Lambert, J.-P.; Tucholska, M.; Go, C.; Knight, J.D.; Gingras, A.-C. Proximity biotinylation and affinity purification are complementary approaches for the interactome mapping of chromatin-associated protein complexes. *J. Proteom.* **2015**, *118*, 81–94. [[CrossRef](#)]
87. Nakamura, K.; Saredi, G.; Becker, J.R.; Foster, B.M.; Nguyen, N.V.; Beyer, T.E.; Cesa, L.C.; Faull, P.A.; Lukauskas, S.; Frimuter, T.; et al. H4K20me0 recognition by BRCA1-BARD1 directs homologous recombination to sister chromatids. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 311–318. [[CrossRef](#)]

88. Diner, B.A.; Lum, K.K.; Javitt, A.; Cristea, I.M. Interactions of the Antiviral Factor Interferon Gamma-Inducible Protein 16 (IFI16) Mediate Immune Signaling and Herpes Simplex Virus-1 Immunosuppression. *Mol. Cell. Proteom.* **2015**, *14*, 2341–2356. [[CrossRef](#)]
89. Yue, Y.; Liu, J.; Cui, X.; Cao, J.; Luo, G.; Zhang, Z.; Cheng, T.; Gao, M.; Shu, X.; Ma, H.; et al. VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 1–17. [[CrossRef](#)]
90. Hauri, S.; Comoglio, F.; Seimiya, M.; Gerstung, M.; Glatter, T.; Hansen, K.; Aebersold, R.; Paro, R.; Gstaiger, M.; Beisel, C. A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 583–595. [[CrossRef](#)]
91. Rosenbluh, J.; Mercer, J.; Shrestha, Y.; Oliver, R.; Tamayo, P.; Doench, J.G.; Tirosh, I.; Piccioni, F.; Hartenian, E.; Horn, H.; et al. Genetic and Proteomic Interrogation of Lower Confidence Candidate Genes Reveals Signaling Networks in β -Catenin-Active Cancers. *Cell Syst.* **2016**, *3*, 302–316.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Choi, J.H.; Zhong, X.; McAlpine, W.; Liao, T.-C.; Zhang, D.-W.; Fang, B.; Russell, J.; Ludwig, S.; Nair-Gill, E.; Zhang, Z.; et al. LMBR1L regulates lymphopoiesis through Wnt/ β -catenin signaling. *Science* **2019**, *364*, eaau0812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Su, D.; Ma, S.; Shan, L.; Wang, Y.; Wang, Y.; Cao, C.; Liu, B.; Yang, C.; Wang, L.; Tian, S.; et al. Ubiquitin-specific protease 7 sustains DNA damage response and promotes cervical carcinogenesis. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 4280–4296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Benelulmi-Chaachoua, A.; Chen, L.; Sokolina, K.; Wong, V.; Jurisica, I.; Emerit, M.B.; Darmon, M.; Espin, A.; Stagljar, I.; Tafelmeyer, P.; et al. Protein interactome mining defines melatonin MT1 receptors as integral component of presynaptic protein complexes of neurons. *J. Pineal Res.* **2015**, *60*, 95–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Heidelberger, J.B.; Voigt, A.; Borisova, M.E.; Petrosino, G.; Ruf, S.; Wagner, S.A.; Beli, P. Proteomic profiling of VCP substrates links VCP to K6-linked ubiquitylation and c-Myc function. *EMBO Rep.* **2018**, *19*, e44754. [[CrossRef](#)]
96. Chen, D.; Yoon, J.-B.; Gu, W. Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF. *Cel. Cycle* **2010**, *9*, 2946–2951. [[CrossRef](#)]
97. Yu, L.; Jearawiriyapaisarn, N.; Lee, M.P.; Hosoya, T.; Wu, Q.; Myers, G.; Lim, K.-C.; Kurita, R.; Nakamura, Y.; Vojtek, A.B.; et al. BAP1 regulation of the key adaptor protein NCoR1 is critical for γ -globin gene repression. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1537–1549. [[CrossRef](#)]
98. Shami Shah, A.; Batrouni, A.G.; Kim, D.; Punyala, A.; Cao, W.; Han, C.; Goldberg, M.L.; Smolka, M.B.; Baskin, J.M. PLEKHA4/kramer Attenuates Dishevelled Ubiquitination to Modulate Wnt and Planar Cell Polarity Signaling. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 2157–2170.e8. [[CrossRef](#)]
99. Khanna, R.; Krishnamoorthy, V.; Parnaik, V.K. E3 ubiquitin ligase RNF 123 targets lamin B1 and lamin-binding proteins. *FEBS J.* **2018**, *285*, 2243–2262. [[CrossRef](#)]
100. Maréchal, A.; Li, J.-M.; Ji, X.Y.; Wu, C.-S.; Yazinski, S.A.; Nguyen, H.D.; Liu, S.; Jiménez, A.E.; Jin, J.; Zou, L. PRP19 Transforms into a Sensor of RPA-ssDNA after DNA Damage and Drives ATR Activation via a Ubiquitin-Mediated Circuitry. *Mol. Cell* **2014**, *53*, 235–246. [[CrossRef](#)]
101. Tsai, Y.-C.; Græco, T.M.; Boonmee, A.; Miteva, Y.; Cristea, I.M. Functional Proteomics Establishes the Interaction of SIRT7 with Chromatin Remodeling Complexes and Expands Its Role in Regulation of RNA Polymerase I Transcription. *Mol. Cell. Proteom.* **2012**, *11*, 60–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Colland, F.; Jacq, X.; Trouplin, V.; Mouglin, C.; Groizeleau, C.; Hamburger, A.; Meil, A.; Wojcik, J.; Legrain, P.; Gauthier, J.-M. Functional Proteomics Mapping of a Human Signaling Pathway. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1324–1332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Llères, D.; Denegri, M.; Biggiogera, M.; Ajuh, P.; Lamond, A.I. Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 445–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Lipp, J.J.; Marvin, M.C.; Shokat, K.M.; Guthrie, C. SR protein kinases promote splicing of nonconsensus introns. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 611–617. [[CrossRef](#)]
105. Li, X.; Wang, W.; Wang, J.; Malovannaya, A.; Xi, Y.; Li, W.; Guerra, R.; Hawke, D.H.; Qin, J.; Chen, J. Proteomic analyses reveal distinct chromatin-associated and soluble transcription factor complexes. *Mol. Syst. Biol.* **2015**, *11*, 775. [[CrossRef](#)]
106. Baranes-Bachar, K.; Levy-Barda, A.; Oehler, J.; Reid, D.A.; Soria-Bretones, I.; Voss, T.C.; Chung, D.; Park, Y.; Liu, C.; Yoon, J.B.; et al. The Ubiquitin E3/E4 Ligase UBE4A Adjusts Protein Ubiquitylation and Accumulation at Sites of DNA Damage, Facilitating Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 866–878.e7. [[CrossRef](#)]

107. Mulder, M.P.; Witting, K.; Berlin, I.; Pruneda, J.N.; Wu, K.-P.; Chang, J.-G.; Merckx, R.; Bialas, J.; Groettrup, J.B.M.; Vertegaal, A.C.; et al. A cascading activity-based probe sequentially targets E1–E2–E3 ubiquitin enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 523–530. [[CrossRef](#)]
108. Schwarz, S.E.; Rosa, J.L.; Scheffner, M. Characterization of Human hect Domain Family Members and Their Interaction with UbcH5 and UbcH7. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12148–12154. [[CrossRef](#)]
109. Pao, K.-C.; Wood, N.T.; Knebel, A.; Rafie, K.; Stanley, M.; Mabbitt, P.D.; Sundaramoorthy, R.; Hofmann, K.; Van Aalten, D.M.F.; Virdee, S. Activity-based E3 ligase profiling uncovers an E3 ligase with esterification activity. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *556*, 381–385. [[CrossRef](#)]
110. Sowa, M.E.; Bennett, E.J.; Gygi, S.P.; Harper, J.W. Defining the Human Deubiquitinating Enzyme Interaction Landscape. *Cell* **2009**, *138*, 389–403. [[CrossRef](#)]
111. Georges, A.; Coyaud, E.; Marcon, E.; Greenblatt, J.; Raught, B.; Frappier, L. USP7 Regulates Cytokinesis through FBXO38 and KIF20B. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 2724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Yu, C.-C.; Yang, J.-C.; Chang, Y.-C.; Chuang, J.-G.; Lin, C.-W.; Wu, M.-S.; Chow, L.-P. VCP Phosphorylation-Dependent Interaction Partners Prevent Apoptosis in Helicobacter pylori-Infected Gastric Epithelial Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Abbasi, S.; Schild-Poulter, C. Mapping the Ku Interactome Using Proximity-Dependent Biotin Identification in Human Cells. *J. Proteome Res.* **2018**, *18*, 1064–1077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Junttila, M.R.; Evan, G.I. p53—A Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 821–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Chen, D.; Kon, N.; Zhong, J.; Zhang, P.; Yu, L.; Gu, W. Differential Effects on ARF Stability by Normal versus Oncogenic Levels of c-Myc Expression. *Mol. Cell* **2013**, *51*, 46–56. [[CrossRef](#)]
116. Murphy, D.J.; Junttila, M.R.; Pouyet, L.; Karnezis, A.; Shchorr, K.; Bui, D.A.; Brown-Swigart, L.; Johnson, L.; Evan, G.I. Distinct Thresholds Govern Myc's Biological Output In Vivo. *Cancer Cell* **2008**, *14*, 447–457. [[CrossRef](#)]
117. Girino, P.A.; Burger, L.; Seebacher, J.; Iesmantavicius, V.; Schübeler, D. Cell cycle-resolved chromatin proteomics reveals the extent of mitotic preservation of the genomic regulatory landscape. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)]
118. Velimezi, G.; Lontos, M.; Vougas, K.; Roumeliotis, T.; Bartkova, J.; Sideridou, M.; Dereli-Oz, A.; Kocylowski, M.; Pateras, I.S.; Evangelou, K.; et al. Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 967–977. [[CrossRef](#)]
119. Mailand, N.; Bekker-Jensen, S.; Fastrup, H.; Melander, F.; Bartek, J.; Lukas, C.; Lukas, J. RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* **2007**, *131*, 887–900. [[CrossRef](#)]
120. Li, M.; Brooks, C.L.; Kon, N.; Gu, W. A Dynamic Role of HAUSP in the p53-Mdm2 Pathway. *Mol. Cell* **2004**, *13*, 879–886. [[CrossRef](#)]
121. Zhu, Q.; Sharma, N.; Qianzheng, Z.; Wani, G.; A Wani, A. USP7 deubiquitinase promotes ubiquitin-dependent DNA damage signaling by stabilizing RNF168. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 1413–1425. [[CrossRef](#)]
122. Doil, C.; Mailand, N.; Bekker-Jensen, S.; Menard, P.; Larsen, D.H.; Pepperkok, R.; Ellenberg, J.; Panier, S.; Durocher, D.; Bartek, J.; et al. RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins. *Cell* **2009**, *136*, 435–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Felsenfeld, G.; Groudine, M. Controlling the double helix. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *421*, 448–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Roberts, C.W.M.; Orkin, S.H. The SWI/SNF complex—Chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 133–142. [[CrossRef](#)]
125. Vignali, M.; Hassan, A.H.; Neely, K.E.; Workman, J.L. ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 1899–1910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Zhu, S.; Beaulaurier, J.; Deikus, G.; Wu, T.P.; Strahl, M.; Hao, Z.; Luo, G.; Gregory, J.A.; Chess, A.; He, C.; et al. Mapping and characterizing N6-methyladenine in eukaryotic genomes using single-molecule real-time sequencing. *Genome Res.* **2018**, *28*, 1067–1078. [[CrossRef](#)]
127. Kirmizis, A. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1592–1605. [[CrossRef](#)]
128. Wang, H.; Wang, L.; Erdjument-Bromage, H.; Vidal, M.; Tempst, P.; Jones, R.S.; Zhang, Y. Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *431*, 873–878. [[CrossRef](#)]

129. Scheuermann, J.C.; Alonso, A.G.D.A.; Oktaba, K.; Ly-Hartig, N.; McGinty, R.K.; Fraterman, S.; Wilm, M.; Muir, T.W.; Müller, J. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *465*, 243–247. [[CrossRef](#)]
130. Kloet, S.L.; Makowski, M.M.; Baymaz, H.L.; Van Voorthuijsen, L.; Katemaker, I.D.; Santanach, A.; Jansen, P.W.; Di Croce, A.S.L.; Vermeulen, M. The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 682–690. [[CrossRef](#)]
131. Hoischen, A.; Van Bon, B.W.; Rodríguez-Santiago, B.; Gilissen, C.; Vissers, L.E.L.M.; De Vries, P.; Janssen, I.; Van Lier, B.; Hastings, R.; Smithson, S.E.; et al. De novo nonsense mutations in ASXL1 cause Bohring-Opitz syndrome. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 729–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Henderson, J.M.; Nisperos, S.V.; Weeks, J.; Ghulam, M.; Marin, I.; Zayas, R.M. Identification of HECT E3 ubiquitin ligase family genes involved in stem cell regulation and regeneration in planarians. *Dev. Biol.* **2015**, *404*, 21–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Hagiwara, N.; Yeh, M.; Liu, A. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Dev. Dyn.* **2007**, *236*, 2062–2076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Krah, N.M.; De La O, J.-P.; Swift, G.H.; Hoang, C.Q.; Willet, S.G.; Pan, F.C.; Cash, G.M.; Bronner, M.P.; Wright, C.V.; Macdonald, R.J.; et al. The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife* **2015**, *4*, e07125. [[CrossRef](#)]
135. Borromeo, M.D.; Meredith, D.M.; Castro, D.S.; Chang, J.C.; Tung, K.-C.; Guillemot, F.; Johnson, J.E. A transcription factor network specifying inhibitory versus excitatory neurons in the dorsal spinal cord. *Development* **2014**, *141*, 2803–2812. [[CrossRef](#)]
136. Lelièvre, E.; Lek, M.; Boije, H.; Houille-Vernes, L.; Brajeul, V.; Slembrouck, A.; Roger, J.; Sahel, J.-A.; Matter, J.-M.; Senlaub, F.; et al. Ptf1a/Rbpj complex inhibits ganglion cell fate and drives the specification of all horizontal cell subtypes in the chick retina. *Dev. Biol.* **2011**, *358*, 296–308. [[CrossRef](#)]
137. Miller, K.J.; Steshina, E.Y.; Iskusnykh, I.Y.; Chizhikov, V.V. Transformation of the cerebellum into more ventral brainstem fates causes cerebellar agenesis in the absence of Ptf1a function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, E1777–E1786. [[CrossRef](#)]
138. Ilyas, M.; Mir, A.; Efthymiou, S.; Houlden, H. The genetics of intellectual disability: Advancing technology and gene editing. *F1000Research* **2020**, *9*, 22. [[CrossRef](#)]
139. Mendicino, A.; Sabbadini, G.; Pergola, M.S. Clark—Baraitser syndrome: Report of a new case and review of the literature. *Clin. Dysmorphol.* **2005**, *14*, 133–135. [[CrossRef](#)]
140. Louie, R.J.; Friez, M.J.; Skinner, C.; Baraitser, M.; Clark, R.D.; Schwartz, C.E.; Stevenson, R.E. Clark-Baraitser syndrome is associated with a nonsense alteration in the autosomal gene TRIP12. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2019**, *182*, 595–596. [[CrossRef](#)]
141. Doco-Ferzy, M.; Landais, E.; Andrieux, J.; Schneider, A.; Delemer, B.; Sulmont, V.; Melin, J.-P.; Ploton, M.; Thevenard, J.; Monboisse, J.-C.; et al. Deletion 2q36.2q36.3 with multiple renal cysts and severe mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.* **2008**, *51*, 598–607. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Lelieveld, S.H.; Reijnders, M.R.E.; Pfundt, R.; Yntema, H.G.; Kamsteeg, E.-J.; De Vries, P.; De Vries, B.B.A.; Willemsen, M.H.; Kleefstra, T.; Löhner, K.; et al. Meta-analysis of 2104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 1194–1196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Iossifov, I.; O’Roak, B.J.; Sanders, S.J.; Ronemus, M.; Krumm, N.; Levy, D.; Stessman, H.A.; Witherspoon, K.T.; Vives, L.; Patterson, K.E.; et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *515*, 216–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. O’Roak, B.J.; Stessman, H.A.; Boyle, E.A.; Witherspoon, K.T.; Martin, B.; Lee, C.; Vives, L.; Baker, C.; Hiatt, J.B.; Nickerson, D.A.; et al. Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–6. [[CrossRef](#)]
145. Zhang, J.; Gambin, T.; Yuan, B.; Szafranski, P.; Rosenfeld, J.A.; Al Balwi, M.; Alswaid, A.; Al-Gazali, L.; Al Shamsi, A.M.; Komara, M.; et al. Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin-protein ligase gene TRIP12 causes intellectual disability with or without autism spectrum disorders, speech delay, and dysmorphic features. *Qual. Life Res.* **2017**, *136*, 377–386. [[CrossRef](#)]
146. Takata, A.; Miyake, N.; Tsurusaki, Y.; Fukai, R.; Miyatake, S.; Koshimizu, E.; Kushima, I.; Okada, T.; Morikawa, M.; Uno, Y.; et al. Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 734–747. [[CrossRef](#)]

147. Ruzzo, E.K.; Pérez-Cano, L.; Jung, J.Y.; Wang, L.K.; Kashef-Haghighi, D.; Hartl, C.; Singh, C.; Xu, J.; Hoekstra, J.N.; Leventhal, O.; et al. Inherited and De Novo Genetic Risk for Autism Impacts Shared Networks. *Cell* **2019**, *178*, 850–866.e26. [[CrossRef](#)]
148. Stessman, H.A.F.; Xiong, B.; Coe, B.P.; Wang, T.; Hoekzema, K.; Fenckova, M.; Kvarnung, M.; Gerds, J.; Trinh, S.; Coemans, N.; et al. Targeted sequencing identifies 91 neurodevelopmental-disorder risk genes with autism and developmental-disability biases. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 515–526. [[CrossRef](#)]
149. Cerami, E.; Gao, J.; Dogrusoz, U.; Gross, B.E.; Sumer, S.O.; Aksoy, B.A.; Jacobsen, A.; Byrne, C.J.; Heuer, M.L.; Larsson, E.; et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1. *Cancer Discov.* **2012**, *2*, 401–404. [[CrossRef](#)]
150. Gao, J.; Aksoy, B.A.; Dogrusoz, U.; Dresdner, G.; Gross, B.; Sumer, S.O.; Sun, Y.; Jacobsen, A.; Sirha, R.; Larsson, E.; et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Sci. Signal.* **2013**, *6*, pii. [[CrossRef](#)]
151. Yoo, N.J.; Park, S.W.; Lee, S.H. Frameshift mutations of ubiquitination-related genes HERC2, HERC3, TRIP12, UBE2Q1 and UBE4B in gastric and colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Pathology* **2011**, *43*, 753–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Hein, R.; Network, T.G.; Flesch-Janys, D.; Dahmen, N.; Beckmann, L.; Lindström, S.; Schoof, N.; Czene, K.; Mittelstraß, K.; Illig, T.; et al. A genome-wide association study to identify genetic susceptibility loci that modify ductal and lobular postmenopausal breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy use: A two-stage design with replication. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *138*, 529–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Li, G.; Yi, S.; Yang, F.; Zhou, Y.; Ji, Q.; Cai, J.; Mei, Y. Identification of mutant genes with high-frequency, high-risk, and high-expression in lung adenocarcinoma. *Thorac. Cancer* **2014**, *5*, 211–218. [[CrossRef](#)]
154. Cacheux, W.; Dangles-Marie, V.; Rouleau, E.; Lazartigues, J.; Girard, E.; Briaux, A.; Mariani, P.; Richon, S.; Vacher, S.; Buecher, B.; et al. Exome sequencing reveals aberrant signalling pathways as hallmark of treatment-naïve anal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *9*, 464–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Shiba, N.; Yoshida, K.; Hara, Y.; Yamato, G.; Shiraishi, Y.; Matsuo, H.; Okuno, Y.; Chiba, K.; Tanaka, H.; Kaburagi, T.; et al. Transcriptome analysis offers a comprehensive illustration of the genetic background of pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 3157–3169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Sakamoto, H.; Attiye, M.; Gerold, J.M.; Makohon-Moore, A.P.; Hayashi, A.; Hong, J.; Kappagantula, R.; Zhang, L.; Melchor, J.P.; Reiter, J.G.; et al. The Evolutionary Origins of Recurrent Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 792–805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Gao, P.; Jin, Z.; Cheng, Y.; Cao, X. RNA-Seq analysis identifies aberrant RNA splicing of TRIP12 in acute myeloid leukemia patients at remission. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 9585–9590. [[CrossRef](#)]
158. Horvat, A.; Noto, J.M.; Ramachandirin, B.; Zaika, E.; Palrasu, M.; Wei, J.; Schneider, B.G.; El-Rifai, W.; Peek, R.M.; Zaika, A.I. Helicobacter pylori pathogen regulates p14ARF tumor suppressor and autophagy in gastric epithelial cells. *Oncogene* **2018**, *37*, 5054–5065. [[CrossRef](#)]
159. Wang, L.; Zhang, P.-J.; Molkentine, D.P.; Chen, C.; Molkentine, J.; Piao, H.; Raju, U.; Zhang, J.; Valdecana, D.R.; Taylor, R.C.; et al. TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene* **2016**, *36*, 820–828. [[CrossRef](#)]
160. Molkentine, J.M.; Molkentine, D.P.; Bridges, K.A.; Xie, T.; Yang, L.; Sheth, A.; Heffernan, T.P.; Clump, D.A.; Faust, A.Z.; Ferris, R.L.; et al. Targeting DNA damage response in head and neck cancers through abrogation of cell cycle checkpoints. *Int. J. Radiat. Biol.* **2020**, 1–8. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 3 : Discussion et conclusion générale

Discussion

L'ensemble de mes travaux de thèse propose TRIP12 comme une protéine majeure de l'homéostasie de la chromatine. Des altérations de son niveau d'expression ont des répercussions sur l'organisation du génome, les mécanismes de détection des dommages à l'ADN et sur la carcinogénèse pancréatique.

I. L'analyse du proxisome de TRIP12

L'identification des partenaires de TRIP12 par une approche de BioID m'a permis d'identifier de nombreuses protéines (327) situées à proximité de TRIP12 (dans un rayon d'environ 15 nm). Ces données ouvrent autant de nouvelles voies de recherche sur l'implication de TRIP12 dans la régulation de processus nucléaires. Dans l'article n°1 et les résultats complémentaires, je me suis focalisée sur la relation entre TRIP12 et MDC1. Toutefois, d'autres protéines identifiées se révèlent être des pistes très intéressantes qui demandent qu'à être investiguées. Par exemple, le variant d'histone H2A.Z est l'interactant le plus enrichi ($\log_2(\text{FC})=5,19$ et $-\log_{10}(\text{p-value})=2,26$). H2A.Z est déposée sur la chromatine par les protéines SRCAP (Snf2 Related CREBBP Activator Protein) et p400 qui sont également retrouvées dans le proxisome de TRIP12 (respectivement $\log_2(\text{FC})=3,23$ et $-\log_{10}(\text{p-value})=3,70$ et $\log_2(\text{FC})=2,84$ et $-\log_{10}(\text{p-value})=5,02$). H2A.Z est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que la réparation des dommages à l'ADN. Au niveau des cassures, H2A.Z est incorporée par p400 ce qui entraîne une relaxation de la chromatine et facilite la réparation des dommages²⁷¹. H2A.Z est également important pour l'homéostasie de l'hétérochromatine. En effet, une forme mono-ubiquitinée d'H2A.Z par RING1B est enrichie au niveau de l'hétérochromatine facultative²⁷² et prévient une propagation aberrante de l'hétérochromatine chez la Levure²⁷³. Quatre autres résidus lysine ubiquitinés ont été identifiés sans que l'E3 ubiquitine ligase responsable ne soit connue⁹. Compte tenu de leur proximité spatiale et de la capacité de mono-ubiquitination de TRIP12¹⁸⁰, H2A.Z pourrait constituer une cible potentielle de TRIP12. De plus, des études récentes suggèrent un rôle d'H2A.Z dans l'organisation 3D du génome, notamment dans la structuration des boucles « enhancer »/promoteur²⁷⁴. Considérant ces fonctions étroitement liées à celles de TRIP12, il serait pertinent de caractériser la relation entre ces deux protéines et de déterminer les conséquences d'une surexpression de TRIP12 sur les fonctions de H2A.Z.

II. L'implication de TRIP12 dans la compaction de la chromatine

Mes travaux démontrent que TRIP12 via son IDR induit la formation de condensats de chromatine de façon dépendante de la dose. L'IDR de TRIP12 est une région enrichie en résidus sérine (~20% de l'IDR), les sérines sont retrouvées enrichies dans les protéines qui interagissent avec la chromatine et sont le lieu de modifications post-traductionnelles majoritairement par phosphorylation²⁷⁵. Ces phosphorylations peuvent entraîner des altérations dans la capacité des protéines à IDR à induire une séparation de phase²⁷⁶ comme par exemple pour la protéine FUS²⁷⁷. A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences fonctionnelles des PTM de TRIP12. Il serait intéressant d'évaluer si certaines PTM de l'IDR affectent ses capacités à former des condensats de chromatine.

Le mécanisme par lequel TRIP12 induit la compaction de la chromatine implique vraisemblablement un phénomène de séparation de phase, via des interactions électrostatiques. Au sein de l'IDR, l'enchaînement des acides aminés entraîne une alternance de charges positives et négatives avec une charge globale positive (*Article n°1*). L'IDR pourrait interagir par zone de charge positive avec l'ADN et ainsi entraîner sa compaction (**Figure 37**).

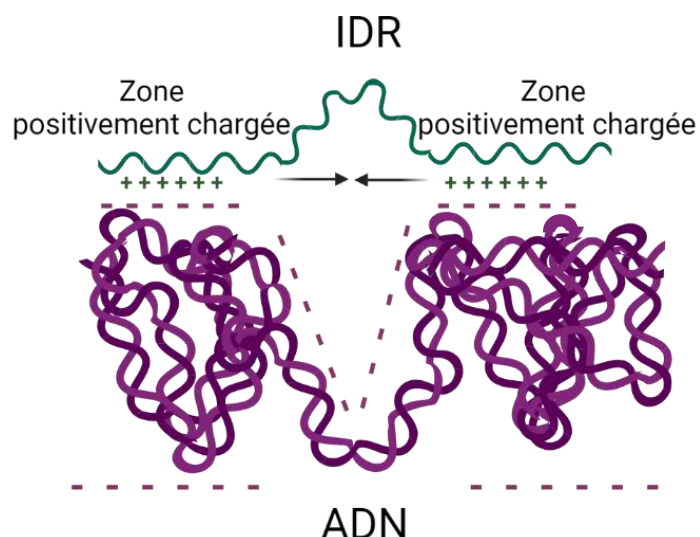


Figure 38 : Modèle hypothétique de l'induction de la compaction par l'IDR de TRIP12

Les données de l'article n°1 montrent un rôle de TRIP12 dans la compaction de la chromatine. Outre sa capacité d'induction de condensats de chromatine, d'autres arguments soutiennent ces résultats. En effet, d'après le Human Protein Atlas, les testicules sont le tissu exprimant le plus TRIP12. Des résultats préliminaires chez la souris confirment ces résultats. Au cours de la spermatogénèse, les histones sont progressivement remplacées par les protamines qui permettent de compacter plus fortement l'ADN et de réduire d'environ 40 fois le volume nucléaire comparé à un autre type cellulaire²⁷⁸. La majorité des cellules de la spermatogénèse (spermatogonies, spermatocytes et spermatides) présente un fort niveau d'expression de TRIP12¹⁹⁶. Ainsi, une forte expression de TRIP12 pourrait participer à la compaction de la chromatine dans les testicules.

Mes travaux mettent également en évidence que TRIP12 est capable de créer de la séparation de phase. Comme mentionné dans l'introduction bibliographique, le noyau des cellules eucaryotes contient des domaines fonctionnels appelés corps nucléaires. Leur formation est régie par séparation de phase¹⁴⁴. Par exemple, les corps de Cajal sont impliqués dans la maturation et la biogénèse snRNP (small nuclear ribonucleoproteins). Durant mon stage de Master 2 dans l'équipe, j'ai démontré que TRIP12 est localisée au niveau des corps de Cajal et que sa déplétion par shARN entraîne une diminution du nombre de corps de Cajal (Résultats non publiés). Ainsi, il est possible que TRIP12 participe à la formation et au maintien de ces corps nucléaires via son IDR et ses capacités de séparation de phase. D'autres expériences seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. De plus, une majorité des protéines contenues dans les corps de Cajal sont ubiquitinées²⁷⁹. Ainsi, TRIP12 pourrait ubiquitiner des protéines des corps de Cajal et favoriser leur capacité d'interaction et/ou leur propriété intrinsèque de solubilité. Par exemple, la protéine SART3 (Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3), localisée au niveau des corps de Cajal, est enrichie dans le proxisome de TRIP12 et possède onze sites d'ubiquitination. SART3 pourrait être une cible potentielle de TRIP12. Une perturbation de l'expression de TRIP12 aurait pour conséquence une altération des interactions protéines/protéines et une déstabilisation des corps de Cajal.

En plus de ses capacités de compaction de la chromatine et de son activité ubiquitine ligase sur des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (BAF57, ASXL1), il est fort probable

que TRIP12 agisse par un autre mode d'action dans l'organisation de la chromatine via son IDR. L'absence de structure tertiaire stable favorise l'interaction des IDR avec l'ADN de façon indépendante de la séquence nucléotidique. Autrement dit, les IDR ont une spécificité d'interaction pour l'ADN principalement via des interactions électrostatiques mais ne reconnaissent pas de motifs nucléotidiques précis. Vuzman & Levy décrivent que cette reconnaissance de l'ADN facilite le déplacement de protéines à IDR d'un fragment d'ADN à un autre via un mécanisme dit de « monkey-bar »²⁸⁰. Ce processus favorise le déplacement de protéines chromatinienne sur le génome²⁸¹. TRIP12 réaliserait ce type de transfert et faciliterait le recrutement de protéines impliquées dans l'homéostasie de la chromatine (*BioID, article n°1*).

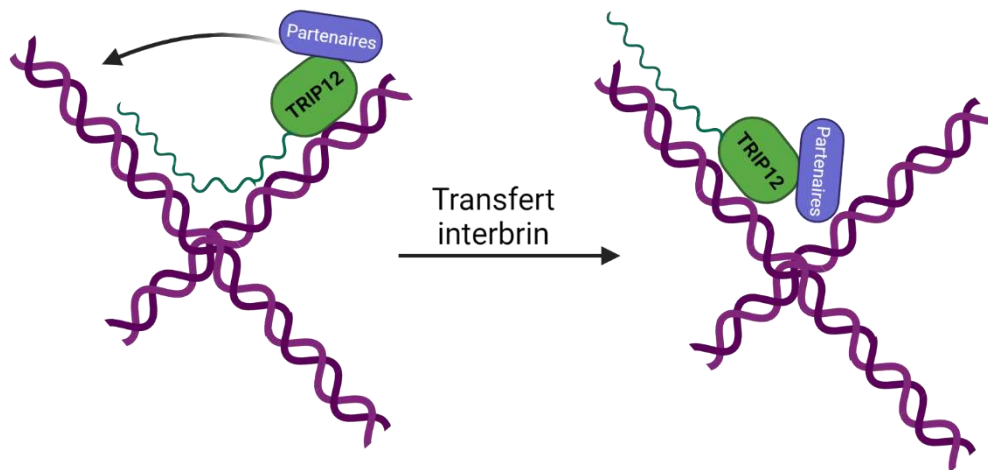


Figure 39 : Représentation schématique du mécanisme de "monkey-bar" appliquée à TRIP12

Mes découvertes sur la fonction de compaction de la chromatine de l'IDR de TRIP12 pourraient améliorer la compréhension de certaines pathologies. Par exemple, cinq mutations non-sens donnant naissance à une protéine tronquée correspondant uniquement à l'IDR de TRIP12 ont été identifiées et démontrées comme étant la cause du syndrome de déficience intellectuelle Clark-Baraister²⁶⁴. Compte tenu du rôle de TRIP12 sur l'organisation de la chromatine, il serait important de confirmer expérimentalement l'existence de ces variants et de mesurer les conséquences de leur expression sur l'architecture nucléaire et les fonctions cellulaires qui en découlent. Des recherches menées par C. Schlut-Bolard visent actuellement à caractériser la perturbation de l'architecture 3D de la chromatine dans les réarrangements chromosomiques afin d'identifier les gènes candidats dans les troubles neurodéveloppementaux dont fait partie le syndrome de Clark-Baraister²⁸². Toutefois, étant donné la rareté de ce syndrome (prévalence <1 / 1 000 000), il demeure peu étudié et encore mal diagnostiqué.

Concernant les maladies neurodégénératives, une seule étude démontre l'implication de TRIP12 dans la maladie de Parkinson via son activité d'E3 ubiquitine ligase sur la glucocérébrosidase²⁷⁰. A la vue de l'implication des protéines à IDR et de la séparation de phase dans ce type de pathologie, il n'est donc pas à exclure que TRIP12 puisse être impliquée dans cette pathologie via sa capacité d'induction de séparation de phase et participer à l'agrégation de l' α -synucléine. C'est pourquoi, il serait important d'approfondir le rôle de TRIP12 dans la maladie de Parkinson et dans toutes les maladies neurodégénératives à agrégats protéiques (Alzheimer & démence à corps de Levy)

Enfin, à ma connaissance, TRIP12 est la première protéine de la littérature dont la surexpression induit ce phénotype nucléaire macroscopique. Bien que l'IDR de MED1 similaire en taille et en

composition d'acides aminés à celui de TRIP12 n'induit pas de condensat de chromatine, je ne peux pas exclure que d'autres protéines à IDR soient capables d'induire de telles modifications de la structure de la chromatine. D'autres études seront nécessaires pour répondre à cette question.

III. L'implication de TRIP12 dans la transcription des gènes

Grâce à son activité d'E3 ubiquitine ligase, TRIP12 est un acteur de la régulation de l'expression des gènes via l'ubiquitination des facteurs de transcription SOX6, PTF1a et YY1^{187,206,208}. Étant donné le lien étroit entre organisation du génome et expression génique, TRIP12 pourrait participer à la régulation de la transcription également via la compaction induite par son IDR. Les données de RNA-seq de l'article n°1 en condition de surexpression de l'IDR de TRIP12 mettent en évidence une diminution importante de l'expression d'un grand nombre de gènes. Ces résultats auraient pu s'expliquer par les résultats d'accessibilité de la chromatine obtenus par ATAC-seq. En effet, la surexpression de l'IDR de TRIP12 conduit à une réduction globale de l'accessibilité du génome. Toutefois, je n'ai pas pu mettre en évidence de corrélation entre les données de RNA-seq et celle d'ATAC-seq. Ceci peut s'expliquer par le fait que selon les données de la littérature (*Chapitre 3. II.*), les protéines à IDR interagissent avec l'ADN de façon indépendante de la séquence nucléotidique. D'ailleurs, mes données d'ATAC-seq soutiennent cette hypothèse dans la mesure où elles n'identifient pas de sites de fixation nucléotidique spécifique de TRIP12 sur le génome. Ainsi, les sites de fixation et de compaction de TRIP12 sur le génome via son IDR vont varier d'une cellule à l'autre rendant les profils d'ATAC-seq et de RNA-seq difficilement comparables. Des analyses par RNA-seq et ATAC-seq à l'échelle de la cellule unique permettraient peut-être d'établir cette corrélation et mais aussi de déterminer si TRIP12 s'associe préférentiellement à des zones d'hétérochromatine. Malgré cela, je peux néanmoins émettre l'hypothèse selon laquelle dans des conditions de surexpression de TRIP12, la machinerie transcriptionnelle aurait un accès réduit aux régions promotrices entraînant une modification du profil d'expression des gènes. Ainsi, la surexpression de TRIP12 observée dès les stades précoces du cancer du pancréas (*Article n°2*) participerait à l'altération des profils d'expression des gènes grâce à son activité de compaction et favoriserait de cette manière la carcinogénèse pancréatique. TRIP12 contrôlerait la transcription à la fois via son activité d'E3 ubiquitine ligase et via l'action de son IDR sur la compaction de la chromatine.

IV. L'implication de TRIP12 dans l'organisation 3D du génome

Par ailleurs, à la vue des effets d'une surexpression de TRIP12 et son IDR sur l'organisation nucléaire, il est difficile de penser que TRIP12 n'affecte pas la structure 3D de la chromatine. Des analyses de l'organisation 3D du génome via les approches de « chromosome capture conformation » en modulant le niveau d'expression de TRIP12 ou d'une forme catalytiquement inactive pour s'affranchir de son activité d'E3 ubiquitine ligase apporteraient des données importantes quant au rôle de TRIP12 dans cette organisation 3D.

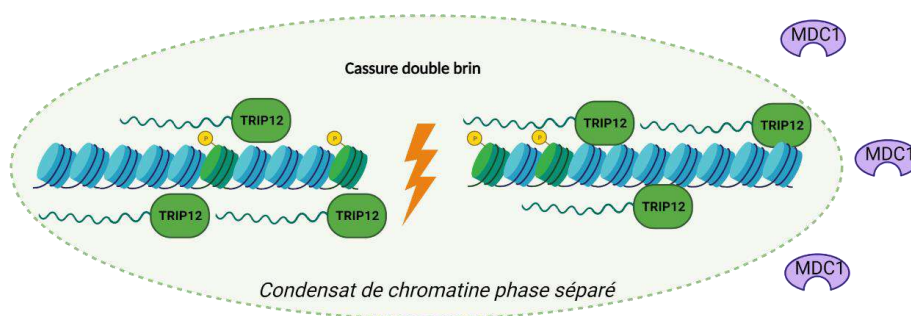
De plus, TRIP12 pourrait être impliquée dans cette organisation via son activité d'E3 ubiquitine ligase. En effet, une étude met en évidence que TRIP12 contrôle la stabilité de YY1²⁰⁸. YY1 promeut la formation des boucles de chromatine « enhancer »/promoteur, sa déplétion entraîne une perte de ce type d'interaction²²³. Des mutations faux-sens et non-sens d'YY1 sont à l'origine du syndrome de déficience intellectuelle Gabriele-de Vries²⁸³ au tableau clinique très similaire à celui du syndrome de Clark-Baraister causé par des mutations sur le gène de TRIP12. L'étude identifiant YY1 comme substrat de TRIP12 ne se focalise pas sur l'étude du génome, il serait

pertinent d'approfondir la relation TRIP12/YY1 et d'étudier les conséquences de la dérégulation d'une de ces protéines sur l'organisation des boucles « enhancer »/promoteur.

V. L'implication de TRIP12 dans la détection des dommages de l'ADN

Mes résultats complémentaires montrent qu'une surexpression de l'E3 ubiquitine ligase TRIP12 affecte l'efficacité de la détection aux dommages à l'ADN en inhibant l'accumulation de la protéine MDC1 au niveau des cassures via l'action de son IDR. L'originalité de mes travaux réside dans l'identification d'un rôle fonctionnel de l'IDR dans la détection des dommages à l'ADN. Jusqu'alors, TRIP12 était connue pour avoir un rôle inhibiteur de la réponse aux dommages de l'ADN par l'action de son domaine catalytique sur les protéines RNF168 et PARP1^{188,205}. Néanmoins, les mécanismes moléculaires mis en jeu entre l'IDR de TRIP12 et l'accumulation de MDC1 restent encore à caractériser. Plusieurs mécanismes sont envisageables. Tout d'abord, le niveau de compaction de la chromatine est un paramètre important dans l'efficacité de la réponse aux cassures de l'ADN. Ainsi, la compaction de la chromatine induite par l'IDR de TRIP12 pourrait inhiber, par encombrement stérique ou séparation de phase, l'accumulation spécifique de MDC1 au niveau des cassures de l'ADN (**Figure 39**). Un deuxième mécanisme d'action serait une interaction physique entre MDC1 et l'IDR de TRIP12. L'expérience de BioID nous a permis d'identifier MDC1 parmi les protéines les plus abondantes à proximité de TRIP12. De plus, une étude récente montre une interaction physique entre ces deux protéines via l'établissement de l'interactome de MDC1 sans caractériser, pour autant, les domaines d'interaction entre les deux protéines²⁸⁴. Enfin, au cours de mes travaux, j'ai observé une co-localisation entre les protéines GFP-MDC1 et RFP-IDR. Les protéines à IDR sont connues pour interagir avec la chromatine mais aussi avec de nombreuses protéines, grâce notamment à leur charge positive. L'ensemble de ces arguments est en faveur d'une interaction directe entre MDC1 et l'IDR de TRIP12. De cette façon, une surexpression de TRIP12 pourrait séquestrer la protéine MDC1 sur le génome via son IDR et ainsi empêcher son accumulation au niveau des cassures de l'ADN (**Figure 39**). Des expériences supplémentaires sont d'ores et déjà planifiées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

1 - Compaction induite par TRIP12 inhibe l'accumulation de MDC1



2 - Titration de MDC1 par TRIP12

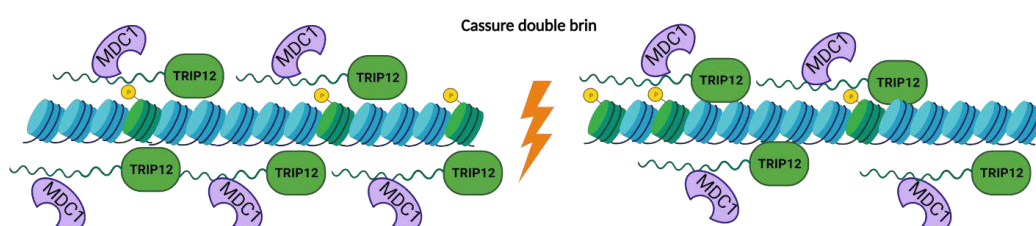


Figure 40 : Représentation schématique des mécanismes d'action possibles de TRIP12 sur l'accumulation de MDC1 au niveau des cassures de l'ADN

Un des rôles de la protéine MDC1 est sa participation au recrutement des protéines-clés de la NHEJ et de la HR que sont 53BP1 et BRCA1²⁸⁵. L'inhibition de l'accumulation de MDC1 par TRIP12 affecte l'accumulation de ces deux protéines (cf Résultats complémentaires). Toutefois, cette inhibition reste moins importante que celle de MDC1. Ceci peut potentiellement s'expliquer par le fait que 53BP1 et BRCA1 peuvent être recrutées au niveau des cassures indépendamment de MDC1. Ces deux protéines peuvent reconnaître directement les histones phosphorylées γ H2AX par leurs domaines BRCT^{286,287}. 53BP1 reconnaît également l'ubiquitination sur la lysine 15 de l'histone H2A (H2AK15ub) et la di-méthylation sur la lysine 20 de l'histone H4 (H4K20me2)²⁸⁸.

La découverte de ces mécanismes moléculaires fins devrait permettre une meilleure compréhension de processus physiopathologiques complexes. Les données de l'article n°2 mettent en évidence que TRIP12 est surexprimée de façon hétérogène dans le cancer du pancréas et ce, dès les stades préneoplasiques. Les résultats complémentaires de l'article n°1 sur la réparation des cassures de l'ADN m'amène à penser que la surexpression de TRIP12 aux stades précoces de la carcinogénèse altérerait la détection des cassures de l'ADN et favoriserait une certaine instabilité génétique avec l'apparition de mutations. En revanche, à des stades plus tardifs de la maladie (adénocarcinome), cette surexpression de TRIP12 impacterait les capacités de détection des cassures induites par les chimiothérapies et/ou radiothérapies et sensibiliserait les cellules cancéreuses pancréatiques aux différentes thérapies génératrices de cassures de l'ADN (chimiothérapies et radiothérapies). Des résultats préliminaires de l'équipe vont d'ailleurs dans ce sens. En effet, il a été démontré que des cellules cancéreuses pancréatiques MiaPACA-2 ayant un fort niveau d'expression de TRIP12, sont plus sensibles à un panel de chimiothérapies génératrices de cassures (**Figure 40**).

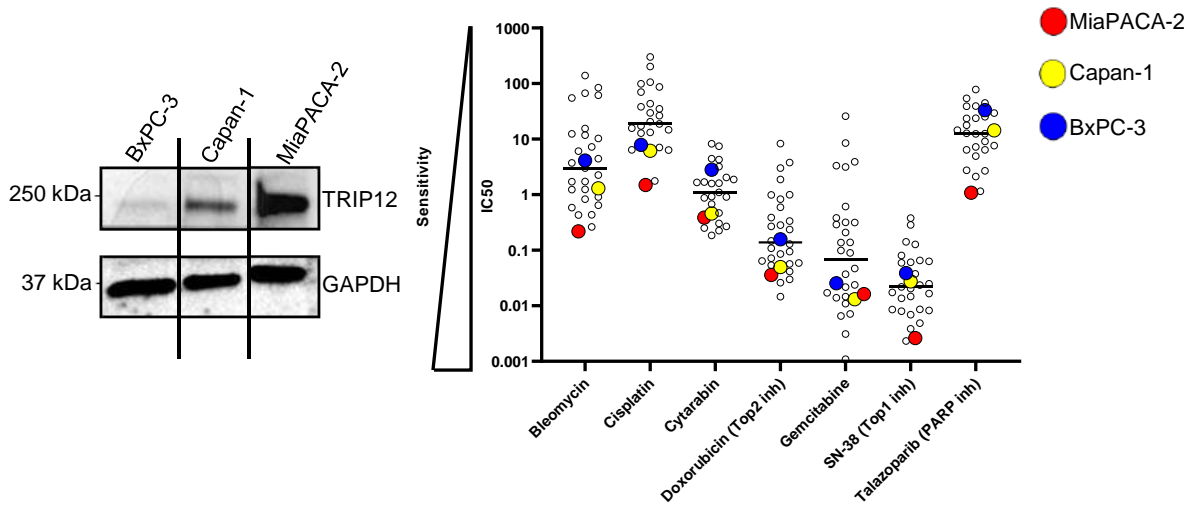


Figure 41 : Western Blot représentant l'hétérogénéité d'expression de TRIP12 dans des lignées cancéreuses et graphique représentant la sensibilité de différentes lignées cellulaires à des agents inducteurs de cassures (source : Cancerxgenes).

De plus, des cellules murines invalidées du gène Trip12 ou des cellules MiaPACA-2 déplétées par shARN de TRIP12 sont respectivement plus résistantes à la doxorubicine (*données non publiées de l'équipe*). Tout comme les altérations de gènes-clé de la DDR comme BRCA1, le niveau d'expression de la protéine TRIP12 pourrait prédire la sensibilité des tumeurs aux agents de cassures et ainsi participer à une meilleure prise en charge des patients.

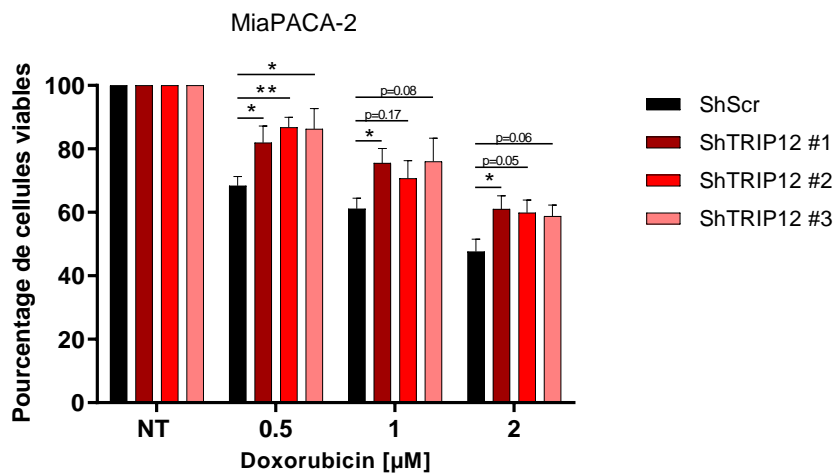


Figure 42 : Viabilité cellulaire en réponse à la doxorubicine en fonction de différents shARN ciblant TRIP12

VI. L'implication de TRIP12 dans la métaplasie acino-canaulaire

Les données de l'article n°2 démontrent que TRIP12 est faiblement exprimée dans le pancréas sain mais surexprimée dans les lésions préneoplasiques et le cancer du pancréas. Grâce au développement et à l'utilisation de modèles murins d'inactivation conditionnelle de TRIP12, nous avons démontré que TRIP12 est nécessaire pour la métaplasie acino-canaulaire (MAC), une étape cruciale dans l'initiation du cancer du pancréas. Sa déplétion entraîne une réduction de la formation des lésions préneoplasiques PanIN et réduit les capacités métastatiques de la tumeur. Lors de la métaplasie acino-canaulaire, les acini subissent une réorganisation de leur chromatine associée à une modification de leur transcriptome avec pour conséquence un changement

phénotypique. TRIP12 est impliquée dans cette réorganisation grâce à son activité d'E3 ubiquitine ligase. En effet, TRIP12 contrôle la stabilité de BAF57 et d'ASXL1 qui sont des protéines essentielles dans le remodelage de la chromatine (Chapitre 1 Partie 3.II.b). De plus, les données de l'article n°1 mettent en évidence que TRIP12 participe au contrôle de l'état de compaction de la chromatine. Au regard de ces éléments, TRIP12, en plus de son rôle sur PTF1a et FBW7, pourrait contribuer à une dérégulation des profils transcriptomiques durant la MAC via son IDR et/ou son activité d'E3 ubiquitine ligase. Une hypothèse serait que TRIP12, favorise le programme de différenciation des cellules acineuses. Via son activité ubiquitine ligase, TRIP12 diminuerait le niveau d'ASXL1 et augmenterait indirectement de la marque répressive H2AK119Ub déposée par PRC1 (Chapitre 1 Partie.1.d.iii). Benitz et al. ont démontré que H2AK119ub est nécessaire pour réprimer l'expression du gène d'identité acinaire qu'est PTF1a lors de la MAC¹⁰¹. Cela permettrait la répression des gènes acinaires et favoriserait la MAC. Pour vérifier ceci, je pourrais mesurer, par immunohistochimie et ChIP-seq, la marque répressive H2AK119Ub ou le niveau d'ASXL1 en fonction des niveaux de TRIP12 ainsi que le profil transcriptomique.

Conclusion générale

Pour conclure, mes travaux de thèse apportent de nouvelles connaissances sur l'implication de TRIP12 dans la régulation de l'homéostasie de la chromatine et sur son rôle dans la carcinogénèse pancréatique. Les aspects fondamentaux sur la compaction de la chromatine induite par TRIP12 pourraient ainsi servir à terme, à ce que le niveau de TRIP12 soit utilisé comme marqueur prédictif de réponses aux chimiothérapies mais également à mieux comprendre l'implication de cette E3 ubiquitine ligase dans le développement des pathologies comme le cancer du pancréas et les maladies neurodégénératives.

Annexes

I. Annexe 1 : The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**
nature research

OPEN

The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability

D. Larrieu¹, M. Brunet¹, C. Vargas¹, N. Hanoun¹, L. Ligat¹, L. Dagnon¹, H. Lulka¹, R. M. Pommier², J. Selves², B. E. Jády³, L. Bartholin², P. Cordelier¹, M. Dufresne¹ & J. Torrisani^{1*}

Several studies have linked the E3 ubiquitin ligase TRIP12 (Thyroid hormone Receptor Interacting Protein 12) to the cell cycle. However, the regulation and the implication of this protein during the cell cycle are largely unknown. In this study, we show that TRIP12 expression is regulated during the cell cycle, which correlates with its nuclear localization. We identify an euchromatin-binding function of TRIP12 mediated by a N-terminal intrinsically disordered region. We demonstrate the functional implication of TRIP12 in the mitotic entry by controlling the duration of DNA replication that is independent from its catalytic activity. We also show the requirement of TRIP12 in the mitotic progression and chromosome stability. Altogether, our findings show that TRIP12 is as a new chromatin-associated protein with several implications in the cell cycle progression and in the maintenance of genome integrity.

TRIP12 (Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 12) is a 225 kDa HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) domain-containing E3 ubiquitin ligase. It is also known as ULF (Ubiquitin Ligase for ARF)¹ and UFD4 (Ubiquitin Fusion Degradation) in *S. cerevisiae*². TRIP12 contains protein interacting WW (tryptophan and glutamate conserved residues) and β -ARM (β -Armadillo) domains³. Several functions are attributed to TRIP12. For instance, it ubiquitinates APP-BP1 (Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1) and BAF57 (Brg1-Associated Factor 57) turn over and is therefore described as a sensor of SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) complex integrity^{4,5}. TRIP12 is also known to control the histone ubiquitination after DNA breakage⁶ and to contribute to p14/ARF (Alternate Reading Frame) degradation in response to DNA damage⁷. TRIP12 ensures the proteolysis of ASLX1 (Additional Sex Combs Like 1, Transcriptional Regulator), a regulatory component of the ubiquitin hydrolase BAP1 (BRCA1 Associated Protein 1)⁸. We showed that TRIP12 is implicated in the proteasome-mediated degradation of the transcription factor PTF1a (Pancreas specific Transcription Factor 1a) that plays an important role in the maintenance of the acinar phenotype in human pancreas⁹. TRIP12 is essential for cell viability as a homozygous mutation that disrupts the ubiquitin ligase activity leads to murine embryonic lethality¹⁰. Importantly, TRIP12 plays an important role in the cell cycle. For instance, ^{Tripl2^{mt/mt}} ES cells display reduced growth with increased expression of the p16/CDKN2A gene and an accumulation in G₂/M phase¹⁰. Moreover, by controlling the tumor suppressor protein p14/ARF, TRIP12 impacts TP53 protein level, a major regulator of the cell cycle¹¹. TRIP12 expression is altered in several types of cancer, such as breast and pancreatic cancer¹¹. High expression of TRIP12 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma after surgical resection¹². TRIP12 is involved in radio-sensitization of head and neck squamous carcinoma¹³. TRIP12 mutations are also related to autism disorders¹⁴ and intellectual disability¹⁵.

Cell cycle progression is governed by sequentially organized events. Mitogen signaling pathways impose to the cell the exit of G₁ phase to duplicate its genome. The licensing of replication (Minute Chromosome Maintenance) to form the pre-replication complex (pre-RC). In S phase, the origins firing is dependent of the assembly of other proteins and the activity of CDKs (Cyclin Dependent Kinase). A multitude of additional factors are then recruited such as RPA (Replication Protein A), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and polymerases to

¹Université de Toulouse, INSERM, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, Toulouse, France. ²Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Centre de recherche en cancérologie de Lyon, Lyon, 69008, France. ³Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote du CNRS, UMR5099, Centre de Biologie Intégrative, Université Toulouse III-Paul Sabatier, Toulouse, Cedex 9, France. *email: jerome.torrisani@inserm.fr

constitute the fully functional replisome¹⁶. DNA replication is spatio-temporally ordered. Replication of euchromatin regions occurs in early S phase whereas heterochromatin regions in late S phase¹⁷. Subsequently, cells enter in a transition phase G₂ that ensures the complete DNA replication. In late G₂ phase, the initiation of mitosis is promoted by a complex comprising of the CYCLIN B1 and the Cyclin-Dependent Kinase 1 (CDK1)¹⁸. This complex is inhibited by the phosphorylation of Tyrosine 15 residue on CDK1 by the WEE1 kinase¹⁹. Chromatin condensation, separation of duplicated centrosomes and the recruitment of proteins to the kinetochores, all mark the prophase. The resulting release of chromosomes activates the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) that controls the proper segregation of chromosomes and inhibits the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) complex. In metaphase, the correct attachment of chromosomes to the kinetochores inhibits the SAC allowing for progression and ending of mitosis^{20–22}. Mitotic dysfunction leads to chromosomal instability and aneuploidy favoring the initiation of cancer²³. A prolonged activation of the SAC can provoke cell death or mitotic exit without separation of sister chromatids (anaphase slippage). Improper separation of sister chromatids (anaphase bridges) induces the formation of micronuclei, which can be at the origin of DNA damages²⁴. The succession of the different cell cycle phases requires a perfectly coordinated expression and activation of multiple proteins. This coordination is ensured by a multi-layer regulation including transcription, mRNA degradation, translation, post-translation modification and protein degradation²⁵. For instance, protein expression of CYCLIN A begins in S phase, peaks during G₂ phase and dramatically declines in mitosis. It combines a tight coordination of transcription, mRNA translation and protein degradation.

Among the proteins that participate in cell cycle regulation, a significant proportion interacts with chromatin to modulate, for instance, the transcription (*i.e.*: transcription factors) and the chromatin structure (*i.e.*: histones, chromatin remodeling complexes, condensin). These proteins can bind to chromatin by recognition to a specific DNA consensus sequence *via* different DNA-binding domains. (*i.e.*: β -Helix-Loop-Helix, zinc fingers) but also *via* intrinsically disordered regions (IDR). IDRs are protein domains that lack a stable 3D structure under physiological conditions. IDRs can be predicted from the amino acid sequence according to their physicochemical properties²⁶. They interact with DNA in a nucleotide sequence-independent manner, thereby modifying chromatin structure and regulating gene expression²⁷.

Our findings expose for the first time that TRIP12 protein expression is tightly regulated during cell cycle, and, that TRIP12 interacts with euchromatin through a new functional N-terminal domain. By means of this chromatin interaction, we further propose that TRIP12 participates in mitotic entry by controlling duration of DNA replication. We further demonstrate that TRIP12 is implicated in mitotic progression and in chromosome stability.

Results

TRIP12 expression is regulated during the cell cycle. The E3 ubiquitin ligase TRIP12 was shown to control the expression of important regulators of the cell cycle progression. However, the regulation of TRIP12 during the cell cycle is still unknown. To address this issue, HeLaS3 cells were arrested at the G₁/S boundary and released in the cell cycle (Fig. 1A). The experiment showed a maximal percentage (10.1%) of cells in early mitosis 8 h after release and a maximal percentage of cells in G₁ phase (69.6%) 11 h after release. The level of *Tripl12* mRNA was measured and did not fluctuate during the cell cycle kinetics (Fig. 1B). As a control, we measured the expression of *Cyclin B1* mRNA level that is known to be up-regulated in early S phase until G₂ phase²⁸. Similarly, *Tripl12* mRNA level did not vary in G₁, early S- and G₂-phase-enriched cell populations unlike *Cyclin B1* mRNA (Fig. 1C,D), that confirms our results (Fig. 1B).

Next, TRIP12 protein level was measured following the same kinetics (Fig. 1E). Present in S phase, TRIP12 expression gradually increases to reach a maximal expression in G₂ phase and mitosis. Interestingly, TRIP12 protein level decreased to reach a minimal expression when cells enter in G₁ phase. TRIP12 protein level was also measured in enriched cell populations in G₁, early S, and G₂ phase (Fig. 1F). As expected, TRIP12 protein was barely detected in G₁ phase, appears in early S phase to reach a maximal expression in G₂ phase. These results clearly demonstrate that TRIP12 protein expression varies throughout the cell cycle while its mRNA remains at a constant level and, they suggest that TRIP12 protein is degraded during G₁ phase, or *Tripl12* mRNA translation is tightly regulated, or a combination of both.

TRIP12 is a cell cycle-regulated nuclear protein associated with chromatin. We tested whether TRIP12 cell-cycle regulation correlated with its sub-cellular localization. First, we first showed that TRIP12 is a nuclear protein but it is not present in all cells (Figs. 2A,B and S1A). The specificity of TRIP12 nuclear staining was verified (Fig. S1B). Interestingly, TRIP12 nuclear staining did not colocalize with dense DAPI regions that correspond to peri-nuclear and peri-nucleolar heterochromatin regions (Fig. 2B), suggesting that TRIP12 preferentially colocalizes with euchromatin regions. TRIP12 nuclear localization was assessed during the cycle of asynchronous HeLaS3 cells. We found that TRIP12 is barely detectable in late G₁ cells and appears in early S phase cells reaching a maximal detection in late S and G₂ cells (Fig. 2C). TRIP12 absent-cells observed in Fig. 2B correspond to cells in G₁ phase. It is known that euchromatin regions are replicated early during S phase and are stained homogeneously after EDU incorporation. On the contrary, heterochromatin regions are replicated late in S phase and form punctiform staining with EDU. Interestingly, TRIP12 staining corresponds to DNA regions with homogenous and not punctiform EDU staining (Fig. 2C), corroborating the localization of TRIP12 on euchromatin regions (Fig. 2B). Cell cycle-dependent presence of TRIP12 in the nucleus was confirmed in G₁, early S- and G₂-phase enriched cell populations (Figs. 2D and S1C). We clearly visualized TRIP12 association with chromatin in mitotic cells in which chromatin is subject to condensation and decondensation (Fig. 2E). TRIP12-chromatin association was also confirmed by chromatin-bound protein fractionation (Fig. 2F). The colocalization with chromatin during metaphase was also observed using a HA-tagged TRIP12 construct (Fig. S2A). Chromosome spreading experiments revealed that TRIP12 colocalizes with chromatin on full-length chromosomes (Figs. 2G and S2B).

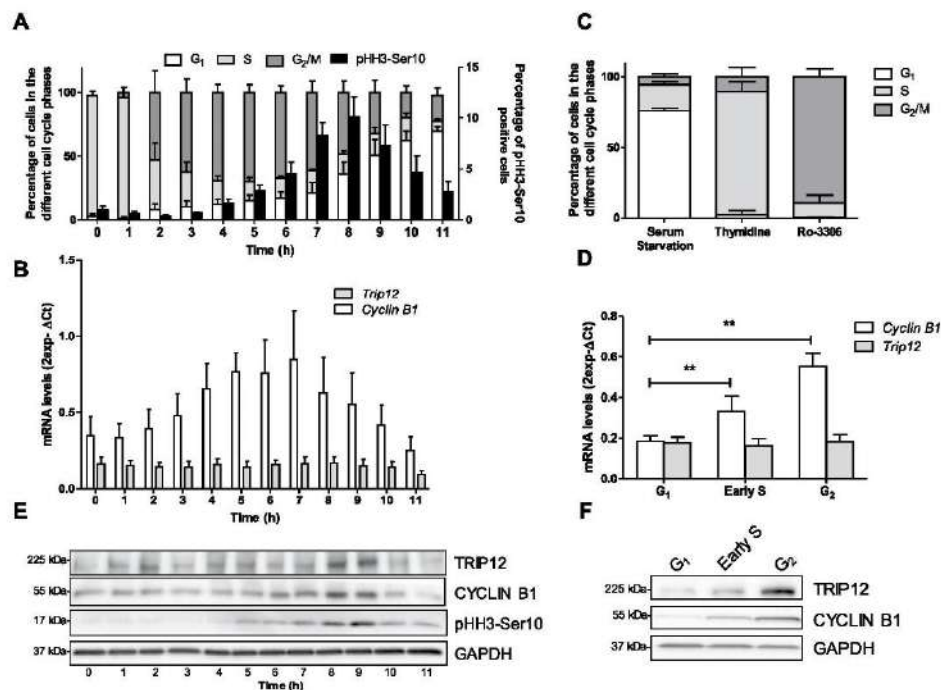


Figure 1. TRIP12 expression is regulated during the cell cycle. (A) Distribution of cells in the different phases of the cell cycle and the percentage of pHH3-Ser10 positive cells (black bars) were assessed by flow cytometry in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. The bars represent the mean \pm SEM obtained from three different experiments. (B) Expression level of *Trip12* and *Cyclin B1* mRNA was measured by RT-qPCR in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. The bars represent the mean \pm SEM of mRNA levels (expressed as $2^{\text{exp-}\Delta\text{CT}}$) obtained from three different experiments. (C) Distribution of HeLaS3 cells in the different phases of the cell cycle after serum starvation, double thymidine block and RO-3306 treatments was determined by flow cytometry. The bars represent the percentage expressed as a mean \pm SEM obtained from three different experiments. (D) Expression level of *Trip12* and *Cyclin B1* mRNA was measured by RT-qPCR in HeLaS3 cells were arrested in G₁, early S, and G₂ phase using serum starvation, double thymidine block and Ro-3306, respectively. The bars represent the mean \pm SEM of mRNA levels (expressed as $2^{\text{exp-}\Delta\text{CT}}$) obtained from three different experiments. ** indicates a p value < 0.01. (E) TRIP12, CYCLIN B1 and pHH3-Ser10 level was measured by Western blot analysis in HeLaS3 cells arrested in early S phase using a double thymidine block and released in fresh medium for the indicated times. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. (F) TRIP12 and CYCLIN B1 levels were measured by Western blot analysis in HeLaS3 cells arrested in G₁, early S and G₂ phase using serum starvation, double thymidine block and Ro-3306 treatments, respectively. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments.

TRIP12 is associated with chromatin through a N-terminal intrinsically disordered region. We identified several IDRs in the TRIP12 sequence that could potentially act as chromatin interacting-domains, notably one in the N-terminus located between the amino-acids 1 and 440 (Fig. 3A). An analysis in metaphasic cells showed that TRIP12 colocalization with chromatin is mediated by its N-terminal IDR. Whereas the deletion of the C-terminal HECT domain (TRIP12(1-1552)-GFP) does not affect the capacity of the fusion protein to colocalize with chromatin, the deletion of the IDR (TRIP12(446-1992)-GFP) abolishes it (Fig. 3B). In parallel, the subcellular localization of full-length TRIP12-GFP and four TRIP12-GFP deletion constructs in cells in interphase led us to conclude that, similar to endogenous TRIP12, TRIP12(1-1992)-GFP localizes exclusively in the nuclear compartment. More importantly, the TRIP12(1-445)-GFP localizes in the nucleus demonstrating that the N-terminal IDR is sufficient for the nuclear localization of TRIP12; suggesting that this region contains a nuclear localization signal (Fig. 3C). Moreover, IDR alone can ensure a physical direct interaction with naked DNA (Fig. 3D) and the localization of GFP on full-length metaphasic chromosomes (Figs. S2A and S3B). The

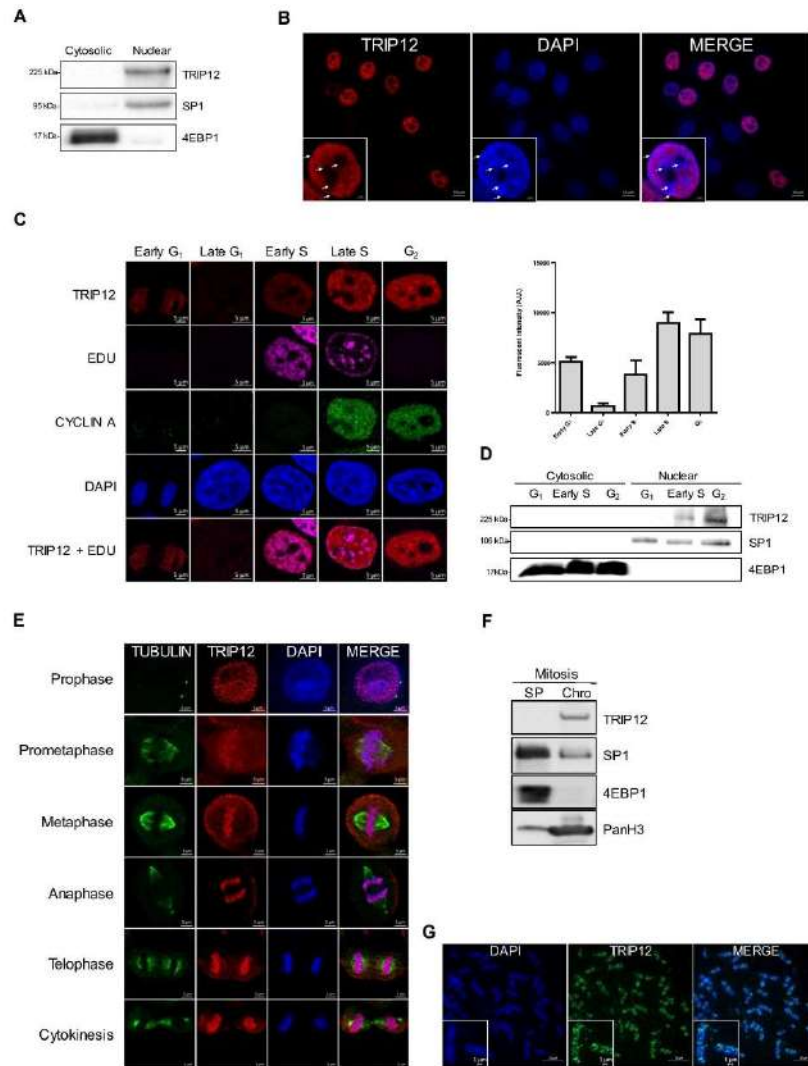


Figure 2. TRIP12 is a cell cycle-regulated nuclear protein associated with chromatin. (A) TRIP12 protein level in cytosolic and nuclear fractions of HeLaS3 cells was measured by Western blot analysis. SP1 and 4EBP1 protein levels were used as purity controls of subcellular fractions. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. (B) TRIP12 subcellular localization in HeLaS3 cells was determined by immunofluorescence using TRIP12 antibody (Sigma). The inset represents TRIP12 nuclear localization at a higher magnification. Nuclei were counterstained with DAPI. The white arrows indicate the peri-nucleolar and peri-nuclear heterochromatin regions. (C) TRIP12 nuclear expression in HeLaS3 cells in the different phases of the cell cycle was determined by immunofluorescence using TRIP12 antibody (Sigma). Nuclei were counterstained with DAPI. Cells in G₁ phase and G₂ phase correspond to CYCLIN A/EDU nuclear negative cells and CYCLIN A nuclear positive/EDU negative cells, respectively. Cells in early G₁ correspond to G₁ cells with small oblong-shaped nucleus. Cells in early S and late S phase correspond to EDU positive cells/ CYCLIN A negative and positive nuclear cells, respectively. The graph represents the mean TRIP12 expression (integrated density-background) ± SEM determined at least 200 cells using FIJI software. (D) Level of TRIP12 in cytosolic and nuclear protein fraction of G₁-, early S- and G₂-phase enriched HeLaS3 cell populations was measured by Western blot analysis. SP1 and 4EBP1 protein levels were used as purity control of subcellular

fractions. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. (E) TRIP12 and γ -TUBULIN localization in HeLaS3 cells in prophase, prometaphase, metaphase, anaphase, telophase and cytokinesis were visualized by immunofluorescence. Nuclei were counterstained with DAPI. (F) TRIP12 expression in soluble protein (SP) and chromatin-bound (Chro) protein fractions (40 μ g for each fraction) obtained from nocodazole-treated mitotic HeLaS3 cells was measured by Western blot analysis. As mitotic cells do not have nuclear membrane, SP fraction contains cytoplasmic and nuclear soluble proteins. SP1, 4EBP1 and panH3 protein levels were used as purity control of the different fractions. Images were obtained from the same experiment. (G) TRIP12 localization on metaphasic chromosomes was visualized by immunofluorescence using anti-TRIP12 antibody (Sigma) after chromosome spreading of HeLaS3 cells treated with Ro-3306 and released in the cell cycle for 45 min. DNA was counterstained with DAPI. The inset represents a magnification of TRIP12 localization on two individual chromosomes.

colocalization of TRIP12 and its IDR with chromatin was confirmed in living cells (Figs. S3C). A more precise analysis of the IDR reveals that the region between the amino acids 107 and 325 ensures the interaction of TRIP12 with chromatin (Fig. S3D,E). Interestingly, cells that express a high level of the IDR construct display characteristic features of cells in prophase with condensed chromosomes covering the inner face of the nuclear membrane (Fig. S3F) even if they are not pHH3-Ser10 positive (Fig. S3G, bottom panel) as they should be a normal cell (Top panel). This suggests that TRIP12 *via* its IDR could participate in chromatin compaction.

Altogether, our experiments identify a new functional domain of TRIP12 that permits the association of the protein with chromatin.

A deregulated expression of TRIP12 affects cell division and mitotic entry. Given that TRIP12 expression and chromatin association are cell cycle dependent, we tested the consequences of a TRIP12 ectopic over-expression on cell fate during 48 h. We found that only 26.7% (8 out of 30) of TRIP12(1-1992)-GFP cells undergo two cell divisions or more (Figs. 4A and S4A,B) with a duration in interphase of 19.2 h (Fig. 4B). The remaining 73.7% (22 out of 30) fail to achieve a single division and die (Figs. 4A and S4A,B). Remarkably, this death occurs at a time (20.1 h) that mitosis should occur (Fig. 4B) suggesting that TRIP12 overexpression is deleterious for the mitotic division. This inhibitory effect on cell division was also observed after expression of an inactive mutant as well as several TRIP12 protein domains with the exception of the IDR of TRIP12 (Figs. 4A,B and S4A–E) suggesting that the mitotic inhibitory effect of TRIP12 is independent of chromosome binding and catalytic activity. We further demonstrated that TRIP12 over-expression diminishes the percentage of cells that enter in mitosis (Fig. 4C). When we focused on TRIP12(1-1992)-GFP expressing cells that undergo cell divisions (Fig. S4A), we noticed that TRIP12 over-expression significantly delays the entry into prophase 30 min after Ro-3306 release (Fig. 4D, Graph).

The inhibitory effect of TRIP12 over-expression on mitotic entry led us to investigate the consequences of a TRIP12 depletion on mitotic entry. Toward this end, TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) cells were created using shRNAs (Fig. 5A,B). After Ro-3306 release (30 min), we microscopically observed an accelerated mitotic entry in TRIP12-depleted cells (Fig. 5C) that was associated to a higher percentage of cells in late prometaphase and metaphase (Fig. 5D). The accelerated mitotic entry was confirmed by flow cytometry-measurements of pHH3-Ser10 positive cells (Fig. 5E). A normal mitotic entry of TRIP12-depleted cells was restored by a transient expression of TRIP12 or the catalytic mutant but not by an expression of the IDR (Fig. S5A).

Altogether, these experiments reveal the important contribution of TRIP12 in mitotic entry as a deregulated expression of TRIP12 significantly impedes the proper setting of mitotic entry-regulatory mechanisms.

A shortened duration of DNA replication explains the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. We next aimed to determine the causes of the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. Mitotic entry is governed by a succession of events that leads to the condensation and the segregation of chromosomes into daughter cells. Among them, the Tyr15-dephosphorylation of CDK1 and the kinase WEE1-cytosolic translocation are essential^{29,30}. In Ro-3306 cells, we simultaneously found a decreased level of phosphorylation on CDK1-Tyr15 in the nuclear fraction of TRIP12-depleted cells and a WEE1 translocation from the nuclear to the cytosolic fraction (Figs. 6A and S5B) which provokes the accelerated entry in prophase when the Ro-3306 is removed (Fig. S5C). It is reported that the cytosolic translocation of WEE1 is mediated by CYCLIN A nuclear import which begins early during S phase to allow DNA replication *via* the activation of the kinase CDK2^{31,32}. We measured an increase in CYCLIN A expression in the nuclear fraction that is associated to a decreased expression in cytosolic fraction of these cells (Figs. 6B and S5D). This corroborates with a significant increased proportion of cells with CYCLIN A nuclear staining in TRIP12-depleted cells (Fig. 6C). The important role of CYCLIN A in DNA replication led us to investigate the status of DNA replication in CYCLIN A nuclear-positive cells. Our analyses revealed a higher percentage of TRIP12-depleted cells with achieved DNA replication (G_2 -phase cells) and therefore set for mitotic entry (Fig. 6C). More importantly, these results strongly suggest that a TRIP12 depletion accelerates DNA replication. By measuring the duration of S phase, we verified that TRIP12-depleted cells have shortened S phase as compared to controls (Fig. 6D). Euchromatin regions are replicated early during S phase when heterochromatin regions are replicated in late S phase. Interestingly, we measured in EDU-positive asynchronous cells a higher proportion of cells in late S phase in TRIP12-depleted cells demonstrating that the depletion of TRIP12 specifically accelerates the DNA replication of euchromatin regions. This result is in accordance with the fact that TRIP12 preferentially colocalizes with euchromatin regions (Fig. 2B,C).

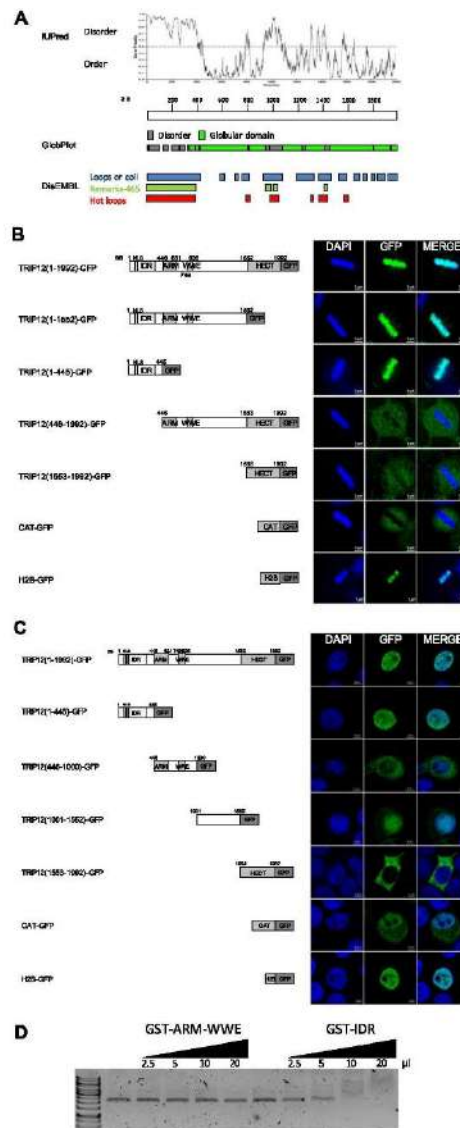


Figure 3. TRIP12 is associated with chromatin through a N-terminal intrinsically disordered region. (A) Prediction of intrinsically disordered and ordered regions in TRIP12 protein sequence (Protein accession number NP_004229.1) was determined using IUPred, GlobPlot and DisEMBL software. aa stands for amino acids. (B) GFP-fusion protein localization in metaphasic HeLaS3 cells transfected with TRIP12 (1-1992), (1-1552), (1-445), (446-1992) and (1553-1992)-GFP constructs was visualized by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. H2B-GFP and CAT-GFP constructs were used as controls. Nuclei were counterstained with DAPI. IDR stands for Intrinsically Disordered Region, NLS for Nuclear Localization Signal, ARM for β -Armadillo domain, WWE for tryptophan and glutamate enriched domain and HECT for Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus. Numbers indicate amino acids (aa) position. (C) GFP-fusion protein localization in interphasic HeLaS3 cells transfected with TRIP12 (1-1992), (1-445), (446-1000), (1001-1552) and (1553-1992)-GFP constructs was analyzed by immunofluorescence using an anti-GFP antibody. H2B-GFP and CAT-GFP constructs were used as controls. Nuclei were counterstained with DAPI. IDR stands for Intrinsically

Disordered Region, ARM for β -Armadillo domain, WWE for tryptophan and glutamate enriched domain and HECT for Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus. Numbers indicate amino acids (aa) position. (D) Interaction of increasing amounts of GST-TRIP12-ARM-WWE(446-1000) and GST-IDR(1-325) with naked plasmid DNA visualized after migration on agarose gel.

A TRIP12 depletion prolongs the SAC activation, leads to chromosome segregation defects and cell growth inhibition.

In addition to accelerate DNA replication, we observed that a TRIP12 depletion can lead to other cellular alterations such as a prolonged activation of the SAC. We observed that in control cells, the percentage of pHH3-Ser10 positive cells reaches a maximum at = 60 min before the physiological loss of pHH3-Ser10 at the metaphase-to-anaphase transition (Fig. 5E). In contrast, this percentage persists at a maximal level for 60 min (t = 30 min to t = 90 min) in TRIP12-depleted cells suggesting an inhibition of the metaphase/anaphase transition. This inhibition could be due to a prolonged activation of the SAC or a default of the APC/C complex. The use of reversine, a SAC inhibitor, proved a prolonged activation of the SAC in absence of TRIP12 (Fig. S5E). We confirmed the extended duration of prometaphase-metaphase by measuring a significantly increased duration of prometaphase (from invagination of the nuclear membrane) to metaphase in TRIP12-depleted cells (90.1 min) compared to control cells (53.5 min) (Fig. 7A,B). Additionally, we observed that TRIP12-depleted cells largely fail to transit from metaphase to anaphase (32.3% vs 3.7%). Among them, 36% exit mitosis by mitotic slippage and 64% die (Fig. 7C). Cell death and mitotic slippage are two processes by which cells overcome an extended arrest in prometaphase. A long term arrest in prometaphase and cohesion fatigue can lead to different chromosome segregation abnormalities such as the formation of chromosome laggings, anaphase bridges and alterations that are visible in interphasic cells such as micronuclei or giant nuclei (consequence of mitotic slippage). Among cells that achieve the metaphase-to-anaphase transition, our analysis revealed a higher percentage of chromosome lagging, anaphase bridges, micronuclei and giant nuclei in ShTRIP12 cells (Figs. 7D–E and S5F). These results indicate that TRIP12 also ensures the maintenance of chromosome integrity and therefore the stability of the genome.

The consequences of TRIP12 depletion on S phase duration, mitotic entry and progression led us to investigate the effects on cellular growth. Interestingly, a depletion of TRIP12 provokes a significant diminution of cell growth (30.3% after 72 h) *in vitro* (Fig. 7F) also visible by colony formation assay (Fig. 7G) and *in vivo* in SCID mouse model after sub-cutaneous injections (Fig. 7H). This reduced cell growth was associated to an accumulation of cells in G₂/M phase (Fig. 7I) that could be explained by the combination of the increased duration of prometaphase-metaphase (Fig. 7B) and the higher percentage of cells that exit mitosis by mitotic slippage with 4n DNA content (Fig. 7C). Moreover, this reduced growth is accompanied by an increased proportion of sub-G₁ cells (Fig. 7I) which could correspond to the TRIP12-depleted cells that die at the metaphase-to-anaphase transition (Fig. 7C).

Discussion

The E3 ubiquitin ligase TRIP12 was linked to the control of cell cycle regulators (*i.e.*: p14/ARF, p16/CDKN2A)¹⁰. In this study, we provide evidence that TRIP12 expression varies during the cell cycle and correlates with its nuclear localization. More importantly, we identify a functional N-terminal domain that confers to TRIP12 the capacity to strongly associate with euchromatin. We demonstrate the requirement of TRIP12 in mitotic entry by affecting the duration of S phase. Moreover, we reveal the implication of TRIP12 in the control of SAC activation, proper chromosome segregation and in cell proliferation.

In line with the implication in mitotic entry, TRIP12 over-expression and depletion alter initiation of mitosis. Therefore, fine-tuning of TRIP12 expression and/or activity is essential for the control of this phase. Similar observations are reported for other important mitotic proteins such as CYCLIN A. Indeed, CYCLIN A over-expression delays chromosome alignment and sister chromatid segregation³³. The knock down of CYCLIN A by siRNA strategy delays the entry into mitosis by postponing cells in G₂ phase³⁴. Although the mechanisms that govern its expression during the cell cycle need to be further studied, our findings indicate that *de novo* Trip12 mRNA expression is not involved. These observations corroborate the Whitfield *et al.* study, which provides an exhaustive list of HeLaS3 mRNAs that fluctuate during cell cycle³⁵. Trip12 mRNA is not present in this list. It is plausible that induction of TRIP12 protein expression in S phase could be mediated by an IRES (Internal Ribosome Entry site) dependent-translational regulation as demonstrated for *Aurora A kinase* mRNA³⁶. Comparative proteomics approaches during cell cycle identified TRIP12 as a newly synthesized protein in S phase which is in favor of a translational regulation of TRIP12 mRNA during cell cycle³⁷. Moreover, the disappearance of TRIP12 from the nucleus in G₁ phase-cells could imply its degradation by the proteasome mediated by APC/C-dependent ubiquitination as TRIP12 possesses putative KEN box (aa 1496–1570/UniProt source) and Destruction boxes (aa 859–867 and aa 1546–1554/ELM resource). This degradation mechanism may explain the decrease of TRIP12 expression. However, other actors that ensure TRIP12 stability remain to be identified. Similar to UHRF1, TRIP12 is stabilized by USP7¹². During mitosis, CDK1 initiates UHRF1 degradation by phosphorylating the USP7-interacting domain³⁸. The same mechanism could exist for TRIP12 degradation since a recent quantitative phospho-proteome approach identified serine 424 residue of TRIP12 as a CDK1 phosphorylation target³⁹. Moreover, our preliminary results are in favor of a role of USP7 in the cell cycle regulation of TRIP12. Therefore, the variation of TRIP12 expression during cell cycle likely involves different layers of regulation including translation efficiency and protein stabilization.

Another pressing question is whether TRIP12 exerts its function in mitotic entry through its catalytic activity or by protein-protein interaction. Our observations favor a catalytically-independent function (Figs. 4A,B and S4A). However, these experiments were performed in the context of over-expressing the catalytic mutant. In this

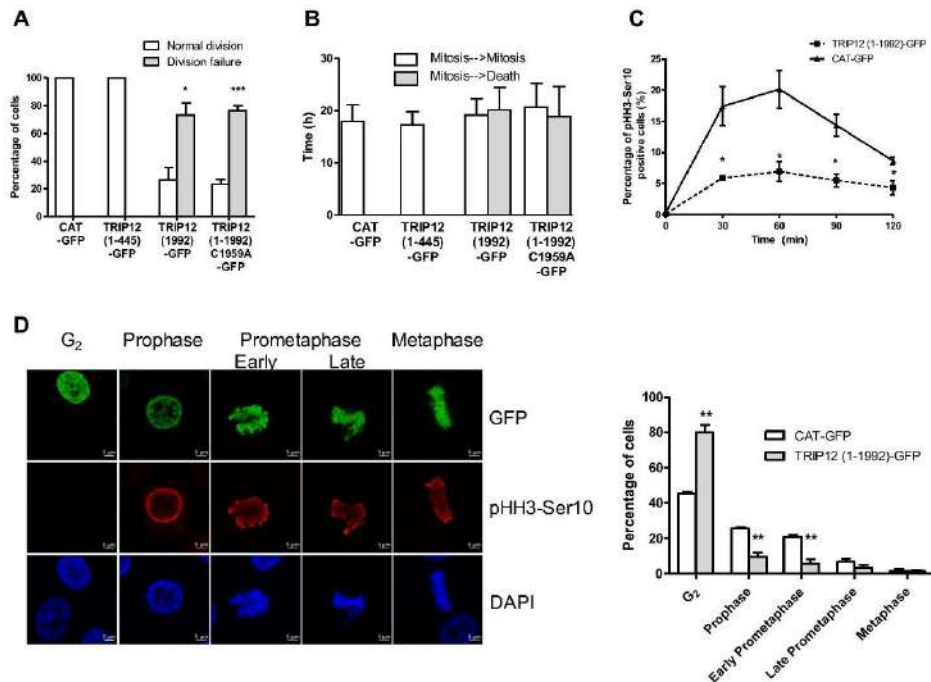


Figure 4. An over-expression of TRIP12 affects cell division by delaying mitotic entry. **(A)** The graph represents the percentage \pm SEM of GFP-cells that overcome at least two cell divisions or die over a 48h-period. * and *** indicate a p value < 0.05 and < 0.001 , respectively. **(B)** The graph represents the average duration \pm SEM in interphase between two mitoses (white bars) and between mitosis and cell death (grey bars) in the different GFP positive cells. **(C)** Percentage of pHH3-Ser10 positive HeLaS3 cells transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs and arrested by Ro-3306 treatment was assessed by flow cytometry after release in inhibitor free medium every 30 min for 2h. The graph represents the mean \pm SEM of three different experiments. * indicates a p value < 0.05 . **(D)** Proportion of cells in G₂, prophase, early prometaphase, late prometaphase and metaphase in HeLaS3 cells previously transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs was determined by immunofluorescence using anti-GFP (top panel) and anti-pHH3-Ser10 (middle panel) antibodies. Forty-eight hours after transfection, cells were arrested in G₂ phase by a Ro-3306 treatment and released in inhibitor free medium for 30 min. GFP-positive cells that were negative for pHH3-Ser10 staining were considered in G₂ phase. DNA was counterstained with DAPI. The graph represents the percentage of cells in the different phases expressed as mean \pm SEM obtained from a minimum of 300 cells of three different experiments. ** indicates a p value < 0.01 .

context, we show that an over-expression of several different TRIP12 domains (except the N-terminal domain) leads to an inhibition of cell division (Fig. S4A–E). In these conditions, we cannot entirely be certain that TRIP12 function in mitotic entry is independent of its catalytic activity. Moreover, TRIP12-GFP transfection leads to uncontrolled TRIP12 expression throughout all cell cycle phases whereas endogenous TRIP12 is tightly regulated during cell cycle. Formulation of a specific inhibitor of TRIP12 enzymatic activity would be required to definitely address this question.

We further demonstrate that TRIP12 interacts with chromatin *via* an IDR. IDRs are found in a multitude of proteins and participate in protein-, DNA-, or RNA-protein interactions^{40,41}. DNA binding proteins are significantly enriched in disordered domains in Eukaryotes⁴². Many IDRs are functional, adopting a well-defined conformation upon interaction with target molecules. IDRs constitute important regulatory regions such as the N-terminal part of histones that are subject to numerous post-translational modifications to control the chromatin compaction⁴¹. To our knowledge, TRIP12 is the first demonstrated E3 ubiquitin ligase interacting with chromatin through an IDR domain. The staining on full-length chromosomes demonstrates that TRIP12 interacts through its IDR with the entire genome suggesting a widespread role of TRIP12 on genome organization and potentially on global gene expression.

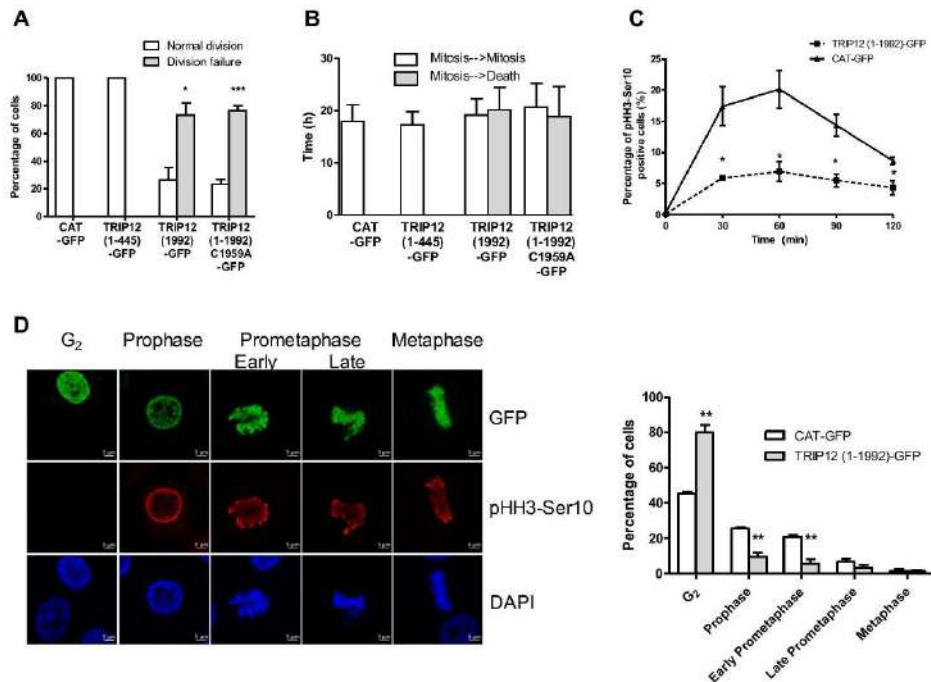


Figure 4. An over-expression of TRIP12 affects cell division by delaying mitotic entry. **(A)** The graph represents the percentage \pm SEM of GFP-cells that overcome at least two cell divisions or die over a 48h-period. * and *** indicate a p value < 0.05 and < 0.001 , respectively. **(B)** The graph represents the average duration \pm SEM in interphase between two mitoses (white bars) and between mitosis and cell death (grey bars) in the different GFP positive cells. **(C)** Percentage of pHH3-Ser10 positive HeLaS3 cells transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs and arrested by Ro-3306 treatment was assessed by flow cytometry after release in inhibitor free medium every 30 min for 2h. The graph represents the mean \pm SEM of three different experiments. * indicates a p value < 0.05 . **(D)** Proportion of cells in G₂, prophase, early prometaphase, late prometaphase and metaphase in HeLaS3 cells previously transfected with TRIP12(1-1992)-GFP or control CAT-GFP constructs was determined by immunofluorescence using anti-GFP (top panel) and anti-pHH3-Ser10 (middle panel) antibodies. Forty-eight hours after transfection, cells were arrested in G₂ phase by a Ro-3306 treatment and released in inhibitor free medium for 30 min. GFP-positive cells that were negative for pHH3-Ser10 staining were considered in G₂ phase. DNA was counterstained with DAPI. The graph represents the percentage of cells in the different phases expressed as mean \pm SEM obtained from a minimum of 300 cells of three different experiments. ** indicates a p value < 0.01 .

context, we show that an over-expression of several different TRIP12 domains (except the N-terminal domain) leads to an inhibition of cell division (Fig. S4A–E). In these conditions, we cannot entirely be certain that TRIP12 function in mitotic entry is independent of its catalytic activity. Moreover, TRIP12-GFP transfection leads to uncontrolled TRIP12 expression throughout all cell cycle phases whereas endogenous TRIP12 is tightly regulated during cell cycle. Formulation of a specific inhibitor of TRIP12 enzymatic activity would be required to definitely address this question.

We further demonstrate that TRIP12 interacts with chromatin *via* an IDR. IDRs are found in a multitude of proteins and participate in protein-, DNA-, or RNA-protein interactions^{40,41}. DNA binding proteins are significantly enriched in disordered domains in Eukaryotes⁴². Many IDRs are functional, adopting a well-defined conformation upon interaction with target molecules. IDRs constitute important regulatory regions such as the N-terminal part of histones that are subject to numerous post-translational modifications to control the chromatin compaction⁴¹. To our knowledge, TRIP12 is the first demonstrated E3 ubiquitin ligase interacting with chromatin through an IDR domain. The staining on full-length chromosomes demonstrates that TRIP12 interacts through its IDR with the entire genome suggesting a widespread role of TRIP12 on genome organization and potentially on global gene expression.

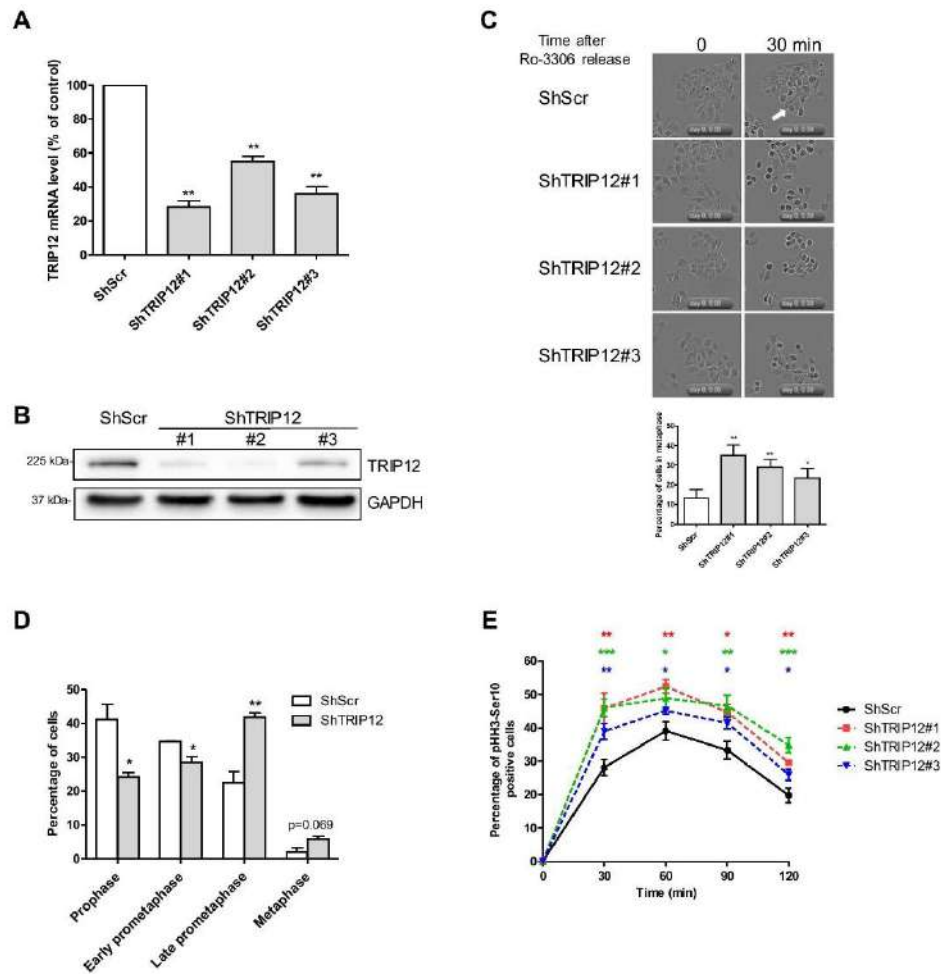


Figure 5. A TRIP12 depletion accelerates mitotic entry. (A) Expression of *Trip12* mRNA was determined by RT-qPCR in HeLaS3 cells transduced with 3 shRNAs directed against *Trip12* mRNA (ShTRIP12) or scramble control shRNA (ShScr). *β-Actin*, *Gapdh* and *Cyclophilin A* mRNA level was used for normalization. Results are the mean ± SEM obtained from three different experiments and expressed as percentage of expression compared to ShScr control cells. ** indicates a p value < 0.01. (B) Expression of TRIP12 protein in HeLaS3 ShTRIP12 and ShScr cells was determined by Western blot analysis. GAPDH protein level was used as loading control. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. (C) Percentage of cells in metaphase in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1, #2 and #3) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement (t = 0) was determined by cell live microscopy. The graph represents the percentage of cells in metaphase phenotype expressed as mean ± SEM relatively to total number of cells. A cell was considered in metaphase phenotype when the equatorial plate was microscopically visualized. A representative cell in metaphase phenotype is indicated by the white arrow. The quantification was performed from 9 different fields from three different experiments representing an average of 650 analyzed cells. * and ** indicates a p value < 0.05 and 0.01, respectively. (D) Proportion of cells in prophase, early prometaphase, late prometaphase and metaphase in TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement was determined by immunofluorescence using anti-pHH3-Ser10 antibody after 30 min. DNA was counterstained with DAPI. The graph represents the percentage of cells in the different steps of early mitosis expressed as mean ± SEM obtained from a minimum of 300 cells of three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01, respectively. (E) Percentage of pHH3-Ser10

positive cells in TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested in G₂ phase by a Ro-3306 treatment and released in the cell cycle by medium replacement was determined by flow cytometry at the indicated time. Three different ShTRIP12 (#1, #2 and #3) were used for these experiments. The results represent the mean ± SEM obtained from four different experiments. *, ** and *** indicate a p value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

We showed that TRIP12 depletion accelerates mitotic entry by shortening the DNA replication phase. DNA replication is a highly ordered process that ensures cells replicate their genome. It requires the sequential assembly of protein complexes such as the pre-replication complex, the pre-initiation complex and the replisome. TRIP12 could participate in the regulation of DNA replication by interacting or controlling the expression of replication complex components. Interestingly, TRIP12 was found in the RPA interactome⁴³. Our personal comparative proteomic analysis (SWATH-MS) identified an increased expression of the cyclin dependent kinase CDK6 in TRIP12 depleted cells (Fig. S6A–C). It is known that CDK6 activity is a critical determinant of pre-RC assembly⁴⁴. Therefore, TRIP12 could control DNA replication initiation by regulating CDK6 level. The progression through the different phases of DNA replication can also be controlled by chromatin structures⁴⁵. Our data showed that TRIP12 IDR has the capacity to modify the chromatin structure when expressed at a high level (Fig. S3F,G). It is also reported that TRIP12 associates with chromatin remodeling complex components^{4,46,47}. By modifying the structure of chromatin, TRIP12 could regulate S phase progression. In summary, it is likely that TRIP12 controls the duration of DNA replication by multiple complex mechanisms. Their complete discovery will require further investigations.

Our results strongly suggest that in addition to its role for the entry into mitosis, TRIP12 exerts other functions during the progression of mitosis. The interaction of TRIP12 on chromosomes could participate in regulating the kinetics of chromosome condensation or act as a competitor to other chromatin-interacting proteins. The identification of TRIP12 as a potential substrate of CDK1 could also support its role in chromosome condensation. Indeed, it is known that CDK1 substrates, such as CAP-D3 (Chromosome associated protein-D3), are implicated in this process^{39,48}. Moreover, histone ubiquitination varies during cell cycle progression. Both histones H2A and H2B are ubiquitinated in S and G₂ phases, deubiquitinated in prophase and then reubiquitinated in anaphase³⁹. Also, the promoter of certain active genes remains ubiquitinated during the entire mitosis to facilitate their transcriptional reactivation in post-mitosis³⁹. Although the ubiquitin ligase RNF20 is associated to genome ubiquitination, potentially TRIP12 also participates in this epigenetic modification of histones during mitosis.

Finally, our findings show that TRIP12 is localized and sequestered in the nucleus for a short duration. This strict temporal control may act to limit the period during which TRIP12 can exert its nuclear functions, precisely from S to early G₁. This is of particular importance for the TRIP12 inhibitory function on the DDR by promoting RNF168 degradation⁶. DDR is repressed during mitosis³¹ and reactivated in G₁ phase to repair DNA damages that pass the G₂/M checkpoint or created during mitosis. Given its inhibitory role on DDR and nuclear localization during the cell cycle, TRIP12 could participate in the mechanisms of DDR inhibition during mitosis by interacting with chromatin and therefore by preventing chromatin accessibility to RNF168. In contrast, TRIP12 disappearance of the nucleus in G₁ phase could be part of DDR reactivation in the cell cycle.

In this study, we provide important findings on TRIP12 regulation and its implication in cell cycle progression. More importantly, we reveal for the first time its ability to interact with specific regions of the genome which can prefigure a critical role in the organization and the expression of the genome.

Materials and Methods

Cell culture and treatment. HeLaS3 cells, HEK-293FT, HeLaS3 H2B-dsRed were grown in DMEM 4.5 g/L glucose medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), L-glutamine and antibiotics (Life Technologies) at 37 °C in humid atmosphere with 5% CO₂. HeLaS3 and HEK-293FT were obtained from the American Type Culture Collection. The HeLaS3 H2B-dsRed cell line was generated in the laboratory (see below). For serum starvation, HeLaS3 cells were seeded at 80% of confluency and cultured in DMEM 4.5 g/L glucose medium supplemented with 0.5% FCS for 72 h. For double thymidine block, HeLaS3 cells were grown in the presence of 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich) for 18 h, then in fresh medium for 8 h and further grown with thymidine for another 18 h. Treatments are as follows: HeLaS3 cells were cultured in the presence of 2 mM thymidine for 18 h, then in fresh medium for 5 h and treated with 100 ng/mL nocodazole (Sigma-Aldrich) for 5 h. HeLaS3 cells were treated with 9 μM Ro-3306 (Tocris Bioscience) for 20 h; or, cells were treated with 500 nM reversine (Sigma-Aldrich) for 2 h. HeLaS3 cells were treated with 10 μM EDU for 15 min. The EDU incorporation was visualized using the Click-It™ EdU Alexa Fluor™ 647 Imaging kit (Life Technologies). The human pancreatic hPNE hTERT cell line was obtained from Dr M. Ouellette (University of Nebraska Medical Center, NE) and grown in DMEM 75% (Life Technologies)/M3 25% (InCell Biotech) medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine and antibiotics (Life Technologies), 15 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich) and 750 mg/ml puromycin. The human pancreatic cancer cell lines BxPC-3 and Capan-2 were obtained from the American Type Culture Collection and grown in RPMI medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine and antibiotics (Life Technologies) at 37 °C in humid atmosphere with 5% CO₂.

Plasmids and transfection. The following lentivirus shRNA lentiviral plasmids were purchased from Sigma-Aldrich: pLKO1-TRC1 non mammalian shRNA control SHC002-target sequence CAACAAGATGAAGAGCA CCAA, ShTRIP12#1 pLKO1-TRC1 TRCN0000022374-target sequence CCTGAGTCAAGGAAACATGTT, ShTRIP12#2 pLKO1-TRC1 TRCN0000022375-target sequence CCGGAGTTTGAATCCACCTTT and ShTRIP12#3 pLKO1-TRC1 TRCN0000273210-target sequence CCACTACTCAGTCACCTAAAT. HeLaS3 cells

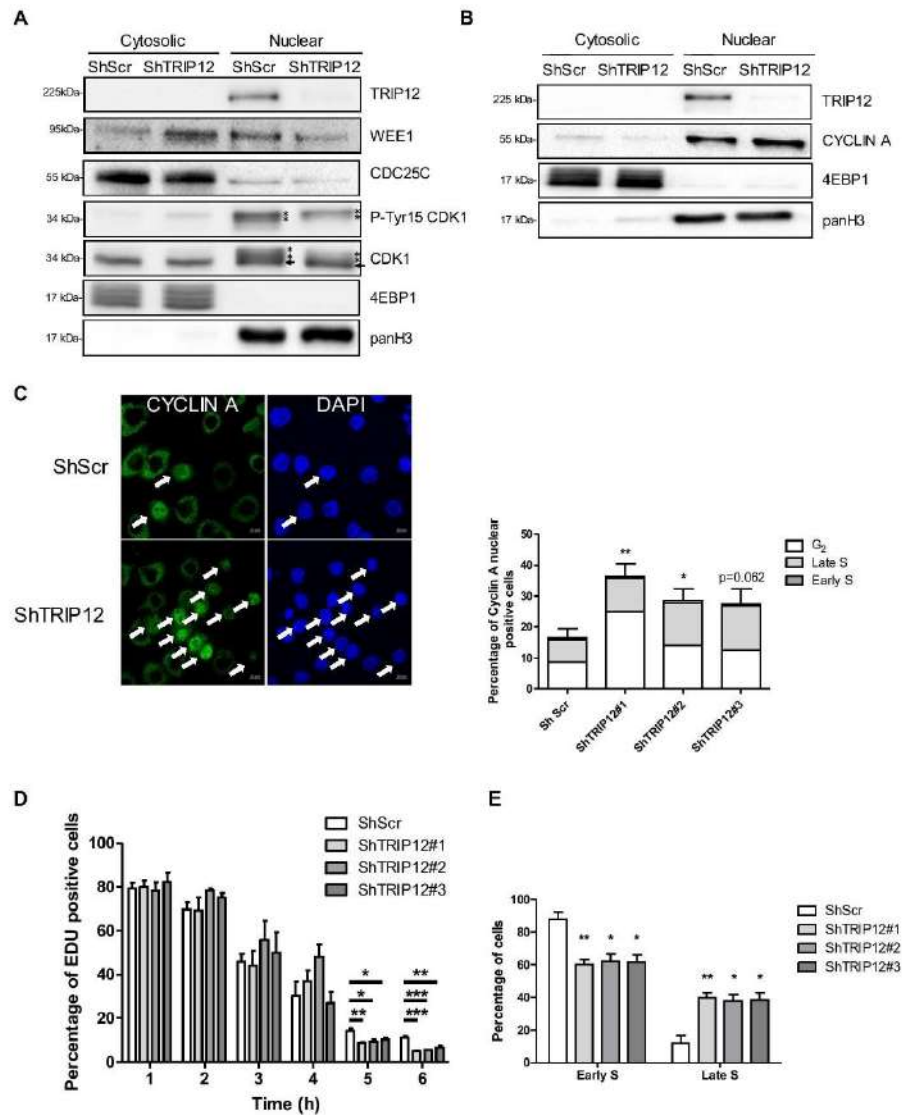


Figure 6. A shortened duration of DNA replication explains the accelerated mitotic entry of TRIP12-depleted cells. (A) TRIP12, WEE1, CDC25C and CDK1 protein and P-Tyr15-CDK1 phosphorylation levels in nuclear and cytosolic fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells after a Ro-3306 treatment were determined by Western blot analysis. 4EBP1 and panH3 protein levels were used as loading and purity controls. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. The asterisk and the arrow indicate the position of phosphorylated and non-phosphorylated forms of CDK1, respectively. (B) CYCLIN A level in nuclear and cytosolic fractions of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells after Ro-3306 treatment was determined by Western blot analysis. 4EBP1 and panH3 protein levels were used as loading and purity controls. Images were obtained from the same experiment and representative of three different experiments. (C) CYCLIN A nuclear presence in TRIP12-depleted and control cells after RO-3306 treatment was determined by immunofluorescence. The image illustrates representative cells with nuclear CYCLIN A (white arrows) or not. The graph represents the percentage of cells expressed as mean \pm SEM obtained from

three different experiments. Percentage of cells in G₂ phase (white bars), late S (light grey bars) and early S (dark grey bars) was determined by immunofluorescence using criteria defined in Fig. 2C. The bars represent the mean obtained from three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01, respectively. (D) Percentage of EDU positive cells in TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells arrested in early S phase by a double thymidine block treatment and released in the cell cycle was determined by EDU incorporation at the indicated time. The graph represents the mean ± SEM obtained from a minimum of 2500 cells for each indicated time of three different experiments. *, ** and *** indicate a p value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively. (E) Percentage of early S and late S cells in EDU-positive TRIP12-depleted (ShTRIP12) and control (ShScr) HeLaS3 cells was determined by immunofluorescence using criteria defined in Fig. 2C. The graph represents the mean ± SEM obtained from a minimum of 500 EDU-positive cells of three different experiments. * and ** indicate a p value < 0.05 and 0.01, respectively.

stably over-expressing histone H2B-dsRed fusion protein were generated after transient transfection of pCDNA₃/H2B-dsRed plasmid (kind gift from V. Lobjois, Advanced Technology Institute in Life Sciences of Toulouse, France) and selection with hygromycin (800 µg/mL). pENTA0045 plasmid containing TRIP12 cDNA (KIAA0045) was obtained from the Kasuka DNA Research Institute (Japan)³². TRIP12-GFP expressing vector was obtained by transferring TRIP12 cDNA into pCDNATM6.2/C-EmGFP-DEST vector (Life Technologies). TRIP12-GFP deletion constructs were generated by PCR amplification (Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1) followed by insertion into pDONR-201 or pDONR-221 (Life Technologies) using Gateway strategy. The different fragments were subsequently inserted in frame into pCDNATM6.2/C-EmGFP-DEST vector (Life Technologies) using the same strategy. Catalytically inactive TRIP12-GFP C1959A mutant was generated using Quik Change XL Site-Directed mutagenesis kit (Stratagene) and primers listed in Supplemental Materials and Methods Table 1. All plasmid sequences were verified by automatic sequencing. Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT)-GFP expressing vector pCDNATM6.2/C-EmGFP/GW/CAT was purchased from Life Technologies and used as control. Histone H2B (H2B)-GFP expressing plasmid was a gift from D. Lères (Institute of Molecular Genetics of Montpellier, France). pSG5-HAx2-FLAG-TRIP12 plasmid was generated by PCR amplification (Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1) followed by insertion into the *Kpn* I and *EcoR* V sites of pCDNA₃ plasmid containing two HA tags, a TEV protease cleavage site and a FLAG motif upstream of the *Kpn* I site. TRIP12 cDNA fragment (1-325) and (446-1000) cloned in pDONR-201 were transferred in pET-60-DEST plasmid (Novagen) by Gateway strategy to generate GST-IDR(1-325) and GST-ARM-WWE(446-1000) plasmids. The different plasmids were transiently transfected in HeLaS3 cells using JetPEITM reagent (PolyPlus-Transfection) following manufacturer's recommendations with a N/P ratio of 5 or 10.

Lentiviral vector production and cell transduction. All replication defective, self-inactivating lentiviral vectors were generated in a BSL-3 facility (Vectorology platform, INSERM U1037, Toulouse, France) as previously described by Torrisani *et al.*³³. Briefly, transient transfection of HEK-293FT cells with packaging and lentiviral vector plasmids were performed using LENTI-Smart INT kit (InvivoGen) following manufacturer's recommendations. All batches were verified replicative virus-free. Lentiviral vector concentrations were quantified by p24 ELISA (Innotest, Ingen, Paris). Cells were seeded at a density of 10⁴ cells per well in a 48 well-dish. After 24 h, cells were incubated with 150 ng of p24-equivalent of lentiviral vectors in the presence of protamine sulfate (4 µg/mL) for 12 h. Transduced cells were selected for 3 weeks using puromycin (5 µg/mL-InvivoGen).

Subcellular fractionation and Western blot analysis. Cell pellets were incubated in 100 µM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 5 mM DTT, 0.5% NP-40[®], 0.5 mM PMSF and 10 µL/mL protease inhibitor (Sigma-Aldrich). After 10 min-incubation on ice, samples were centrifuged (15 min at 2 000 rpm, 4 °C). Supernatants containing cytosolic proteins were kept. After two washes, pellets were resuspended in RIPA (Radio-ImmunoPrecipitation Assay) buffer (Biotech) and centrifuged (20 min at 12 000 rpm, 4 °C), supernatants containing nuclear proteins were kept. The residual pellets were solubilized in RIPA buffer supplemented with 25 U micrococcal nuclease (Takara) and 1 mM DTT. After 20 min-incubation at 37 °C, the reaction was stopped using EDTA solution (44 mM final concentration). After sonication (2 cycles of 6 s, amplitude 40% with Vibra-CellTM sonicator), samples were centrifuged (15 min at 12 000 rpm, 4 °C). Supernatants containing chromatin fraction were kept. For total protein, cell pellets were incubated in RIPA buffer supplemented with 10 µL/mL protease inhibitor (Sigma-Aldrich). After 15 min on ice, samples are centrifuged (15 min-12 000 rpm, 4 °C). Protein fractions were denatured in Laemmli buffer after heating at 95 °C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) and transferred onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad) using TransBlot Turbo (Bio-Rad) apparatus. After membrane saturation and primary/secondary antibody incubation, protein expression was detected using ClarityTM Western ECL Substrate (Bio-Rad) and Chemi-DocTM XRS⁺ (Bio-Rad) apparatus. Signal intensities were quantified using Image Lab (Bio-Rad) software. Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2.

Flow cytometry. For cell cycle analyses, cells were fixed in 70% ethanol during the exponential growth phase for asynchronous HeLaS3 cells or after treatment for enriched HeLaS3 cell populations. Fixed cells were treated with RNase A (10 µg/mL) and propidium iodide (20 µg/mL) (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37 °C. TRIP12(1-1992)-GFP and H2B-GFP transfected cells were fixed with ethanol 70% and incubated with a pHH3-Ser10 antibody followed by Alexa Fluor[®] 555 anti-mouse secondary antibody. Data were acquired using the MACS Quant[®] VYB cytometer (Miltenyi Biotech) and analyzed with MACS Quant and ModFit software. Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2.

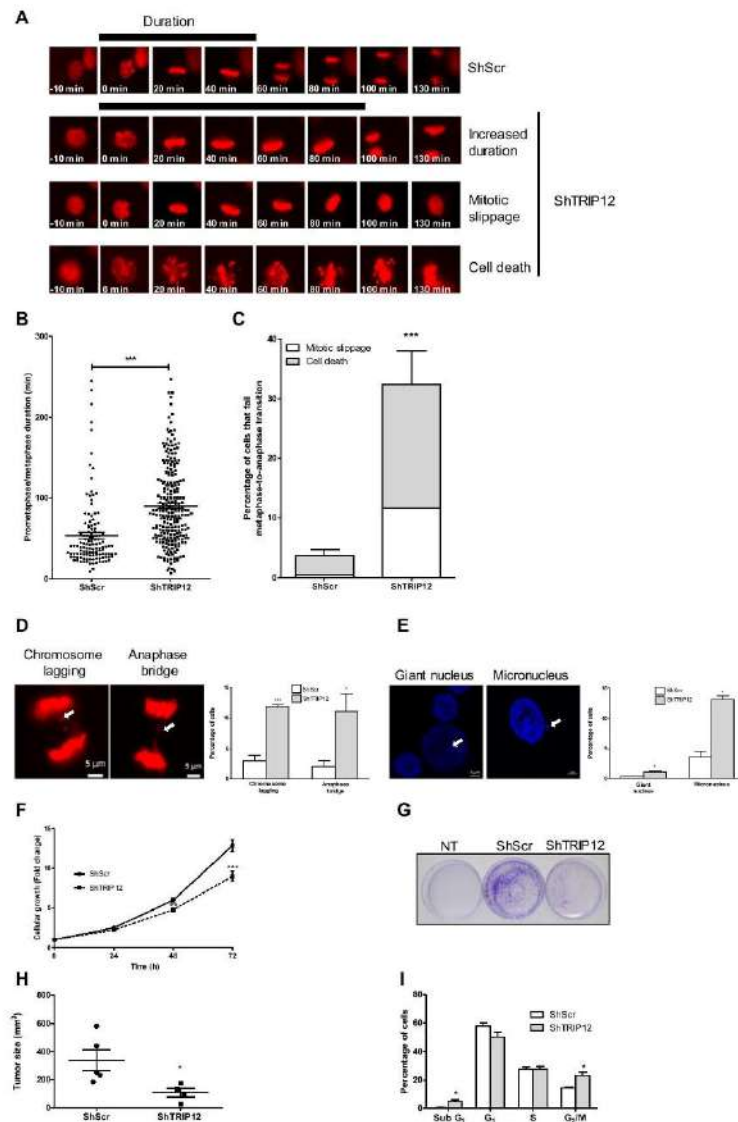


Figure 7. A TRIP12 depletion prolongs the SAC activation, leads to chromosome segregation defects and cell growth inhibition. (A) Representative images of the different fate of TRIP12-depleted cells during 140 min. TRIP12-depleted (ShTRIP12#1) and control (ShScr) H2B-dsRed HeLaS3 were arrested by a Ro-3306 treatment. Cells were released in the cell cycle and followed by live microscopy for 6 h. The black bar represents the duration of prometaphase-metaphase. (B) Duration of prometaphase-metaphase was measured from the invagination of the nuclear membrane to the separation of sister chromatids in 125 control cells and 244 TRIP12#1-depleted cells. The horizontal bar represents the mean \pm SEM from three different experiments. *** represents a p value < 0.001. (C) Percentage of cells that fail the transition metaphase-to-anaphase in TRIP12#1-depleted and control H2B-dsRed HeLaS3 cells. The bars represent the mean \pm SEM obtained from three different experiments. *** represents a p value < 0.001. Percentage of cells that exit mitosis *via* mitotic slippage (white bars) and cell death (grey bars). The bars represent the mean obtained from three different experiments. (D) Chromosome laggings and anaphase bridges in TRIP12-depleted and control H2B-dsRed HeLaS3 cells arrested

by Ro-3306 treatment and released in the cell cycle were quantified by live cell microscopy. The images are representative of a chromosome lagging and an anaphase bridge observed in TRIP12-depleted H2B-dsRed HeLaS3 cells. The graph represents the percentage of cells with chromosome segregation defects expressed as a mean \pm SEM and obtained from 344 TRIP12-depleted and 251 control cells of three different experiments. * and *** indicate a p value < 0.05 and 0.001, respectively. (E) Micronucleus and giant nuclei in asynchronous TRIP12-depleted or control HeLaS3 cells were quantified by immunofluorescence after DAPI staining. The graph represents the percentage of cells expressed as a mean \pm SEM and obtained from a minimum of 10^3 cells of three different experiments. * indicates a p value < 0.05. (F) Cell growth of TRIP12-depleted and control cells was measured by cell counting. Cells were seeded at $5 \cdot 10^4$ cells/well of 6-wells plate and counted the day after ($t = 0$) and every 24 h the three following days. Results are expressed as fold change \pm SEM relatively to $t = 0$. Results were obtained from 7 different experiments. ** and **** indicate a p value < 0.01 and 0.001, respectively. (G) Colony formation assay of HeLaS3 cells transduced or not (NT) with ShScr and ShTRIP12 expressing lentiviral particles. Forty-eight hours after transduction, cells were seeded in a 10 cm-plate and selected with puromycin for 11 days. Colonies were fixed and counterstained with crystal violet. The images are representative of at least three different experiments. (H) *In vivo* tumor progression of TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells. Cells (10^6 cells) were sub-cutaneously injected into Scid mice ($n = 5$). After 5 weeks, mice were sacrificed and tumor volume was determined. Results are expressed in $\text{mm}^3 \pm$ SEM. * indicates a p value < 0.05. (I) Distribution of TRIP12-depleted and control cells in the cell cycle was determined by flow cytometry after propidium iodide incorporation. The percentage of cells in the different phases of the cell cycle is expressed as a mean \pm SEM and was obtained from at least 7 different experiments. * indicates a p value < 0.05.

Cell proliferation. TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells were seeded in triplicate at a concentration of $5 \cdot 10^4$ /well of 6 well-plate. After 24 h ($t = 0$), cells were counted using a Z1 Coulter[®] Particle Counter (Beckman Coulter[™]). Cells were counted after 24 h, 48 h and 72 h.

***In vivo* experiments.** Experimental procedures performed on mice were approved by the ethical committee of INSERM-CREPRE (National Institute of Health and Medical Research-Regional Center for Functional Exploration and Experimental Resources) and authorized by the French Ministry of Research: APAFIS#3600-201512160838611v3. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. TRIP12-depleted and control HeLaS3 cells ($1 \cdot 10^6$ cells) were subcutaneously injected into SCID mice ($n = 5$). After 5 weeks, mice were euthanized and tumor volume was determined.

RNA extraction and RT-qPCR. Total RNA was isolated from HeLaS3 cell lines with TRIzol[®] Reagent (Life Technologies) according to supplier's instructions. One to five μg of total RNA were reverse transcribed into cDNA using RevertAid H minus Reverse Transcriptase kit (Thermo-Scientific) according to manufacturer's recommendations. Duplicate RT-qPCR assays were carried out in a StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SsoFast[™] EvaGreen[®] supermix (Bio-Rad) and specific primers (see primers listed in Supplemental Materials and Methods 2). Relative quantity of mRNA was calculated by the comparative threshold cycle (CT) method as $2^{-\Delta\text{CT}}$, where $\Delta\text{CT} = \text{CT Trip12 mRNA} - \text{CT Reference mRNA}$. Three mRNAs of reference (β -Actin, Gapdh and cyclophilin A) were used for normalization. Primers are listed in Supplemental Materials and Methods Table 1.

Chromosome spreading. Cells were treated with $9 \mu\text{M}$ Ro-3306 for 20 h, washed with PBS and released in fresh medium for 45 min at 37°C , or in medium supplemented with $100 \mu\text{M}$ nocodazole for 4 h. Mitotic cells were collected by brief treatment with trypsin, rinsed with PBS and swollen in hypotonic medium (10 mM KCl, 15% FCS) at 37°C for 20 min. Cell preparations were fixed with a freshly made 75% ethanol, 25% glacial acetic acid solution overnight at 4°C , dropped on glass slides and air-dried. Slides were stained with DAPI or processed for immunofluorescence (see below).

Naked DNA interaction. GST-IDR(1-325) and GST-WWE-ARM(446-1000) recombinant proteins were purified from BL21 bacteria and quantified. Increasing volumes of purified proteins were incubated with 100 ng of pENTR1A-GFP plasmid (made in laboratory) in Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM-EDTA 1 mM buffer for 20 min at room temperature. Reactions were migrated on agarose gel 0.7% and visualized with ethidium bromide.

Immunofluorescence. Cells were grown on cover slips then subsequently fixed and permeabilized using with IntraStain[™] reagent (DAKO) or methanol/0.1% Triton[™] X-100. Cover slips were saturated using Protein block[™] reagent (DAKO) for 30 min and then incubated with primary antibodies overnight at 4°C . After several washes, cells were incubated with appropriate secondary Alexa Fluor[®]-488 anti-mouse, Alexa Fluor[®]-555 anti-mouse or Alexa Fluor[®]-555 anti-rabbit antibodies for 2 h at room temperature. Nuclei were counterstained with $1 \mu\text{M}$ DAPI for 5 min at room temperature. Cover slips were mounted on glass slides using Fluorescent Mounting Reagent/Medium (DAKO). Fluorescence was visualized using LSM 780 or 880 confocal microscope (Zeiss) with a 63x NA 1.4 oil-immersion objective and analyzed using Zen software (Zeiss). Antibodies and dilution used for these experiments are listed in Supplemental Materials and Methods Table 2. Images were quantified with Fiji software.

Bioinformatic prediction of intrinsically disordered regions. Detection of intrinsically disordered region in TRIP12 protein sequence (NP_004229.1) was determined using the prediction software IUPred (iupred.enzim.hu)⁵⁴, GlobPlot (<http://globplot.embl.de/>)⁵⁵ and DisEMBL (dis.embl.de)⁵⁶.

Live cell microscopy. H2B-dsRed HeLaS3 cells were treated with Ro-3306 and released in the cell cycle. Fluorescent images were acquired (Objective 20x) every minute for 6 h using a Zeiss motorized inverted Observer Z1 microscope, containing LED module Colibri. Filter combinations: GFP (38 HE) DsRed (43 HE) and DAPI (49) with the AxioCam MRm camera system. Time-lapse imaging of living cells was performed using Pecon-Zeiss incubation system for temperature (37 °C) and CO₂ (5%) controlled environment. Images were subsequently analyzed using ZEN SP2 software (Blue edition Zeiss). Transfected Ro-3306-treated HeLaS3 cells released in the cell cycle were imaged every half-hour or hour using InCuCyte Zoom Kinetic Imaging System with a 10x objective.

SWATH-MS comparative proteomic analysis. Analysis of proteins was performed using a microLC system Ultimate 3000 (Dionex, Villebon sur Yvette, France) coupled to a Triple-TOF 5600 + (AB Sciex, Les Ulis, France) in the positive ion mode. Samples were first dissolved in 16 μ L of buffer (5% ACN, 0.05% trifluoroacetic acid) and spiked with iRT calibration mix (Biognosys, Schlieren, France). The totality of the samples was then injected on a YMC-Pack Pro C18 column (3.0 mm \times 150 mm; 3 μ m particle size) at a flow rate of 5 μ L min⁻¹. The run length was over 90 min with a gradient from 7% to 45% buffer B (buffer A: 0.1% formic acid, buffer B: 90% ACN, and 0.1% formic acid) in 70 min. The MS data were acquired with a SWATH mode. The source parameters were set as follows: IS at 5500 V, Cur gas at 25, GS1 at 5. The acquisition parameters were as follows: one 50 msec accumulation time MS scan followed by 50 variable SWATH windows each at 40 msec accumulation time for m/z 400–1250. Identification was determined using an in-house SWATH library created HeLaS3 cells with MaxQuant software, Les Ulis, France (FDR 1%). A mass accuracy of 20ppm on precursor ions was used, and 0.5 Da on the fragments. Cysteine carbamidomethylation, methionine oxidation, proline hydroxylation and serine, threonine and tyrosine phosphorylations were taken into account. Data treatment was done with Spectronaut Software 9.0, Les Ulis, France). Analysis of ShScr and ShTRIP12#1 HeLaS3 cells was performed on three different transductions. For each peptide, a triplicate with a peptide quantity <5 and a standard error >60% of the mean was excluded from the analysis. For each replicate, the sum of the four most abundant peptides was calculated. The mean of ShTRIP12 triplicate was compared to the one of ShScr triplicate. Protein with a fold change >1.2 and <0.8 compared to ShScr cells were considered.

Statistical analysis. *In vitro* data were analyzed by 2-tailed, unpaired Student's t-test using a multiple statistics Graph Pad Prism 5 software package and a difference was considered significant when p value was lower than 0.05. Mean values are given \pm SEM. Number of independent experiments is indicated in the figure legends. *, ** and *** Indicate a p value < 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 23 September 2019; Accepted: 3 January 2020;

Published online: 21 January 2020

References

- Chen, D., Yoon, J.-B. & Gu, W. Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULE. *Cell Cycle Georget. Tex* **9**, 2946–2951 (2010).
- Xie, Y. & Varshavsky, A. UFD4 lacking the proteasome-binding region catalyses ubiquitination but is impaired in proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 1003–1007 (2002).
- Ju, D., Wang, X., Xu, H. & Xie, Y. The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins. *FEBS Lett.* **581**, 265–270 (2007).
- Keppeler, B. R. & Archer, T. K. Ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent control of subunit stoichiometry in the SWI/SNF complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 35665–35674 (2010).
- Park, Y., Yoon, S. K. & Yoon, J.-B. TRIP12 functions as an E3 ubiquitin ligase of APP-BP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **374**, 294–298 (2008).
- Gudjonsson, T. *et al.* TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* **150**, 697–709 (2012).
- Chen, D. *et al.* Differential effects on ARF stability by normal versus oncogenic levels of c-Myc expression. *Mol. Cell* **51**, 46–56 (2013).
- Kweon, S.-M. *et al.* An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol. Cell* <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.018> (2019).
- Hanoun, N. *et al.* The E3 ubiquitin ligase thyroid hormone receptor-interacting protein 12 targets pancreas transcription factor 1a for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* **289**, 35593–35604 (2014).
- Kajiro, M. *et al.* The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PLoS One* **6**, e25871 (2011).
- Chen, D. *et al.* regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* **464**, 624–627 (2010).
- Cai, J.-B. *et al.* Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14(ARF) degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatol. Baltim. Md.* **61**, 1603–1614 (2015).
- Wang, L. *et al.* TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene* **36**, 820–828 (2017).
- O'Roak, B. J. *et al.* Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat. Commun.* **5**, 5395 (2014).
- Bramswig, N. C. *et al.* Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Hum. Genet.* **136**, 179–192 (2017).
- Siddiqui, K., On, K. F. & Diffley, J. E. X. Regulating DNA replication in eukarya. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013).
- Lau, Y. F. & Arrighi, F. F. Studies of mammalian chromosome replication. II. Evidence for the existence of defined chromosome replicating units. *Chromosoma* **83**, 721–741 (1981).
- Dunphy, W. G., Briazuola, L., Beach, D. & Newport, J. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPE, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54**, 423–431 (1988).
- Parker, L. L. & Piwnicka-Worms, H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955–1957 (1992).

20. McLean, J. R., Chaix, D., Ohi, M. D. & Gould, K. L. State of the APC/C: organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 118–136 (2011).
21. Musacchio, A. & Salmon, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 379–393 (2007).
22. Pesin, J. A. & Orr-Weaver, T. L. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 475–499 (2008).
23. Ganem, N. J. & Pellman, D. Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* **199**, 871–881 (2012).
24. Crasta, K. *et al.* DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature* **482**, 53–58 (2012).
25. Avimer, R., Shenoy, A., Elroy-Stein, O. & Geiger, T. Uncovering Hidden Layers of Cell Cycle Regulation through Integrative Multi-omic Analysis. *PLoS Genet.* **11**, e1005554 (2015).
26. van der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631 (2014).
27. Sabari, B. R. *et al.* Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **361** (2018).
28. Pines, J. & Hunter, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* **58**, 833–846 (1989).
29. Enders, G. H. Gauchos and ochos: a Wee1-Cdk tango regulating mitotic entry. *Cell Div.* **5**, 12 (2010).
30. Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C. & Wolthuis, R. M. F. Cyclin B1-Cdk1 activation continues after centrosome separation to control mitotic progression. *PLoS Biol.* **5**, e123 (2007).
31. Coverley, D., Laman, H. & Laskey, R. A. Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat. Cell Biol.* **4**, 523–528 (2002).
32. Li, C., Andrade, M., Dunbrack, R. & Enders, G. H. A bifunctional regulatory element in human somatic Wee1 mediates cyclin A/Cdk2 binding and Crm1-dependent nuclear export. *Mol. Cell Biol.* **30**, 116–130 (2010).
33. den Elzen, N. & Pines, J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J. Cell Biol.* **153**, 121–136 (2001).
34. De Boer, L. *et al.* Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* **27**, 4261–4268 (2008).
35. Whitfield, M. L. *et al.* Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1977–2000 (2002).
36. Dobson, T., Chen, J. & Krushel, L. A. Dysregulating IRES-Dependent Translation Contributes to Overexpression of Oncogenic Aurora A Kinase. *Mol. Cancer Res.* **11**, 887–900 (2013).
37. Chen, W., Smeekens, J. M. & Wu, R. Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells. *Chem. Sci.* **7**, 1393–1400 (2016).
38. Ma, H. *et al.* M phase phosphorylation of the epigenetic regulator UHRF1 regulates its physical association with the deubiquitylase USP7 and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 4828–4833 (2012).
39. Petrone, A., Adamo, M. E., Cheng, C. & Kettenbach, A. N. Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 2448–2461 (2016).
40. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197–208 (2005).
41. Peng, Z. & Kurgan, L. High-throughput prediction of RNA, DNA and protein binding regions mediated by intrinsic disorder. *Nucleic Acids Res.* **43**, e121 (2015).
42. Wang, C., Uversky, V. N. & Kurgan, L. Disordered nucleome: Abundance of intrinsic disorder in the DNA- and RNA-binding proteins in 1121 species from Eukaryota, Bacteria and Archaea. *Proteomics* **16**, 1486–1498 (2016).
43. Maréchal, A. *et al.* PRP19 transforms into a sensor of RPA-ssDNA after DNA damage and drives ATR activation via a ubiquitin-mediated circuitry. *Mol. Cell* **53**, 235–246 (2014).
44. Braden, W. A., McClendon, A. K. & Knudsen, E. S. Cyclin-dependent kinase 4/6 activity is a critical determinant of pre-replication complex assembly. *Oncogene* **27**, 7083–7093 (2008).
45. Demeret, C., Vassetzky, Y. & Méchali, M. Chromatin remodelling and DNA replication: from nucleosomes to loop domains. *Oncogene* **20**, 3086–3093 (2001).
46. Cao, Q. *et al.* The central role of EED in the orchestration of polycomb group complexes. *Nat. Commun.* **5**, 3127 (2014).
47. Oliviero, G. *et al.* Dynamic Protein Interactions of the Polycomb Repressive Complex 2 during Differentiation of Pluripotent Cells. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **15**, 3450–3460 (2016).
48. Abe, S. *et al.* The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* **25**, 863–874 (2011).
49. Wu, R. S., Kohn, K. W. & Bonner, W. M. Metabolism of ubiquitinated histones. *J. Biol. Chem.* **256**, 5916–5920 (1981).
50. Atora, M. *et al.* Promoters active in interphase are bookmarked during mitosis by ubiquitination. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10187–10202 (2012).
51. Giunta, S., Belotserkovskaya, R. & Jackson, S. P. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* **190**, 197–207 (2010).
52. Nakajima, D. *et al.* Preparation of a set of expression-ready clones of mammalian long cDNAs encoding large proteins by the ORF trap cloning method. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **12**, 257–267 (2005).
53. Torrisani, J. *et al.* let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits *in vitro* cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum. Gene Ther.* **20**, 831–844 (2009).
54. Dosztányi, Z., Csizsók, V., Tompa, P. & Simon, I. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* **347**, 827–839 (2005).
55. Linding, R., Russell, R. B., Neduva, V. & Gibson, T. J. GlobPlot: Exploring protein sequences for globularity and disorder. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3701–3708 (2003).
56. Linding, R. *et al.* Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **11**, 1453–1459 (2003).

Acknowledgements

D. Larrieu was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer and M. Brunet by the University Paul Sabatier, Toulouse, France. This project was funded by the Ligue Régionale Midi-Pyrénées contre le Cancer and the "Fondation Toulouse Cancer Santé. The acquisition of Incucyte Zoom apparatus was funded by the Région Occitanie (#15052181). We thank the imaging, cytometry and geno-transcriptomics platforms of the Cancer Research Center of Toulouse (CRCT) and of the Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases of Toulouse (I2MC). We thank Drs P. Soubeyran (Cancer Research Center of Marseille), F. Larminat (Institute of Pharmacology and Structural Biology of Toulouse), A. Besson, S. Manenti, J.S. Hoffmann research groups (CRCT) for ample scientific discussions, and D. Arvanitis (I2MC) for English proof reading of the manuscript.

Author contributions

D.L.: acquisition, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript. M.B.: acquisition, analysis and interpretation of data. C.V.: acquisition, analysis and interpretation of data. N.H.: acquisition of data and analysis. L.L.: acquisition of data and analysis. L.D.: acquisition of data and analysis. H.L.: acquisition of data and analysis. R.M.P.: acquisition of data and analysis. J.S.: substantial contributions to the conception B.J.: acquisition

of data. L.B.: substantial contributions to the conception. P.C.: substantial contributions to the conception. M.D.: conception and design of the work, acquisition, analysis and interpretation of data. J.T.: conception and design of the work, acquisition, analysis and interpretation of data, writing of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57762-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

II. Annexe 2 : ADN : tout n'est pas dans la séquence, bienvenue dans la 3^{ème} dimension ! (Revue de vulgarisation à destination du corps médical)

Titre français : ADN : tout n'est pas dans la séquence, bienvenue dans la 3^{ème} dimension !

Titre anglais : DNA: it's not all about the sequence, welcome to the 3rd dimension!

5 mots clés : organisation du génome, épigénétique, euchromatine, hétérochromatine, cancer

5 keywords: genome organization, epigenetics, euchromatin, heterochromatin, cancer

Coordonnées : Claire Vargas, claire.vargas@inserm.fr, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, UMR1037, INSERM, Université Paul Sabatier Toulouse III, 2 Avenue Hubert Curien 31037 Toulouse Cedex 1.

Points forts (3-5) :

- L'ADN n'est pas aléatoirement organisé au sein des noyaux des cellules.
- Les marques épigénétiques et l'organisation tridimensionnelle du génome sont primordiales pour l'homéostasie cellulaire.
- De nombreuses altérations de la structuration du génome sont observées dans différentes pathologies notamment les cancers y compris celui du pancréas.
- Les mécanismes qui contrôlent l'organisation du génome apportent de nouvelles connaissances sur la carcinogénèse.

I- Concepts de base de l'organisation du génome.

L'ADN est la base de l'information génétique qui définit ce que nous sommes via l'expression des gènes. L'ADN s'enroule autour de 4 protéines globulaires appelées histones (H2A, H2B, H3, H4) pour former la chromatine. L'ADN et les histones sont modifiés de façon réversible et sans altération de la séquence de l'ADN par l'ajout de groupements biochimiques : on parle de modifications épigénétiques. Les marques épigénétiques de l'ADN (qui par souci de concision, ne seront pas abordées dans cette revue) et des histones vont modifier le profil d'expression des gènes. Elles impactent également l'état de compaction de la chromatine. Environ 2 mètres de chromatine sont contenus dans le noyau de nos cellules qui mesure en

moyenne une dizaine de micromètres. De remarquables mécanismes de compaction et d'organisation spatiale sont ainsi nécessaires pour contenir l'ADN dans les noyaux et en maintenir l'intégrité.

Des altérations des marques épigénétiques et de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine sont observées dans de nombreux types de pathologies dont les cancers. Cette revue a pour objectif d'aborder les principes de base de l'organisation du génome et d'en souligner l'importance cruciale dans la compréhension des pathologies.

Organisation 2D et compaction de la chromatine

Euchromatine & marques épigénétiques associées :

La chromatine est classée en fonction de son état de compaction en deux grandes catégories : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine est caractérisée par la présence de gènes transcriptionnellement actifs et par un niveau de compaction faible permettant le recrutement des acteurs de la transcription des gènes. L'euchromatine contient les gènes, les promoteurs de gènes et les éléments régulateurs des gènes. Ces régions se regroupent en majorité vers le centre du noyau des cellules. Des modifications épigénétiques particulières caractérisent l'euchromatine. L'extrémité N-terminale des histones est modifiée par des ajouts de groupements méthyle, acétyle ou de molécules d'ubiquitine (respectivement me, ac, ou ub) sur des résidus lysine (Lys). La triméthylation du résidu lysine 4 de l'histone H3 (H3Lys4me3) et l'acétylation du résidu lysine 27 (H3Lys27ac) sont caractéristiques des régions euchromatiniennes (1) (Figure 1).

Hétérochromatine & marques épigénétiques associées :

L'hétérochromatine se répartit en deux sous-catégories : l'hétérochromatine constitutive (HC) et l'hétérochromatine facultative (HF) (Figure 1). Contrairement aux régions

euchromatiniennes, l'HC est pauvre en gènes activement transcrits mais enrichie en séquences répétées (centromères, télomères...).

Les régions d'HC sont conservées entre les différents types cellulaires. Elles se regroupent proche de la membrane nucléaire et dans les zones périnucléolaires. L'HC est caractérisée par la triméthylation du résidu lysine 9 de l'histone H3 (H3Lys9me3). La reconnaissance de ces motifs épigénétiques par l'hétérochromatine protéine 1 (HP1) induit la compaction de l'HC. L'hétérochromatine constitutive est indispensable à l'intégrité du génome : elle participe à la bonne ségrégation des chromosomes lors de la mitose ainsi qu'à la réparation des dommages à l'ADN. De plus, une perte drastique de régions d'HC est communément observée dans les cancers ; elle contribue à la progression et à l'hétérogénéité tumorale (2).

Les gènes impliqués dans le développement et la différenciation cellulaire sont retrouvés dans l'hétérochromatine facultative. Par conséquent, les régions d'HF vont varier d'un type cellulaire à l'autre. La formation d'HF détermine par exemple l'orientation vers le lignage hépatique ou le lignage pancréatique lors du développement ainsi que la spécialisation des cellules du pancréas endocrine (3). L'HF est formée par l'action des protéines des complexes Polycomb (PcG) qui permettent de réprimer les gènes qui n'ont pas besoin d'être exprimés dans le type cellulaire concerné. Deux complexes PcG modifient les histones et déposent les marques épigénétiques de triméthylation du résidu lysine 27 de l'histone H3 (H3Lys27me3) et de monoubiquitination du résidu lysine 119 de l'histone H2A (H2ALys119ub) caractéristiques de l'HF. Il existe des défauts dans la mise en place de l'HF et des dérégulations des PcG sont impliquées dans l'activation d'oncogènes et la répression de gènes suppresseurs de tumeur, favorisant ainsi la progression tumorale (4).

La répartition euchromatine/hétérochromatine et les modifications épigénétiques associées forment le premier niveau d'organisation du génome : la fibre de chromatine. De

récentes avancées technologiques majeures ont mis en évidence que le génome se structure également de façon tridimensionnelle (5).

Organisation tridimensionnelle du génome

Boucles de chromatine :

Grâce à des protéines de structure, les fibres de chromatine forment des boucles. Elles permettent de rassembler des régions régulatrices éloignées sur la fibre de chromatine et de moduler ainsi l'expression/répression des gènes (Figure 2).

Domaines topologiquement associés :

Ces boucles forment des domaines topologiquement associés (TAD). Les TAD contiennent des régions du génome qui interagissent préférentiellement entre elles et qui sont ainsi physiquement isolées du reste du génome. Les TAD sont relativement conservés selon les différents types cellulaires mais les contacts entre les différentes régions génomiques d'un même TAD dépendent du type cellulaire.

Compartiments A/B :

Les différents TAD interagissent entre eux et donnent naissance à deux compartiments génomiques, le compartiment A et le compartiment B. Le compartiment A, similaire à de l'euchromatine, contient des gènes activement transcrits contrairement au compartiment B qui regroupe les régions peu transcrites similaires à de l'hétérochromatine. Les compartiments A interagissent préférentiellement entre eux, de même pour les compartiments B.

Territoires chromosomiques :

Les boucles de chromatines, les TAD et compartiments vont ensuite s'organiser sous forme de territoires chromosomiques qui représentent le volume qu'occupe chaque

chromosome dans le noyau des cellules et sont le niveau le plus haut d'organisation de la chromatine (6,7).

II- Dérégulations de l'organisation du génome et conséquences pathologiques.

L'altération du niveau de compaction/organisation peut avoir des conséquences dramatiques en transformant une cellule saine en une cellule malade. Le niveau de compaction de l'ADN est également un facteur déterminant pour la réponse aux chimiothérapies.

Perturbations de l'hétérochromatine constitutive :

Des études montrent que dans les cancers du sein et du colon, une réduction de l'expression de HP1 caractéristique d'une perte d'hétérochromatine est associée à un mauvais pronostic. Une réduction des domaines d'hétérochromatine entraîne l'exposition de sites d'ADN sensibles aux dommages qui augmente par conséquent l'instabilité génomique. De plus, la perte d'HC est décrite dans de nombreuses maladies dégénératives liées au vieillissement (Tableau 1) (8).

Perturbations de l'hétérochromatine facultative :

Des altérations de la formation de l'HF ont été décrites dans le cancer du pancréas comme favorisant l'initiation, la croissance tumorale et la dissémination métastatique de ce cancer (9). En d'autres termes, perturber l'HF favorise l'expression d'oncogènes normalement réprimés. Une nouvelle thérapie (Tazemetostat) ciblant un acteur de la formation d'HF vient d'être récemment approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) pour le traitement contre le lymphome folliculaire et de nombreux autres essais cliniques prometteurs ciblant des acteurs épigénétiques sont en cours (10). Outre les cancers, les dérégulations d'acteurs de l'homéostasie épigénétique sont également décrites dans les diabètes de type I, II et gestationnel (Tableau 1) (3) (11–13).

Perturbations des boucles de chromatine :

Une équipe a démontré que la structuration du génome en boucles de chromatine est essentielle pour la signalisation et les mécanismes de réparation de l'ADN suite à une cassure double brin (14), démontrant ainsi que cette organisation est un élément clé pour le maintien de l'intégrité du génome (Tableau 1).

Perturbations des domaines topologiquement associés :

Grâce à des approches innovantes d'édition du génome, une équipe de recherche a mis en évidence que perturber l'organisation des TAD suffit à induire l'expression d'oncogènes (Tableau 1) (15).

Perturbations des compartiments A/B :

Une étude récente démontre que les cellules pancréatiques saines et cancéreuses diffèrent dans l'organisation 3D de leur génome. Cette différence de conformation est d'autant plus importante dans les cancers pancréatiques métastatiques. Ces altérations s'accompagnent de modifications épigénétiques conduisant à un passage du compartiment B vers A sur de nombreuses régions génomiques et d'une modification du profil d'expression des gènes. Les gènes impactés par ce changement sont impliqués dans la dissémination métastatique et associés à un mauvais pronostic (Tableau 1) (16).

Conclusion :

Le génome possède une organisation bi et tridimensionnelle très finement régulée par de nombreux acteurs. Cet agencement conditionne la différenciation cellulaire et s'avère primordial pour l'homéostasie cellulaire. Des technologies sophistiquées ont permis récemment de relier cette structuration jusqu'alors méconnue au développement et à la progression de

pathologies. Ceci souligne l'importance d'en étudier la mécanistique pour mieux comprendre et agir sur les conséquences désastreuses de leur dérégulation.

Références bibliographiques :

1. Morrison O, Thakur J. Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. *Int J Mol Sci.* 28 juin 2021;22(13):6922.
2. Heterochromatin: Guardian of the Genome [Internet]. [cité 18 juill 2022]. Disponible sur: <https://www-annualreviews-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/epdf/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>
3. Kaimala S, Kumar CA, Allouh MZ, Ansari SA, Emerald BS. Epigenetic modifications in pancreas development, diabetes, and therapeutics. *Med Res Rev.* 2022;42(3):1343-71.
4. Mallen-St Clair J, Soydaner-Azeloglu R, Lee KE, Taylor L, Livanos A, Pylayeva-Gupta Y, et al. EZH2 couples pancreatic regeneration to neoplastic progression. *Genes Dev.* 1 mars 2012;26(5):439-44.
5. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, et al. Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science.* 9 oct 2009;326(5950):289-93.
6. Bonev B, Cavalli G. Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet.* nov 2016;17(11):661-78.
7. Umlauf D, Mourad R. The 3D genome: From fundamental principles to disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol.* juin 2019;90:128-37.
8. Lee JH, Kim EW, Croteau DL, Bohr VA. Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging. *Exp Mol Med.* sept 2020;52(9):1466-74.
9. Flores LF, Tader BR, Tolosa EJ, Sigafos AN, Marks DL, Fernandez-Zapico ME. Nuclear Dynamics and Chromatin Structure: Implications for Pancreatic Cancer. *Cells.* 1 oct 2021;10(10):2624.
10. Clinical Trials for epigenetics and cancer. [Internet]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Cancer&term=epigenetics&cntry=&state=&city=&dist=>
11. Benitz S, Straub T, Mahajan UM, Mutter J, Czerniak S, Unruh T, et al. Ring1b-dependent epigenetic remodeling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut.* nov 2019;68(11):2007-18.
12. Chen Y, Xie D, Yin Li W, Man Cheung C, Yao H, Chan CY, et al. RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. *Cancer Lett.* nov 2010;297(1):109-16.

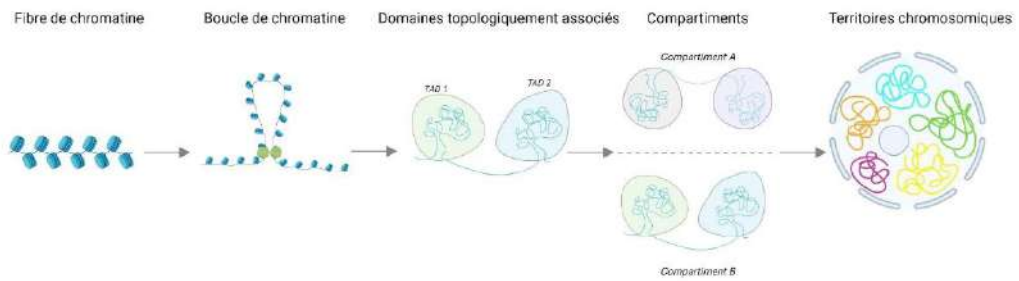
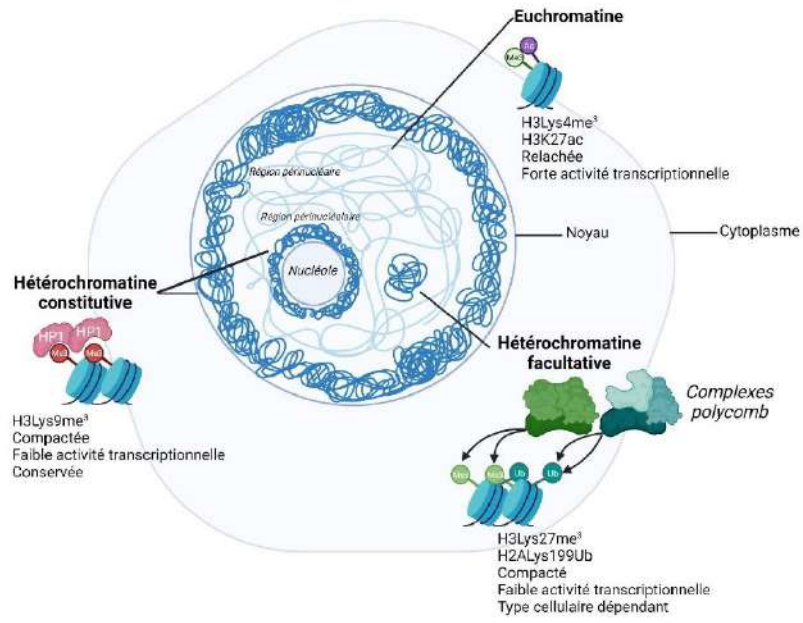
13. Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, McKay P, Phillips T, Assouline S, et al. Tazemetostat for patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: an open-label, single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 1 nov 2020;21(11):1433-42.
14. Arnould C, Rocher V, Finoux AL, Clouaire T, Li K, Zhou F, et al. Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci. *Nature.* 25 févr 2021;590(7847):660-5.
15. Hnisz D, Weintraub AS, Day DS, Valton AL, Bak RO, Li CH, et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science.* 25 mars 2016;351(6280):1454-8.
16. Ren B, Yang J, Wang C, Yang G, Wang H, Chen Y, et al. High-resolution Hi-C maps highlight multiscale 3D epigenome reprogramming during pancreatic cancer metastasis. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* déc 2021;14(1):120.

Légendes des figures :

Figure 1 : Représentation schématique de l'organisation bidimensionnelle du génome et des acteurs épigénétiques associés. Les régions euchromatiniennes sont représentées en bleu clair et les hétérochromatiniennes en bleu foncé. H3 : histone H3, Lys : résidu lysine, ac : groupement acétyl, me3 : groupement triméthyle, ub : groupement ubiquitine, HP1 : hétérochromatine protéine 1. *Figure réalisée avec BioRender.*

Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation tridimensionnelle du génome. La fibre de chromatine forme, grâce à des protéines de structure, des boucles de chromatine. Les boucles s'organisent en domaines topologiquement associés (TAD) qui se regroupent en compartiments. Ces architectures 3D ordonnées s'agencent et forment les territoires chromosomiques qui représentent le volume occupé par chaque chromosome dans le noyau. TC : territoire chromosomique. *Figure réalisée avec BioRender.*

Tableau 1 : Altérations de l'organisation du génome et pathologies associées. Des nombreuses pathologies possèdent des dérégulations de protéines impliquées dans l'architecture du génome. HP1 : hétérochromatine protéine 1 ; HC : hétérochromatine constitutive ; PcG : protéines des complexes Polycomb.








	Altérations	Conséquences	Pathologies
Hétérochromatine constitutive	 ∞ HP1	∞ HC	Mauvais pronostic cancers sein et colon
Hétérochromatine facultative	 ∞ ou ∞ proteins PcG	Induction d'oncogènes	Lymphome folliculaire Diabète de type I, II et gestationnel
Boucles de chromatine	 Déstructuration boucles	Inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN	x
TAD	 Perturbation frontières TAD	Activation d'oncogènes	Leucémie aiguë lymphoblastique
Compartiments	 Changement de compartiments	Induction de gènes impliqués dans dissémination métastatique	Cancer du pancréas

Tableau 1 : Altérations de l'organisation du génome et pathologies associées.

Références bibliographiques

1. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
2. Zhou, K., Gaullier, G. & Luger, K. Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat Struct Mol Biol* **26**, 3–13 (2019).
3. Saha, A. & Dalal, Y. A glitch in the snitch: the role of linker histone H1 in shaping the epigenome in normal and diseased cells. *Open Biol* **11**, 210124.
4. Millán-Zambrano, G., Burton, A., Bannister, A. J. & Schneider, R. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. *Nat Rev Genet* **23**, 563–580 (2022).
5. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* **21**, 381–395 (2011).
6. Shogren-Knaak, M. *et al.* Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–847 (2006).
7. Martire, S. & Banaszynski, L. A. The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 522–541 (2020).
8. Yatskevich, S. *et al.* Structure of the human inner kinetochore bound to a centromeric CENP-A nucleosome. *Science* **376**, 844–852 (2022).
9. Giaimo, B. D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S. B. & Borggreffe, T. The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics & Chromatin* **12**, 37 (2019).
10. Ryan, D. P. & Tremethick, D. J. The interplay between H2A.Z and H3K9 methylation in regulating HP1α binding to linker histone-containing chromatin. *Nucleic Acids Res* **46**, 9353–9366 (2018).
11. Heitz: Das heterochromatin der moose - Google Scholar.
https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=&journal=Jahrb.%20Wiss.%20Bot.&volume=69&pages=762-818&publication_year=1928&author=Heitz%2CE&author=Heterochromatin%20der%20Moose%2CI
12. Monneron, A. & Bernhard, W. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J Ultrastruct Res* **27**, 266–288 (1969).
13. Rippe, K. *et al.* DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15635–15640 (2007).
14. Janssen, A., Colmenares, S. U. & Karpen, G. H. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **34**, 265–288 (2018).
15. Allshire, R. C. & Madhani, H. D. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 229–244 (2018).
16. Saksouk, N., Simboeck, E. & Déjardin, J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics & Chromatin* **8**, 3 (2015).
17. Jang, S. M. *et al.* KAP1 facilitates reinstatement of heterochromatin after DNA replication. *Nucleic Acids Res* **46**, 8788–8802 (2018).
18. Larson, A. G. *et al.* Liquid droplet formation by HP1α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* **547**, 236–240 (2017).
19. Strom, A. R. *et al.* Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* **547**, 241–245 (2017).
20. Folco, H. D., Pidoux, A. L., Urano, T. & Allshire, R. C. Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* **319**, 94–97 (2008).
21. Żylicz, J. J. & Heard, E. Molecular Mechanisms of Facultative Heterochromatin Formation: An X-Chromosome Perspective. *Annu Rev Biochem* **89**, 255–282 (2020).

22. Blackledge, N. P. & Klose, R. J. The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 815–833 (2021).
23. Syrett, C. M. *et al.* Altered X-chromosome inactivation in T cells may promote sex-biased autoimmune diseases. *JCI Insight* **4**, e126751, 126751 (2019).
24. Chaligné, R. *et al.* The inactive X chromosome is epigenetically unstable and transcriptionally labile in breast cancer. *Genome Res* **25**, 488–503 (2015).
25. Jerkovic', I. & Cavalli, G. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 511–528 (2021).
26. Lieberman-Aiden, E. *et al.* Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome. *Science* **326**, 289–293 (2009).
27. Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. Going the Distance: A Current View of Enhancer Action. *Science* **281**, 60–63 (1998).
28. Bonev, B. & Cavalli, G. Organization and function of the 3D genome. *Nat Rev Genet* **17**, 661–678 (2016).
29. Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X. & Stamatoyannopoulos, G. Locus control regions. *Blood* **100**, 3077–3086 (2002).
30. Dixon, J. R. *et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* **485**, 376–380 (2012).
31. Sexton, T. *et al.* Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell* **148**, 458–472 (2012).
32. Umlauf, D. & Mourad, R. The 3D genome: From fundamental principles to disease and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **90**, 128–137 (2019).
33. Cremer, M. *et al.* Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res* **9**, 541–567 (2001).
34. Hnisz, D. *et al.* Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science* **351**, 1454–1458 (2016).
35. Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. & Oda, M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem* **79**, 89–130 (2010).
36. Stewart-Morgan, K. R., Petryk, N. & Groth, A. Chromatin replication and epigenetic cell memory. *Nat Cell Biol* **22**, 361–371 (2020).
37. Wootton, J. & Soutoglou, E. Chromatin and Nuclear Dynamics in the Maintenance of Replication Fork Integrity. *Frontiers in Genetics* **12**, (2021).
38. Heinz, K. S. *et al.* Peripheral re-localization of constitutive heterochromatin advances its replication timing and impairs maintenance of silencing marks. *Nucleic Acids Res* **46**, 6112–6128 (2018).
39. Marchal, C., Sima, J. & Gilbert, D. M. Control of DNA replication timing in the 3D genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 721–737 (2019).
40. Pope, B. D. *et al.* Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature* **515**, 402–405 (2014).
41. Emerson, D. J. *et al.* Cohesin-mediated loop anchors confine the locations of human replication origins. *Nature* **606**, 812–819 (2022).
42. Foti, R. *et al.* Nuclear Architecture Organized by Rif1 Underpins the Replication-Timing Program. *Mol Cell* **61**, 260–273 (2016).
43. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
44. Kagey, M. H. *et al.* Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* **467**, 430–435 (2010).

45. Lai, F. *et al.* Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* **494**, 497–501 (2013).
46. Sexton, T., Umlauf, D., Kurukuti, S. & Fraser, P. The role of transcription factories in large-scale structure and dynamics of interphase chromatin. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**, 691–697 (2007).
47. Chatterjee, N. & Walker, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **58**, 235–263 (2017).
48. Thorslund, T. *et al.* Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* **527**, 389–393 (2015).
49. Doil, C. *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**, 435–446 (2009).
50. Misteli, T. & Soutoglou, E. The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 243–254 (2009).
51. Lamm, N., Rogers, S. & Cesare, A. J. Chromatin mobility and relocation in DNA repair. *Trends in Cell Biology* **31**, 843–855 (2021).
52. Chakraborty, U., Shen, Z.-J. & Tyler, J. Chaperoning histones at the DNA repair dance. *DNA Repair* **108**, 103240 (2021).
53. Caridi, C. P. *et al.* Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* **559**, 54–60 (2018).
54. Schrank, B. R. *et al.* Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature* **559**, 61–66 (2018).
55. Clouaire, T. & Legube, G. A Snapshot on the Cis Chromatin Response to DNA Double-Strand Breaks. *Trends in Genetics* **35**, 330–345 (2019).
56. Arnould, C. *et al.* Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci. *Nature* **590**, 660–665 (2021).
57. Spegg, V. & Altmeyer, M. Biomolecular condensates at sites of DNA damage: More than just a phase. *DNA Repair (Amst)* **106**, 103179 (2021).
58. Wang, W.-Y. *et al.* Interaction of FUS and HDAC1 Regulates DNA Damage Response and Repair in Neurons. *Nat Neurosci* **16**, 1383–1391 (2013).
59. Levone, B. R. *et al.* FUS-dependent liquid–liquid phase separation is important for DNA repair initiation. *Journal of Cell Biology* **220**, e202008030 (2021).
60. Wang, M., Sunkel, B. D., Ray, W. C. & Stanton, B. Z. Chromatin structure in cancer. *BMC Mol Cell Biol* **23**, 35 (2022).
61. Karpińska, M. & Czauderna, M. Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology* **13**, (2022).
62. Ferlay, J., Partensky, C. & Bray, F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta Oncologica* **55**, 1158–1160 (2016).
63. Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S. & Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **73**, 17–48 (2023).
64. Stoffel, E. M., Brand, R. E. & Goggins, M. Pancreatic Cancer: Changing Epidemiology and New Approaches to Risk Assessment, Early Detection, and Prevention. *Gastroenterology* **164**, 752–765 (2023).
65. Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M. & Simeone, D. M. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* **163**, 386–402.e1 (2022).
66. Neuzillet, C. *et al.* Pancreatic cancer: French clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, ACHBT, AFC). *Digestive and Liver Disease* **50**, 1257–1271 (2018).

67. de Sousa Cavalcante, L. & Monteiro, G. Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European Journal of Pharmacology* **741**, 8–16 (2014).
68. Bailly, C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological Research* **148**, 104398 (2019).
69. Rancoule, C. *et al.* Les 50 ans du cisplatine. *Bulletin du Cancer* **104**, 167–176 (2017).
70. McGuigan, A. *et al.* Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* **24**, 4846–4861 (2018).
71. Zeng, S. *et al.* Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci* **20**, 4504 (2019).
72. Buscail, L., Bournet, B., Dufresne, M., Torrisani, J. & Cordelier, P. [Advance in the biology of pancreatic of cancer]. *Bull Cancer* **102**, S53-61 (2015).
73. Holter, S. *et al.* Germline BRCA Mutations in a Large Clinic-Based Cohort of Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **33**, 3124–3129 (2015).
74. Golan, T. *et al.* Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* **381**, 317–327 (2019).
75. Kindler, H. L. *et al.* Overall Survival Results From the POLO Trial: A Phase III Study of Active Maintenance Olaparib Versus Placebo for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol* **40**, 3929–3939 (2022).
76. Hilmi, M. & Neuzillet, C. Nouvelle AMM : olaparib — cancer du pancréas avec mutation germinale de BRCA. *Bulletin du Cancer* **107**, 961–962 (2020).
77. Wood, L. D., Yurgelun, M. B. & Goggins, M. G. Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **156**, 2041–2055 (2019).
78. Jones, S. *et al.* Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* **321**, 1801–1806 (2008).
79. Perkhofer, L. *et al.* DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives. *Gut* **70**, 606–617 (2021).
80. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
81. Flores, L. F. *et al.* Nuclear Dynamics and Chromatin Structure: Implications for Pancreatic Cancer. *Cells* **10**, 2624 (2021).
82. Collisson, E. A. *et al.* Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nat Med* **17**, 500–503 (2011).
83. Moffitt, R. A. *et al.* Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Genet* **47**, 1168–1178 (2015).
84. Puleo, F. *et al.* Stratification of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas Based on Tumor and Microenvironment Features. *Gastroenterology* **155**, 1999-2013.e3 (2018).
85. Karasinska, J. M. *et al.* Altered Gene Expression along the Glycolysis-Cholesterol Synthesis Axis Is Associated with Outcome in Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Res* **26**, 135–146 (2020).
86. Thakur, R. & Singh, P. K. Molecular Subtypes of Pancreatic Cancer: A Proteomics Approach. *Clinical Cancer Research* **27**, 3272–3274 (2021).
87. Flowers, B. M. *et al.* Cell of Origin Influences Pancreatic Cancer Subtype. *Cancer Discovery* **11**, 660–677 (2021).
88. Kopp, J. L. *et al.* Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **22**, 737–750 (2012).

89. Storz, P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**, 296–304 (2017).
90. Iacobuzio-Donahue, C. A. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut* **61**, 1085–1094 (2012).
91. Ho, W. J., Jaffee, E. M. & Zheng, L. The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nat Rev Clin Oncol* **17**, 527–540 (2020).
92. Lakshminarasimhan, R. & Liang, G. The Role of DNA Methylation in Cancer. *Adv Exp Med Biol* **945**, 151–172 (2016).
93. Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89–92 (1983).
94. Jones, P. A. & Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* **3**, 415–428 (2002).
95. Silverman, B. R. & Shi, J. Alterations of Epigenetic Regulators in Pancreatic Cancer and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci* **17**, 2138 (2016).
96. Guo, M. *et al.* Epigenetic changes associated with neoplasms of the exocrine and endocrine pancreas. *Discov Med* **17**, 67–73 (2014).
97. Nones, K. *et al.* Genome-wide DNA methylation patterns in pancreatic ductal adenocarcinoma reveal epigenetic deregulation of SLIT-ROBO, ITGA2 and MET signaling. *Int J Cancer* **135**, 1110–1118 (2014).
98. Fan, X. *et al.* Integrated single-cell multiomics analysis reveals novel candidate markers for prognosis in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell Discov* **8**, 1–16 (2022).
99. Shibata, H. *et al.* In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nat Commun* **9**, 2081 (2018).
100. Benitz, S. *et al.* Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. *Oncotarget* **7**, 11424–11433 (2016).
101. Benitz, S. *et al.* Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut* **68**, 2007–2018 (2019).
102. Grzenda, A., Ordog, T. & Urrutia, R. Polycomb and the Emerging Epigenetics of Pancreatic Cancer. *J Gastrointest Cancer* **42**, 100–111 (2011).
103. Li, C. H. *et al.* Enhancer of Zeste Homolog 2 Silences MicroRNA-218 in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells by Inducing Formation of Heterochromatin. *Gastroenterology* **144**, 1086–1097.e9 (2013).
104. Li, C.-H. *et al.* EZH2 coupled with HOTAIR to silence MicroRNA-34a by the induction of heterochromatin formation in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer* **140**, 120–129 (2017).
105. Chen, N.-M. *et al.* Context-Dependent Epigenetic Regulation of Nuclear Factor of Activated T Cells 1 in Pancreatic Plasticity. *Gastroenterology* **152**, 1507–1520.e15 (2017).
106. Alonso-Curbelo, D. *et al.* A gene–environment-induced epigenetic program initiates tumorigenesis. *Nature* **590**, 642–648 (2021).
107. Tsuda, M., Fukuda, A., Kawai, M., Araki, O. & Seno, H. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* **112**, 490–497 (2021).
108. von Figura, G. *et al.* The chromatin regulator Brg1 suppresses formation of intraductal papillary mucinous neoplasm and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Cell Biol* **16**, 255–267 (2014).
109. Roy, N. *et al.* Brg1 promotes both tumor-suppressive and oncogenic activities at distinct stages of pancreatic cancer formation. *Genes Dev.* **29**, 658–671 (2015).

110. Chandler, R. L. *et al.* ARID1a-DNA interactions are required for promoter occupancy by SWI/SNF. *Mol Cell Biol* **33**, 265–280 (2013).
111. Puckett, Y., Sharma, B. & Kasi, A. Intraductal Papillary Mucinous Cancer of the Pancreas. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
112. Kimura, Y. *et al.* ARID1A Maintains Differentiation of Pancreatic Ductal Cells and Inhibits Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Gastroenterology* **155**, 194–209.e2 (2018).
113. Wang, W. *et al.* ARID1A, a SWI/SNF subunit, is critical to acinar cell homeostasis and regeneration and is a barrier to transformation and epithelial-mesenchymal transition in the pancreas. *Gut* **68**, 1245–1258 (2019).
114. Livshits, G. *et al.* Arid1a restrains Kras-dependent changes in acinar cell identity. *eLife* **7**, e35216.
115. Li, Y. *et al.* Mutant Kras co-opts a proto-oncogenic enhancer network in inflammation-induced metaplastic progenitor cells to initiate pancreatic cancer. *Nat Cancer* **2**, 49–65 (2021).
116. Ren, B. *et al.* High-resolution Hi-C maps highlight multiscale 3D epigenome reprogramming during pancreatic cancer metastasis. *J Hematol Oncol* **14**, 120 (2021).
117. Akdemir, K. C. *et al.* Disruption of chromatin folding domains by somatic genomic rearrangements in human cancer. *Nat Genet* **52**, 294–305 (2020).
118. Du, Y. *et al.* Dynamic Interplay between Structural Variations and 3D Genome Organization in Pancreatic Cancer. *Advanced Science* **9**, 2200818 (2022).
119. Anfinsen, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223–230 (1973).
120. Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F. & Jones, D. T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology* **337**, 635–645 (2004).
121. van der Lee, R. *et al.* Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem Rev* **114**, 6589–6631 (2014).
122. Wright, P. E. & Dyson, H. J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 18–29 (2015).
123. Borchers, W. *et al.* Disorder and residual helicity alter p53-Mdm2 binding affinity and signaling in cells. *Nat Chem Biol* **10**, 1000–1002 (2014).
124. Fuxreiter, M. & Tompa, P. Fuzzy Complexes: A More Stochastic View of Protein Function. in *Fuzziness* (eds. Fuxreiter, M. & Tompa, P.) vol. 725 1–14 (Springer US, 2012).
125. Dunker, A. K. *et al.* Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**, 26–59 (2001).
126. Schramm, A. *et al.* An arsenal of methods for the experimental characterization of intrinsically disordered proteins – How to choose and combine them? *Archives of Biochemistry and Biophysics* **676**, 108055 (2019).
127. Dosztányi, Z. Prediction of protein disorder based on IUPred. *Protein Sci* **27**, 331–340 (2018).
128. Romero, P., Obradovic, Z. & Dunker, A. K. Natively disordered proteins: functions and predictions. *Appl Bioinformatics* **3**, 105–113 (2004).
129. Ishida, T. & Kinoshita, K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res* **35**, W460–464 (2007).
130. Walsh, I., Martin, A. J. M., Di Domenico, T. & Tosatto, S. C. E. ESpritz: accurate and fast prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **28**, 503–509 (2012).

131. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Unfolded proteins and protein folding studied by NMR. *Chem Rev* **104**, 3607–3622 (2004).
132. Sibille, N. & Bernado, P. Structural characterization of intrinsically disordered proteins by the combined use of NMR and SAXS. *Biochemical Society transactions* **40**, 955–62 (2012).
133. LeBlanc, S. J., Kulkarni, P. & Weninger, K. R. Single Molecule FRET: A Powerful Tool to Study Intrinsically Disordered Proteins. *Biomolecules* **8**, 140 (2018).
134. Oates, M. E. *et al.* D2P2: database of disordered protein predictions. *Nucleic Acids Res* **41**, D508–D516 (2013).
135. Fukuchi, S. *et al.* IDEAL: Intrinsically Disordered proteins with Extensive Annotations and Literature. *Nucleic Acids Res* **40**, D507–D511 (2012).
136. Sickmeier, M. *et al.* DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic Acids Res* **35**, D786–793 (2007).
137. Brosey, C. A. *et al.* Functional Dynamics in Replication Protein A DNA Binding and Protein Recruitment Domains. *Structure* **23**, 1028–1038 (2015).
138. Babu, M. M. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem Soc Trans* **44**, 1185–1200 (2016).
139. Chu, I. M., Hengst, L. & Slingerland, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* **8**, 253–267 (2008).
140. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **18**, 285–298 (2017).
141. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, eaaf4382 (2017).
142. Mitrea, D. M. & Kriwacki, R. W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun Signal* **14**, 1–20 (2016).
143. Jiang, S., Fagman, J. B., Chen, C., Alberti, S. & Liu, B. Protein phase separation and its role in tumorigenesis. *eLife* **9**, e60264 (2020).
144. Li, P. *et al.* Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* **483**, 336–340 (2012).
145. Bondos, S. E., Dunker, A. K. & Uversky, V. N. Intrinsically disordered proteins play diverse roles in cell signaling. *Cell Commun Signal* **20**, 1–26 (2022).
146. Lafontaine, D. L. J., Riback, J. A., Bascetin, R. & Brangwynne, C. P. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 165–182 (2021).
147. Erdel, F. *et al.* Mouse Heterochromatin Adopts Digital Compaction States without Showing Hallmarks of HP1-Driven Liquid-Liquid Phase Separation. *Molecular Cell* **78**, 236–249.e7 (2020).
148. Erdel, F. Phase transitions in heterochromatin organization. *Current Opinion in Structural Biology* **80**, 102597 (2023).
149. Erdel, F. & Rippe, K. Formation of Chromatin Subcompartments by Phase Separation. *Biophysical Journal* **114**, 2262–2270 (2018).
150. Stam, M., Tark-Dame, M. & Fransz, P. 3D genome organization: a role for phase separation and loop extrusion? *Current Opinion in Plant Biology* **48**, 36–46 (2019).
151. Wang, J. *et al.* Phase separation of OCT4 controls TAD reorganization to promote cell fate transitions. *Cell Stem Cell* **28**, 1868–1883.e11 (2021).
152. Demmerle, J., Hao, S. & Cai, D. Transcriptional condensates and phase separation: condensing information across scales and mechanisms. *Nucleus* **14**, 2213551.
153. Sabari, B. R. *et al.* Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **361**, eaar3958 (2018).

154. Lu, Y. *et al.* Phase separation of TAZ compartmentalizes the transcription machinery to promote gene expression. *Nat Cell Biol* **22**, 453–464 (2020).
155. Altmeyer, M. *et al.* Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). *Nat Commun* **6**, 8088 (2015).
156. Kilic, S. *et al.* Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *The EMBO Journal* **38**, e101379 (2019).
157. Case, L. B., Zhang, X., Ditlev, J. A. & Rosen, M. K. Stoichiometry controls activity of phase-separated clusters of actin signaling proteins. *Science* **363**, 1093–1097 (2019).
158. Hijaz, B. A. & Volpicelli-Daley, L. A. Initiation and propagation of α -synuclein aggregation in the nervous system. *Molecular Neurodegeneration* **15**, 19 (2020).
159. Ray, S. *et al.* α -Synuclein aggregation nucleates through liquid–liquid phase separation. *Nat. Chem.* **12**, 705–716 (2020).
160. Martinelli, A. H. S., Lopes, F. C., John, E. B. O., Carlini, C. R. & Ligabue-Braun, R. Modulation of Disordered Proteins with a Focus on Neurodegenerative Diseases and Other Pathologies. *Int J Mol Sci* **20**, 1322 (2019).
161. Uversky, V. N., Oldfield, C. J. & Dunker, A. K. Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* **37**, 215–246 (2008).
162. Knopman, D. S. *et al.* Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 1–21 (2021).
163. Kanaan, N. M., Hamel, C., Grabinski, T. & Combs, B. Liquid-liquid phase separation induces pathogenic tau conformations in vitro. *Nat Commun* **11**, 2809 (2020).
164. Patel, A. *et al.* A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* **162**, 1066–1077 (2015).
165. Zbinden, A., Pérez-Berlanga, M., De Rossi, P. & Polymenidou, M. Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force. *Developmental Cell* **55**, 45–68 (2020).
166. Clark, A. & Burlison, M. SPOP and cancer: a systematic review. *Am J Cancer Res* **10**, 704–726 (2020).
167. Barbieri, C. E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* **44**, 685–689 (2012).
168. Li, C. *et al.* Tumor Suppressor Role for the SPOP Ubiquitin Ligase in Signal-Dependent Proteolysis of the Oncogenic Coactivator SRC-3/AIB1. *Oncogene* **30**, 4350–4364 (2011).
169. Bouchard, J. J. *et al.* Cancer Mutations of the Tumor Suppressor SPOP Disrupt the Formation of Active, Phase-Separated Compartments. *Molecular Cell* **72**, 19–36.e8 (2018).
170. Kovar, H. Dr. Jekyll and Mr. Hyde: The Two Faces of the FUS/EWS/TAF15 Protein Family. *Sarcoma* **2011**, 837474 (2011).
171. Shorter, J. Prion-like Domains Program Ewing’s Sarcoma. *Cell* **171**, 30–31 (2017).
172. Boulay, G. *et al.* Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain. *Cell* **171**, 163–178.e19 (2017).
173. Gough, S. M., Slape, C. I. & Aplan, P. D. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood* **118**, 6247–6257 (2011).
174. Ahn, J. H. *et al.* Phase separation drives aberrant chromatin looping and cancer development. *Nature* **595**, 591–595 (2021).
175. About us. *Dewpoint Therapeutics* <https://dewpointx.com/about-us/>.
176. Nomura, N. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. II. The Coding Sequences of 40 New Genes (KIAA0041-KIAA0080) Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1. *DNA Research* **1**, 223–229 (1994).

177. Lee, J. W., Choi, H. S., Gyuris, J., Brent, R. & Moore, D. D. Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **9**, 243–254 (1995).
178. Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol Cell Biol* **13**, 775–784 (1993).
179. Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. & Howley, P. M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2563–2567 (1995).
180. Park, Y., Yoon, S. K. & Yoon, J.-B. TRIP12 functions as an E3 ubiquitin ligase of APP-BP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**, 294–298 (2008).
181. Wakano, C., Byun, J. S., Di, L.-J. & Gardner, K. The Dual Lives of Bidirectional Promoters. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 688–693 (2012).
182. Chang, J.-W. *et al.* mRNA 3'-UTR shortening is a molecular signature of mTORC1 activation. *Nat Commun* **6**, 7218 (2015).
183. Ju, D., Wang, X., Xu, H. & Xie, Y. The armadillo repeats of the Ufd4 ubiquitin ligase recognize ubiquitin-fusion proteins. *FEBS Letters* **581**, 265–270 (2007).
184. Aravind, L. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 273–275 (2001).
185. Larrieu, D. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRIP12 participates in cell cycle progression and chromosome stability. *Sci Rep* **10**, 789 (2020).
186. Park, Y., Yoon, S. K. & Yoon, J.-B. The HECT domain of TRIP12 ubiquitinates substrates of the ubiquitin fusion degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 1540–1549 (2009).
187. Hanoun, N. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase Thyroid Hormone Receptor-interacting Protein 12 Targets Pancreas Transcription Factor 1a for Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* **289**, 35593–35604 (2014).
188. Gatti, M., Imhof, R., Huang, Q., Baudis, M. & Altmeyer, M. The Ubiquitin Ligase TRIP12 Limits PARP1 Trapping and Constrains PARP Inhibitor Efficiency. *Cell Reports* **32**, 107985 (2020).
189. Tewari, R., Bailes, E., Bunting, K. A. & Coates, J. C. Armadillo-repeat protein functions: questions for little creatures. *Trends in Cell Biology* **20**, 470–481 (2010).
190. Liu, X. *et al.* Trip12 is an E3 ubiquitin ligase for USP7/HAUSP involved in the DNA damage response. *FEBS Letters* **590**, 4213–4222 (2016).
191. Toretsky, J. A. & Wright, P. E. Assemblages: Functional units formed by cellular phase separation. *J Cell Biol* **206**, 579–588 (2014).
192. Kumar, D. K. *et al.* Complementary strategies for directing in vivo transcription factor binding through DNA binding domains and intrinsically disordered regions. *Molecular Cell* **83**, 1462-1473.e5 (2023).
193. Vuzman, D. & Levy, Y. Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein–DNA interactions. *Mol. BioSyst.* **8**, 47–57 (2012).
194. Seo, B. A. *et al.* TRIP12 ubiquitination of glucocerebrosidase contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Neuron* **109**, 3758-3774.e11 (2021).
195. Brunet, M., Vargas, C., Larrieu, D., Torrisani, J. & Dufresne, M. E3 Ubiquitin Ligase TRIP12: Regulation, Structure, and Physiopathological Functions. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, E8515 (2020).
196. Tissue expression of TRIP12 - Summary - The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000153827-TRIP12/tissue>.

197. Hornbeck, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res* **40**, D261-270 (2012).
198. Cai, J.-B. *et al.* Ubiquitin-specific protease 7 accelerates p14ARF degradation by deubiquitinating thyroid hormone receptor-interacting protein 12 and promotes hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* **61**, 1603–1614 (2015).
199. Georges, A., Marcon, E., Greenblatt, J. & Frappier, L. Identification and Characterization of USP7 Targets in Cancer Cells. *Sci Rep* **8**, 15833 (2018).
200. Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* **17**, 7151–7160 (1998).
201. Chen, Z. J. & Sun, L. J. Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell* **33**, 275–286 (2009).
202. Stark, C. *et al.* BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res* **34**, D535-539 (2006).
203. Keppler, B. R. & Archer, T. K. Ubiquitin-dependent and Ubiquitin-independent Control of Subunit Stoichiometry in the SWI/SNF Complex. *J Biol Chem* **285**, 35665–35674 (2010).
204. Chen, D., Shan, J., Zhu, W.-G., Qin, J. & Gu, W. Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses. *Nature* **464**, 624–627 (2010).
205. Gudjonsson, T. *et al.* TRIP12 and UBR5 Suppress Spreading of Chromatin Ubiquitylation at Damaged Chromosomes. *Cell* **150**, 697–709 (2012).
206. An, C.-I., Ganio, E. & Hagiwara, N. Trip12, a HECT domain E3 ubiquitin ligase, targets Sox6 for proteasomal degradation and affects fiber type-specific gene expression in muscle cells. *Skelet Muscle* **3**, 11 (2013).
207. Kweon, S.-M. *et al.* An Adversarial DNA N6-Methyladenine-Sensor Network Preserves Polycomb Silencing. *Mol Cell* **74**, 1138-1147.e6 (2019).
208. Tang, Y. *et al.* Mild iron overload induces TRIP12-mediated degradation of YY1 to trigger hepatic inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **161**, 187–197 (2020).
209. Khan, O. M. *et al.* Proteasomal degradation of the tumour suppressor FBW7 requires branched ubiquitylation by TRIP12. *Nat Commun* **12**, 2043 (2021).
210. van Wijk, S. J. L. & Timmers, H. T. M. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J* **24**, 981–993 (2010).
211. Yang, Q., Zhao, J., Chen, D. & Wang, Y. E3 ubiquitin ligases: styles, structures and functions. *Mol Biomed* **2**, 23 (2021).
212. Hatfield, P. M. & Vierstra, R. D. Multiple forms of ubiquitin-activating enzyme E1 from wheat. Identification of an essential cysteine by in vitro mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 14799–14803 (1992).
213. Ravid, T. & Hochstrasser, M. Degradation signal diversity in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 679–690 (2008).
214. Nijman, S. M. B. *et al.* A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773–786 (2005).
215. Yau, R. & Rape, M. The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nat Cell Biol* **18**, 579–586 (2016).
216. Haglund, K. & Dikic, I. Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J* **24**, 3353–3359 (2005).
217. Schick, S. *et al.* Systematic characterization of BAF mutations provides insights into intra-complex synthetic lethality in human cancers. *Nat Genet* **51**, 1399–1410 (2019).
218. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**, 6–21 (2002).

219. Rodriguez, F., Yushenova, I. A., DiCorpo, D. & Arkhipova, I. R. Bacterial N4-methylcytosine as an epigenetic mark in eukaryotic DNA. *Nat Commun* **13**, 1072 (2022).
220. Xie, Q. *et al.* N6-methyladenine DNA Modification in Glioblastoma. *Cell* **175**, 1228-1243.e20 (2018).
221. Hauri, S. *et al.* A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome. *Cell Reports* **17**, 583–595 (2016).
222. Verheul, T. C. J., van Hijfte, L., Perenthaler, E. & Barakat, T. S. The Why of YY1: Mechanisms of Transcriptional Regulation by Yin Yang 1. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
223. Weintraub, A. S. *et al.* YY1 Is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell* **171**, 1573-1588.e28 (2017).
224. Li, L. *et al.* YY1 Interacts with Guanine Quadruplexes to Regulate DNA Looping and Gene Expression. *Nat Chem Biol* **17**, 161–168 (2021).
225. Hsieh, T.-H. S. *et al.* Enhancer-promoter interactions and transcription are largely maintained upon acute loss of CTCF, cohesin, WAPL or YY1. *Nat Genet* **54**, 1919–1932 (2022).
226. Matthews, H. K., Bertoli, C. & de Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 74–88 (2022).
227. Chen, D., Yoon, J.-B. & Gu, W. Reactivating the ARF-p53 axis in AML cells by targeting ULF. *Cell Cycle* **9**, 3018–3023 (2010).
228. Chen, D. *et al.* Differential Effects on ARF Stability by Normal versus Oncogenic Levels of c-Myc Expression. *Molecular Cell* **51**, 46–56 (2013).
229. Lo, D. *et al.* Nucleostemin stabilizes ARF by inhibiting the ubiquitin ligase ULF. *Oncogene* **34**, 1688–1697 (2015).
230. Chio, I. I. C. *et al.* TRADD contributes to tumour suppression by regulating ULF-dependent p19Arf ubiquitylation. *Nat Cell Biol* **14**, 625–633 (2012).
231. Kajiro, M. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Trip12 Is Essential for Mouse Embryogenesis. *PLoS One* **6**, (2011).
232. Velimezi, G. *et al.* Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nat Cell Biol* **15**, 967–977 (2013).
233. Matsuoka, S. *et al.* ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**, 1160–1166 (2007).
234. Dabin, J., Fortuny, A. & Polo, S. E. Epigenome maintenance in response to DNA damage. *Mol Cell* **62**, 712–727 (2016).
235. Sekiguchi, M. & Matsushita, N. DNA Damage Response Regulation by Histone Ubiquitination. *Int J Mol Sci* **23**, 8187 (2022).
236. Challa, K. *et al.* Damage-induced chromatome dynamics link Ubiquitin ligase and proteasome recruitment to histone loss and efficient DNA repair. *Molecular Cell* **81**, 811-829.e6 (2021).
237. Hauer, M. H. *et al.* Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 99–107 (2017).
238. Ray Chaudhuri, A. & Nussenzweig, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 610–621 (2017).
239. Fell, V. L. *et al.* Ku70 Serine 155 mediates Aurora B inhibition and activation of the DNA damage response. *Sci Rep* **6**, 37194 (2016).
240. Abbasi, S., Bayat, L. & Schild-Poulter, C. Analysis of Ku70 S155 Phospho-Specific BioID2 Interactome Identifies Ku Association with TRIP12 in Response to DNA Damage. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 7041 (2023).

241. Henderson, J. M. *et al.* Identification of HECT E3 ubiquitin ligase family genes involved in stem cell regulation and regeneration in planarians. *Developmental Biology* **404**, 21–34 (2015).
242. Romero, O. A. & Sanchez-Cespedes, M. The SWI/SNF genetic blockade: effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. *Oncogene* **33**, 2681–2689 (2014).
243. Piunti, A. & Shilatifard, A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 326–345 (2021).
244. Cerami, E. *et al.* The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov* **2**, 401–404 (2012).
245. Yoo, N. J., Park, S. W. & Lee, S. H. Frameshift mutations of ubiquitination-related genes HERC2, HERC3, TRIP12, UBE2Q1 and UBE4B in gastric and colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Pathology* **43**, 753–755 (2011).
246. Hein, R. *et al.* A genome-wide association study to identify genetic susceptibility loci that modify ductal and lobular postmenopausal breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy use: a two-stage design with replication. *Breast Cancer Res Treat* **138**, 529–542 (2013).
247. Li, C. H. *et al.* MeCP2 links heterochromatin condensates and neurodevelopmental disease. *Nature* **586**, 440–444 (2020).
248. Gao, P., Jin, Z., Cheng, Y. & Cao, X. RNA-Seq analysis identifies aberrant RNA splicing of TRIP12 in acute myeloid leukemia patients at remission. *Tumor Biol.* **35**, 9585–9590 (2014).
249. Cacheux, W. *et al.* Exome sequencing reveals aberrant signalling pathways as hallmark of treatment-naïve anal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**, 464–476 (2018).
250. Shiba, N. *et al.* Transcriptome analysis offers a comprehensive illustration of the genetic background of pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv* **3**, 3157–3169 (2019).
251. Zhang, F., Li, W., Cui, Q., Chen, Y. & Liu, Y. Case Report: Immune Microenvironment and Mutation Features in a Patient With Epstein–Barr Virus Positive Large B-Cell Lymphoma Secondary to Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Front Genet* **13**, 940513 (2022).
252. Tang, Z. *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* **45**, W98–W102 (2017).
253. Thul, P. J. & Lindskog, C. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. *Protein Sci* **27**, 233–244 (2018).
254. Horvat, A. *et al.* Helicobacter pylori pathogen regulates p14ARF tumor suppressor and autophagy in gastric epithelial cells. *Oncogene* **37**, 5054–5065 (2018).
255. Lee, K. K. *et al.* The oncogenic E3 ligase TRIP12 suppresses epithelial–mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal traits through ZEB1/2. *Cell Death Discov* **7**, 95 (2021).
256. Wang, L. *et al.* TRIP12 as a mediator of human papillomavirus/p16-related radiation enhancement effects. *Oncogene* **36**, 820–828 (2017).
257. Molkenhine, J. M. *et al.* Targeting DNA damage response in head and neck cancers through abrogation of cell cycle checkpoints. *Int J Radiat Biol* **97**, 1121–1128 (2021).
258. Landrum, M. J. *et al.* ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* **42**, D980–D985 (2014).
259. Lelieveld, S. H. *et al.* Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nat Neurosci* **19**, 1194–1196 (2016).
260. Zhang, J. *et al.* Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin-protein ligase gene TRIP12 causes intellectual disability with or without autism spectrum disorders, speech delay, and dysmorphic features. *Hum. Genet.* **136**, 377–386 (2017).

261. Iossifov, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216–221 (2014).
262. O’Roak, B. J. *et al.* Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat Commun* **5**, 5595 (2014).
263. Bramswig, N. C. *et al.* Identification of new TRIP12 variants and detailed clinical evaluation of individuals with non-syndromic intellectual disability with or without autism. *Hum Genet* **136**, 179–192 (2017).
264. Louie, R. J. *et al.* Clark-Baraitser syndrome is associated with a nonsense alteration in the autosomal gene TRIP12. *American Journal of Medical Genetics Part A* **182**, 595–596 (2020).
265. van der Laan, L. *et al.* Episignature Mapping of TRIP12 Provides Functional Insight into Clark–Baraitser Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 13664 (2022).
266. Aerden, M. *et al.* The neurodevelopmental and facial phenotype in individuals with a TRIP12 variant. *Eur J Hum Genet* 1–8 (2023) doi:10.1038/s41431-023-01307-x.
267. Krah, N. M. *et al.* The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife* **4**,.
268. Krah, N. M. *et al.* Prevention and Reversion of Pancreatic Tumorigenesis through a Differentiation-Based Mechanism. *Developmental Cell* **50**, 744–754.e4 (2019).
269. Qin, Y. *et al.* PRMT5 enhances tumorigenicity and glycolysis in pancreatic cancer via the FBW7/cMyc axis. *Cell Communication and Signaling* **17**, 30 (2019).
270. Seo, B. A. *et al.* TRIP12 ubiquitination of glucocerebrosidase contributes to neurodegeneration in Parkinson’s disease. *Neuron* **109**, 3758–3774.e11 (2021).
271. Xu, Y. *et al.* Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell* **48**, 723–733 (2012).
272. Sarcinella, E., Zuzarte, P. C., Lau, P. N. I., Draker, R. & Cheung, P. Monoubiquitylation of H2A.Z Distinguishes Its Association with Euchromatin or Facultative Heterochromatin. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 6457–6468 (2007).
273. Meneghini, M. D., Wu, M. & Madhani, H. D. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* **112**, 725–736 (2003).
274. Colino-Sanguino, Y., Clark, S. J. & Valdes-Mora, F. The H2A.Z-nucleosome code in mammals: emerging functions. *Trends in Genetics* **38**, 273–289 (2022).
275. Uversky, V. N. The intrinsic disorder alphabet. III. Dual personality of serine. *Intrinsically Disord Proteins* **3**, e1027032 (2015).
276. Owen, I. & Shewmaker, F. The Role of Post-Translational Modifications in the Phase Transitions of Intrinsically Disordered Proteins. *Int J Mol Sci* **20**, (2019).
277. Monahan, Z. *et al.* Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity. *EMBO J* **36**, 2951–2967 (2017).
278. Okada, Y. Sperm chromatin structure: Insights from in vitro to in situ experiments. *Current Opinion in Cell Biology* **75**, 102075 (2022).
279. Hebert, M. D. & Poole, A. R. Towards an understanding of regulating Cajal body activity by protein modification. *RNA Biol* **14**, 761–778 (2016).
280. Vuzman, D., Azia, A. & Levy, Y. Searching DNA via a “Monkey Bar” Mechanism: The Significance of Disordered Tails. *Journal of Molecular Biology* **396**, 674–684 (2010).
281. Sheinman, M. & Kafri, Y. The effects of intersegmental transfers on target location by proteins. *Phys. Biol.* **6**, 016003 (2009).
282. RESERVES, I. U.-T. D. Orphanet: Caractérisation de la perturbation de l’architecture 3D de la chromatine dans les réarrangements chromosomiques pour identifier les gènes candidats dans les troubles neurodéveloppementaux. <https://www.orpha.net/consor/cgi->

bin/ResearchTrials_ResearchProjects.php?lng=FR&data_id=149756&Nom%20du%20projet%20de%20recherche=Caracterisation-de-la-perturbation-de-l-architecture-3D-de-la-chromatine-dans-les-rearrangements-chromosomiques-pour-identifier-les-genes-candidats-dans-les-troubles-neurodeveloppementaux&title=Caract%20E9risation%20de%20la%20perturbation%20de%20l_architecture%203D%20de%20la%20chromatine%20dans%20les%20r%E9arrangements%20chromosomiques%20pour%20identifier%20les%20g%E8nes%20candidats%20dans%20les%20troubles%20neurod%E9veloppementaux&search=ResearchTrials_ResearchProjects_Simple.

283. Gabriele, M. *et al.* YY1 Haploinsufficiency Causes an Intellectual Disability Syndrome Featuring Transcriptional and Chromatin Dysfunction. *Am J Hum Genet* **100**, 907–925 (2017).
284. Salifou, K. *et al.* Chromatin-associated MRN complex protects highly transcribing genes from genomic instability. *Sci Adv* **7**, eabb2947 (2021).
285. Ruff, S., Logan, S. K., Garabedian, M. J. & Huang, T. T. Roles for MDC1 in cancer development and treatment. *DNA Repair (Amst)* **95**, 102948 (2020).
286. Kleiner, R. E., Verma, P., Molloy, K. R., Chait, B. T. & Kapoor, T. M. Chemical proteomics reveals a γ H2AX-53BP1 interaction in the DNA damage response. *Nat Chem Biol* **11**, 807–814 (2015).
287. Krum, S. A., la Rosa Dalugdugan, E. de, Miranda-Carboni, G. A. & Lane, T. F. BRCA1 Forms a Functional Complex with γ -H2AX as a Late Response to Genotoxic Stress. *J Nucleic Acids* **2010**, 801594 (2010).
288. Shibata, A. & Jeggo, P. A. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **93**, 102915 (2020).

