



**HAL**  
open science

# Mécanismes d'assemblage des corps nucléaires PML et ciblage thérapeutique par l'arsenic

Pierre Bercier

► **To cite this version:**

Pierre Bercier. Mécanismes d'assemblage des corps nucléaires PML et ciblage thérapeutique par l'arsenic. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5035 . tel-04850925

**HAL Id: tel-04850925**

**<https://theses.hal.science/tel-04850925v1>**

Submitted on 20 Dec 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.

# Université Paris Cité

**Ecole doctorale 561, Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies**  
**Centre interdisciplinaire de recherche en biologie (U1050)**

***Equipe Nuclear Organization and Post-Translational Control in  
Physiopathology***

## **Mécanismes d'assemblage des corps nucléaires PML et ciblage thérapeutique par l'arsenic**

Par Pierre BERCIER

Thèse de doctorat d'Oncogénèse

Dirigée par le Dr. Valérie LALLEMAND-BREITENBACH

Co-dirigée par le Pr. Hugues DE THÉ

Présentée et soutenue publiquement le 31/03/2023

Membres du jury :

Dr. Umut SAHIN	PAS	Université du Bosphore	Rapporteur
Dr. Guillaume BOSSIS	DR	Université de Montpellier	Rapporteur
Dr. Marie-Hélène VERLHAC	DR	Université PSL	Présidente du jury
Dr. Géraldine GENTRIC	CR	Université Paris Cité	Examinatrice
Dr. Sophie BRASSELET	DR	Université Aix-Marseille	Examinatrice
Dr. Valérie LALLEMAND-BREITENBACH	DR	Université Paris Cité	Directrice de thèse
Pr. Hugues DE THÉ	PR	Université Paris Cité	Co-directeur de thèse



*"The journey, not the destination matters..."*

— T.S. Eliot



# Remerciements:

A l'aube de cette thèse, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette aventure.

Merci à Valérie Lallemand-Breitenbach et Hugues de Thé pour m'avoir fait confiance il y a maintenant cinq ans, à une époque où mes chances de réaliser une thèse étaient plus qu'incertaines. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné ma chance, vous n'imaginez pas ce que cela représente pour moi.

Valérie, il m'est difficile de dresser une liste de tout ce que tu m'as appris professionnellement et humainement. Tu m'as transmis ton amour de la recherche ainsi que ton engagement pour le partage de la connaissance à l'intérieur et en dehors du laboratoire. Merci pour ta patience, ta bienveillance et tous tes conseils qui ont été plus que précieux à chaque étape de cette thèse. A ton contact, j'ai pu progresser bien au-delà de ce que je pensais possible et j'espère à l'avenir être digne de tout ce que tu m'as donné.

Merci, Hugues, de m'avoir accepté au sein du laboratoire, et pour votre aide constante au cours de ces cinq années. Merci de vous être toujours rendu disponible malgré un emploi du temps plus que chargé. Merci en particulier d'avoir accepté de me guider entre les mois de septembre et novembre de cette année, durant lesquels votre présence a été décisive et m'a permis de continuer à aller de l'avant.

Merci à Guillaume Bossis et Umut Sahin qui ont accepté de prendre un temps considérable pour lire et évaluer ce manuscrit de thèse. Merci également à Marie-Hélène Verlhac, Géraldine Gentric et Sophie Brasselet d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. J'espère que les travaux que nous avons menés au cours de ces cinq années vous paraîtront intéressants et qu'ils ouvriront la voie à des discussions enrichissantes.

Merci à Patrick Mayeux, Franck Perez, Alain Joliot-Curie, Guilhem Bousquet, Zoher Gueroui et Hervé Turlier d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Votre regard critique sur ce projet a été décisif et vos conseils ont été d'une aide précieuse.

Merci à tous les membres de l'équipe pour votre bienveillance et votre aide de tous les instants.

Tout d'abord, merci à Thassadite. Je ne saurais pas par où commencer... Tu as été présente au laboratoire mais aussi en dehors. J'ai énormément appris à ton contact que ce soit professionnellement et humainement. Je n'ai jamais rencontré quelqu'un qui s'investisse autant pour ses convictions ainsi que pour les autres. Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi.

Merci à Chengchen de m'avoir accueilli et formé à mon arrivée au laboratoire. Je te souhaite tout le meilleur dans la poursuite de ta carrière.

Merci à tous les membres de l'équipe basée au Collège de France. Merci pour votre bienveillance, votre aide de tous les instants et surtout de m'avoir supporté en train de râler constamment. Merci à Omar pour ta gentillesse, ton optimisme et ta bonne humeur. Je n'aurais pas pu rêver meilleur collaborateur. Merci à Majdouline pour tout ce que tu as partagé avec moi. Ton expérience est précieuse et c'est un réel plaisir de travailler avec toi au quotidien. Merci à Caroline, pour ton sourire, ta bonne humeur et tes conseils. Merci de m'avoir supporté à côté de toi dans les premières phases de l'écriture de ce manuscrit. Merci à CJ avec qui j'ai partagé de nombreuses heures à discuter et à rire en pièce de culture cellulaire. Enfin, merci à Annie pour ta générosité et toute l'expérience que tu partages avec nous.

Merci à tous les membres de l'équipe qui ont accepté de prendre un temps considérable dans la relecture de ce manuscrit. Merci à Marie-Claude, Cécile, Emmanuel, Annie, Domitille, Gaël et une nouvelle fois Thassadite. Merci, enfin à Caroline, Cécile, Majdouline, Marie-Claude et Omar pour leur investissement sans bornes sur ce projet.

Merci à tous nos collaborateurs : l'équipe du Dr. Zoher Gueroui, du Dr. Hervé Turlier et toute l'équipe du Dr. Hua Naranmandura et du Pr. Zhou de l'université de Hangzhou. En particulier, merci au Dr. Zoher Gueroui pour tous ses conseils et d'avoir pris autant de temps pour faire de multiples retours sur ce manuscrit malgré un emploi du temps extrêmement chargé.

Je tiens également à remercier tous les étudiants en stage que j'ai eu la chance d'encadrer au cours de ma thèse. Merci à Magali, Andreea, Aïcha, Adèle et Vianney. J'espère avoir pu vous apporter quelques éléments qui vous aideront dans la suite de votre carrière. Une mention spéciale pour Adèle et Vianney, à qui je souhaite tous mes vœux de réussite dans l'examen d'entrée en thèse cette année, je crois en vous.

Merci à toutes les équipes du Collège de France de m'avoir permis d'évoluer dans un environnement fantastique. Merci à toute la plateforme de microscopie et de cytométrie : Tristan, Julien, Philippe M., Estelle, Magali, Héloïse et Gaele. Sans vous, ce projet n'aurait tout simplement pas existé. Cela aura été un plaisir de vous côtoyer quotidiennement au cours des milliers d'heures passées à la plateforme. Merci également à toute l'équipe de gestion : Nicole, Sophie, Catherine, Brigitte, Hervé et Maya qui ont été d'une aide plus que précieuse. Merci à David A. pour tous les échanges enrichissants que nous avons eu. Merci, enfin, à Jean-Luc et Philippe F. pour leur aide et leur sourire au quotidien.

Merci à l'école doctorale HOB pour avoir financé mes trois premières années de thèse puis à la fondation ARC pour la recherche contre le cancer qui a cru en ce projet et a accepté de financer ma dernière année de thèse.

Sur une note plus personnelle, je tiens à remercier ma famille, en particulier mon père, ma mère et mes deux sœurs. Les mots ne permettront jamais de retranscrire tout ce que vous avez fait pour moi. Sans vous, rien de tout cela ne se serait produit. Merci pour votre soutien de chaque instant dans les bons comme les mauvais moments. J'espère être digne de votre abnégation qui m'a permis d'en arriver ici aujourd'hui. Merci également à ma grand-mère Maria et à ma tante Ana Maria pour votre confiance, votre soutien et pour tous les colis remplis à ras bord de nourriture que vous m'avez envoyé ! Enfin, merci à mon grand-père Abel qui nous a quitté au milieu de cette thèse et qui a toujours été si fier de nous voir poursuivre nos études. J'aurais aimé te rendre fier en arrivant au bout de cette aventure.

Merci à Marie qui partage ma vie depuis plus d'un an déjà. Merci pour ton amour et ton soutien. Je ne pense sincèrement pas que j'aurais atteint la fin de cette aventure sans toi.

Merci à tous les doctorants du présent ou passé du CIRB et à tous les membres de l'association CHADOC. Pierre-Emmanuel, Juliette, Solène, Camille R.G., Tom, Sonia et Anis, l'équipe Espeli (Emma, Hosni, Justine, Céline, Lisa), Maëla, Marc, Andres, Beetsi, Camille C., Gaetan, Katia, Marion, Michela, Noémie, Hadrien et Théo, sans vous, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. Merci au trio infernal : Arthur, Nathan et Jordan qui sont présents depuis le lycée. Merci également au groupe MOUTH : Jaïr, Marie et Mickaël ainsi qu'à Audrey et Corentin qui se sont exilés au Canada pour leur thèse et à Romy. Merci d'avoir illuminé mes années de FAC, tout ce que j'ai vécu avec vous m'a permis d'en arriver jusqu'ici. J'espère tous vous revoir très vite après la fin de cette aventure. Merci enfin à Léa et Valentin ainsi qu'à Joffrey et Ugo qui continuent à être présent malgré mon indisponibilité constante. Si les amis sont la famille que l'on choisit, alors je suis heureux d'avoir une si belle famille.

Merci au RNK Paris qui m'a permis de retrouver le chemin des tatamis et m'a redonné l'envie de combattre dans cette nouvelle discipline qu'est le Jujitsu brésilien.

Et pour finir, merci à la boulangerie Ernest et Valentin qui m'a fourni l'immense majorité des 1855 pains au chocolat nécessaires à l'aboutissement de ce projet.

A vous tous, du fond du cœur, Merci.



# Résumé:

## Mécanismes d'assemblage des corps nucléaires PML et ciblage thérapeutique par l'arsenic :

PML (ProMyelocytic Leukemia) est une protéine qui structure la coque d'organelles sans membranes, nommés corps nucléaires PML (CNP). Les CNP recrutent un grand nombre de protéines partenaires et contrôlent leurs modifications post-traductionnelles, en particulier leur sumoylation, régulant leur activité. La protéine PML est impliquée dans de nombreux processus biologiques, en particulier la sénescence, l'apoptose ou le métabolisme, mais le rôle des CNP en tant que tels reste à démontrer.

Les CNP sont désorganisés par l'action de l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  dans un type de leucémie rare, la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). La combinaison d'acide rétinoïque et de trioxyde d'arsenic guérit les malades, sans chimiothérapie additionnelle. De façon déterminante, l'arsenic peut se lier directement à PML, induire le réassemblage des CNP et l'activation d'un programme de sénescence, bloquant l'auto-renouvellement des cellules leucémiques et conduisant à la guérison des patients. Cependant, le mécanisme par lequel la liaison de l'arsenic sur PML provoque cet assemblage demeure inconnu. Les CNP sont également perdus dans d'autres cancers et PML est impliquée dans certaines maladies neurodégénératives, ce qui en fait une cible thérapeutique de choix. Au cours de ma thèse, j'ai cherché à identifier les mécanismes régulant l'assemblage des CNP, en particulier en réponse à l'arsenic, et le lien entre la dynamique d'assemblage des CNP et leur fonction.

Les résultats que j'ai obtenus indiquent que les CNP présentent des caractéristiques d'organelles sans membrane s'assemblant selon un processus de séparation de phase liquide-liquide, mais avec certaines spécificités, comme celle d'être très structurés en core-shell. L'étude d'un domaine doigt de zinc de PML, la boîte B2, retrouvé muté chez les patients LAP résistants à l'arsenic, a révélé son rôle central dans la dynamique d'assemblage des CNP. Mon travail de thèse a permis de montrer, par différentes techniques et expertises que la boîte B2 contrôle l'assemblage dynamique des CNP en formant des homo-trimères. Ces derniers sont coordonnés par des interactions, de type hydrophobe, faibles et réversibles grâce à une hélice  $\alpha$  présente dans ce domaine. En outre, ces interactions positionnent au cœur du trimère une cystéine libre de l'hélice  $\alpha$  qui joue un rôle central en contrôlant la dynamique d'assemblage des CNP. C'est sur cette triade de cystéines accessibles que l'arsenic vient se loger, transformant des liaisons faibles en liaisons covalentes. L'arsenic fige ainsi les trimères de boîte B2, induisant une transition de phase des CNP vers des caractéristiques de type gel. Des résultats préliminaires montrent que la perte de l'auto-renouvellement des cellules transformées par l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  induit par l'arsenic dépend de cette triade de cystéines. Ainsi, en reliant stéréo-sélectivité et dynamique intracellulaire, nous avons élucidé la toute première étape du mécanisme d'action ciblé de l'arsenic sur PML, ouvrant la voie au développement clinique de nouvelles molécules, basé sur la structure, pour activer la biogenèse des CNP.

En collaborant au développement de corps nucléaires PML artificiels *in cellulo*, dont nous pouvons contrôler l'assemblage par séparation de phase liquide-liquide, nous cherchons à comprendre par des approches ascendantes les liens entre la structure en core-shell des CNP, leur dynamique d'assemblage et leurs fonctions de sumoylation/dégradation. Mon travail de thèse ouvre également de nouvelles perspectives pour comprendre comment les réactions redox régulent la biogenèse des CNP. L'ensemble de ces travaux présente un intérêt pour la mise au point de nouvelles thérapeutiques où l'induction de la formation des CNP et/ou de leur dégradation peut améliorer le pronostic.

Mots clefs:

Corps nucléaires PML – Leucémie aiguë promyélocytaire – Arsenic – Compartiments cellulaires sans membranes - Assemblage de complexes protéiques - Séparation de phase liquide-liquide – Sumoylation

# Abstract:

## Mechanisms of PML nuclear body formation and therapeutic targeting by arsenic:

PML (ProMyelocytic Leukemia) is the sole organizer of membrane-less organelles: the PML nuclear bodies (NBs). NBs recruit a wide variety of partner proteins and control their post-translational modifications, in particular their sumoylation, regulating their activity. The PML protein plays versatile roles in biological processes including senescence, apoptosis and metabolism, but the implication of NB formation in these processes remains elusive.

PML NBs are disorganized in acute promyelocytic leukemia (APL) where a chromosomal translocation between *PML* and *RAR $\alpha$*  leads to the production of the PML-RAR $\alpha$  oncoprotein. A combination treatment of arsenic and retinoic acid induces APL cure without additional chemotherapy. Critically, arsenic can directly bind to PML and induce NB reformation and subsequent senescence activation, leading to the loss of leukemic stem cell self-renewing activity, responsible for APL cure. However, the mechanism by which arsenic binding onto PML induces NB assembly remains unknown. NBs are lost in other kinds of cancers and PML is involved in some neurodegenerative diseases, making it an interesting therapeutic target. During my PhD, I aimed at identifying the mechanisms underlying PML NB assembly, in particular upon arsenic treatment, and deciphering the link between NB formation and their biochemical functions.

Our results show that NBs assembly follow some hallmarks of membrane-less organelles formed through liquid-liquid phase separation but display some specificities like a highly organized core-shell structure. We focused on the B2 domain of PML, which is found mutated in arsenic-resistant APL patients and revealed its central role in basal PML NB assembly dynamics. Using various technical approaches and expertise, we determined that this domain controls PML dynamics at NBs through the formation of a homo-trimer. These multimers are coordinated by weak and reversible hydrophobic interactions between  $\alpha$ -helices in the B2 domain. Moreover, these interactions regroup three free cysteine residues at the core of the trimer which play a central role in controlling the assembly dynamics of NBs. Arsenic targets this cysteine triad, transforming weak transient interactions into covalent ones. This immobilizes B2 monomers in a trimeric conformation and induces a liquid-like to gel-like transition of NBs. Preliminary data suggest that arsenic-induced loss of self-renewing activity in cells transformed by PML-RAR $\alpha$  may also depend on this cysteine triad. Thereby, linking stereo-selectivity and intracellular dynamic, we solved the first step of the mechanism by which arsenic induces NB formation. These results pave the way for the development of new structure-based activators, which mimic arsenic and activate NB assembly.

By collaborating to the development of artificial NBs *in cellulo*, where we can fine-tune assembly/disassembly by LLPS, we aim to interrogate the link between the core-shell structure of PML NBs, their dynamic assembly and their biochemical functions, in particular sumoylation and degradation of partner proteins. This project also gives new insights in the understanding of NB biogenesis' regulation by redox reactions. Overall, this project opens new perspectives for the development of new therapeutic strategies in which the formation of NB and/or its degradation can improve the therapeutic outcome.

Key words:

PML nuclear bodies – Acute promyelocytic leukemia – Arsenic – Membrane-less organelles – Protein complexes assembly – Liquid-liquid phase separation – Sumoylation

# Table des matières:

Remerciements: .....	0
Résumé: .....	4
Mécanismes d'assemblage des corps nucléaires PML et ciblage thérapeutique par l'arsenic :.....	4
Abstract: .....	5
Mechanisms of PML nuclear body formation and therapeutic targeting by arsenic:.....	5
Table des matières: .....	6
Liste des abbréviations: .....	11
Liste des figures: .....	14
Liste des tableaux: .....	15
Introduction.....	16
1. Organisation du noyau .....	17
1.1. Généralités .....	17
1.2. Organisation et assemblage des organelles sans membranes.....	18
1.2.1. Une diversité de compartiments nucléaires .....	18
1.2.2. La séparation de phase liquide-liquide.....	20
1.2.2.1. Principes de la séparation de phase liquide-liquide.....	20
1.2.2.2. LLPS et corps nucléaires .....	22
1.2.2.3. Limites du LLPS .....	24
2. Les corps nucléaires PML .....	26
2.1. Structure et domaines de la protéine PML .....	27
2.1.1. Généralités sur les TRIM.....	27
2.1.2. Le domaine RING finger.....	28
2.1.3. Les domaines boîtes B (B-box) .....	29
2.1.4. Le domaine coiled-coil.....	31
2.1.5. Les séquences C-terminales .....	32
2.2. Assemblage de PML en corps nucléaires .....	34
2.2.1. PML et stress oxydant .....	34
2.2.2. Modifications post-traductionnelles de PML .....	35
2.3.2.1. SUMOylation / ubiquitination .....	36
2.3.2.2. La phosphorylation et l'acétylation.....	38

2.2.3.	Séparation de phase liquide-liquide et assemblage des CNP .....	39
2.3.	Recrutement des protéines partenaires et modifications post-traductionnelles.....	40
3.	Fonctions associées à PML et aux corps nucléaires .....	42
3.1.	Généralités .....	42
3.2.	Apoptose .....	43
3.2.1.	Régulation de la voie p53 .....	43
3.2.2.	Autres facteurs régulateurs de l'apoptose.....	44
3.3.	Sénescence .....	45
3.4.	Réponse antivirale.....	46
3.5.	Régulation de la transcription .....	47
3.6.	Réponse aux dommages à l'ADN.....	48
3.7.	Elongation alternative des télomères .....	48
3.8.	Métabolisme des acides gras .....	49
4.	PML et pathologies.....	51
4.1.	La leucémie aiguë promyélocytaire.....	51
4.1.1.	Généralités .....	51
4.1.2.	PML-RAR $\alpha$ initiateur de la LAP .....	53
4.1.3.	L'arsenic et l'acide rétinoïque : la première thérapie anticancéreuse ciblée .....	56
4.1.3.1.	La thérapie par différenciation.....	57
4.1.3.2.	La thérapie par dégradation.....	57
4.2.	PML, une cible thérapeutique au-delà de la LAP .....	59
4.2.1.	Implications de PML dans d'autres cancers .....	59
4.2.2.	Autres stratégies anticancéreuses ciblant PML.....	61
4.2.3.	PML et maladies neurodégénératives.....	62
5.	L'arsenic.....	64
5.1.	L'arsenic, la plus vieille drogue du monde .....	64
5.2.	La réintégration de l'arsenic dans la médecine moderne .....	65
5.3.	Mécanismes d'action de l'arsenic .....	66
5.3.1.	Oxydation induite par l'arsenic .....	66
5.3.2.	La liaison de l'arsenic.....	67
	Questions biologiques et problématique.....	70
	Résultats.....	72
	Résultats principaux.....	73



Arsenic ties PML B2-box trimer to switch Nuclear Body assembly dynamics and trigger anti-leukemia response (Article en préparation) .....	73
Résumé .....	74
L'arsenic lie le trimère de la boîte B2 de PML pour changer la dynamique de l'assemblage des corps nucléaires et déclencher une réponse anti-leucémique .....	74
<b>Abstract</b> .....	77
<b>INTRODUCTION</b> .....	78
<b>RESULTS</b> .....	79
<b>PML NBs switch from liquid-like to gel-like structures upon ATO</b> .....	79
<b>PML NB assembly depends on a reactive C213 cysteine in the B2-box domain rather than di-sulfide bridges</b> .....	81
<b>Crystal structure of PML B2 box unravels an <math>\alpha</math>-helix ensuring C213 accessibility</b> .....	82
<b>PML B2 <math>\alpha</math>-helix and C213 drive NB assembly dynamics</b> .....	83
<b>B2 <math>\alpha</math>-helix mediates hydrophobic PML trimerization key for PML NB dynamics</b> .....	84
<b>Arsenic docks on the C213 tri-cysteine pocket of PML trimers and drives gel-like transition</b> .....	85
<b>ATO suppresses clonogenicity of PML-RARA-transformed progenitors by targeting C213 triad</b> .....	87
<b>DISCUSSION</b> .....	88
<b>METHODS</b> .....	92
<b>Plasmid construction</b> .....	92
<b>Cell culture and cell treatments</b> .....	92
<b>Western blot</b> .....	94
<b>Immunolabelling and microscopy analysis</b> .....	94
<b>Time-lapse analysis of PML NB apparition in living MEF Pml KO right after stably expressing GFP-PML WT</b> .....	95
<b>Quantification of PML NB nucleation/fusion/fission events</b> .....	96
<b>Analysis of PML dynamics at NBs using Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)</b> ..	96
<b>Evaluation of the effective viscosity of PML NBs</b> .....	97
<b>Evolutionary conservation of PML B2</b> .....	98
<b>Quantification of PML NB numbers</b> .....	98
<b>Protein expression and purification</b> .....	98
<b>Crystallization and data collection</b> .....	99
<b>Structure determination and refinement</b> .....	99
<b>SEC-MALS analysis</b> .....	100
<b>LC-ICP MS Analysis</b> .....	100

Résultats supplémentaires .....	123
Bio-ingénierie des corps PML artificiels .....	123
INTRODUCTION .....	124
RESULTATS.....	127
MATERIEL ET METHODES .....	133
Drogues et molécules utilisées.....	133
Culture des lignées cellulaires .....	133
Transfection des cellules HeLa .....	133
Création des lignées de MEF exprimant de manière stable la protéine 5xFm-PML <sup>CS7-60A</sup> .....	134
Analyses par microscopie à fluorescence.....	134
Anticorps utilisés .....	134
Imagerie sur cellules vivantes .....	134
Immunomarquage et analyse de la distribution des CNP par microscopie confocale et de la structure des CNP par microscopie à déplétion par émission stimulée (STED) .....	135
Western blot.....	136
Discussion .....	137
L'assemblage dynamique des CNP est-il régulé par LLPS? .....	138
Assemblage de PML à la coque des CNP .....	138
Développement de nouveaux outils pour étudier le rôle du LLPS dans l'assemblage des CNP ...	142
Autres régulateurs de la dynamique d'assemblage des CNP .....	142
Recrutement des protéines partenaires .....	144
La fixation de l'arsenic au sein du trimère de la boîte B2 induit une transition des CNP vers une structure de type gel .....	145
Lien entre dynamique d'assemblage et fonction des CNP .....	148
Effets de l'oxydation sur PML.....	150
Régulation de l'assemblage des CNP par la boîte B2 et nouvelles stratégies thérapeutiques .....	152
Rôle de la boîte B2 dans la LAP .....	152
Rôle de la boîte B2 dans la régulation des voies de sénescence.....	154
Rôle de PML dans les maladies neurodégénératives .....	155
Conclusion .....	157
Bibliographie.....	161
Annexes .....	184

Annexe 1: Arsenic ties PML B2-box trimer to switch Nuclear Body assembly dynamics and trigger anti-leukemia response: Key resource table .....	185
Annexe 2 : Etude du rôle de la boîte B2 de PML in vivo .....	190
INTRODUCTION .....	191
RESULTATS.....	192
La mutation $Pml^{A220V}$ induit une désorganisation de la formation des CNP et perturbe les effets des oxydants et de l'arsenic sur leur formation.....	192
L'abolition de la formation des CNP en réponse à une mutation de la boîte B2 modifie la réponse à un stress oxydant chronique .....	195
MATERIEL ET METHODES .....	198
Drogues et molécules utilisées.....	198
Modèles animaux et traitements.....	198
Création de lignées murines transgéniques pour le gène <i>Pml</i> .....	198
Traitements d'induction de stress oxydant in vivo .....	199
Isolation et culture des MEF primaires .....	200
Préparation des coupes histologiques .....	200
Cryosections de foies.....	200
Coupes en paraffine .....	201
Etude Histologique des coupes de foie .....	201
Coloration hématoxyline – éosine – safran sur coupes de foie .....	201
Coloration au rouge picro-sirius sur coupes de foie .....	202
Immunomarquage et analyse de la distribution des CNP par microscopie confocale sur coupes de foies de souris.....	203
Western blot.....	204
Analyse des données .....	204
Quantification des zones fibrotiques sur une coupe de foie colorée au rouge picro-sirius .....	204
Comptage du nombre de foyers $\gamma$ H2AX .....	205
Annexe 3 : Article de recherche, Nature Communications, publié.....	206

# Liste des abréviations:

53BP1	53 binding protein 1	KAP1	KRAB-associated protein 1
ADN	Acide désoxyribonucléique	K <sub>D</sub>	Constante de dissociation
AFA	Alcool formolé acétique	Ki	Knock-in
ALT	Alternative lengthening of telomeres	KO	Knock-out
APAP	Acétaminophène	kRas	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
APB	ALT-associated PML bodies	LAP	Leucémie aiguë promyélocytaire
ARF	ADP-ribosylation factor	LCD	Low complexity domain
ARN	Acide ribonucléique	LSM	Laser scanning microscopy
Arti-PML	Corps nucléaires PML artificiels	MAM	Mitochondria-associated membranes
ASF1a	Anti-silencing function 1A histone chaperone	MDM2	Mouse double minute 2
ATO	Arsenic trioxyde	MEF	Mouse embryonic fibroblast
ATP	Adenosine triphosphate	mESC	Mouse embryonic stem cell
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related	MMA	Mono-méthyl arsenic
ATRX	ATRX chromatin remodeler	MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
B1	Box1	MPT	Modifications post-traductionnelles
B2	Box2	MSCV	Murine stem cell virus
BAK	Bcl-2 homologous antagonist killer	mTOR	Mammalian target of rapamycin
BAX	Bcl-2-associated X protein	NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
BCA	BiCinchoninic acid Assay	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
BLM	Blood syndrome protein	NCK	Non-catalytic region of tyrosine kinase
BRCA1	Breast cancer 1	NEAT1	Nuclear paraspeckles assembly transcript 1
Cas9	Caspase 1	NES	Nuclear export signal
CC	Coiled coil	NGS	Normal goat serum
CCl <sub>4</sub>	Carbon tetrachloride	NLS	Nuclear localization signal
CHK2	Checkpoint kinase 2	N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
CIRB	Centre interdisciplinaire de recherche en biologie	PBS	Phosphate-buffered saline
c-Jun	Transcription factor Jun	PCR	Polymerase chain reaction
CN	Corps nucléaire	PGC1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator 1 alpha
CNP	Corps nucléaire PML	PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein

CNRS	Centre national de la recherche scientifique	PML	Promyelocytic leukaemia
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	PP2A	Protéines phosphatase 2A
Csat	Concentration saturante	PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole	PRM	Proline-rich motif
DAXX	Death domain-associated protein	PSPC1	Paraspeckle protein 1
DISC	Death-Inducing Signaling Complex	Puro	Puromycine
DMA	Di-méthyl-arsenic	RAR	Retinoic acid receptor
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	RAR	Retinoic acid receptor
DNMT	DNA methyl-transferase	RBCC	Ring b-box coiled coil
DPPA2	Developmental Pluripotency Associated 2	ReAsH	Red fluorescent arsenic
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	RGA	Résidus Glycine-Arginine
FAB	French-American-British	RING	Really interesting new gene
FACS	Fluorescence activated cell sorting	RNF4	RING finger protein 4
FAO	Fatty acid oxydation	ROI	Region of interest
FBS	Fœtal bovine serum	ROS	Reactive oxygen species
FKBP	FK506 binding protein	RXR	Retinoic X receptor
FLASH	Flice-ASsociated Huge protein	SAHF	Senescence-associated heterochromatin foci
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching	SCF	Stem cell factor
FUS	Fused in sarcoma	SDS	Sodium dodecyl sulfate
GFP	Green fluorescent protein	SIM	SUMO interacting motif
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène	SIRT1	Sirtuin 1
HA	Hemagglutinine	SPAL	Structures associées aux lipides et contenant PML
HBSS	Hank's balanced salt solution	STED	Stimulated emission depletion microscopy
HES	Hematoxyline éosine safran	SUMO	Small ubiquitin-like modifier
HiFi	High fidelity	SV40	Simian virus 40
HIPK2	Homeodomain interacting protein kinase 2	TBS	Tris buffered saline
HIRA	Histone H3.3 chaperone	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
HIS	Histidine	TDP43	Transactive response DNA binding protein of 43
HRP	Horseradish peroxidase	TIF1	Transcriptional intermediary factor 1
HSV-1	herpes simplex virus de type 1)	TopBP1	Topoisomerase DNA binding II binding protein 1
HTLV1	Human T lymphocytic virus	TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

ICPO	Infected	TRAIL	TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
IDR	Intrinsically disordered region	TRIM	Tri-partite motif
IDT	Integrated DNA technologies	UBC9	Ubiquitine-conjugating enzyme 9
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale	UCP	Uncoupling protein
IRSL	Institut de recherche Saint Louis	VIH	Virus de l'immunodéficience humain
JAK	Just another kinase	YFP	Yellow fluorescent protein
JNK	Jun N-terminal kinase		

# Liste des figures:

Figure 1 : Représentation schématique de la diversité des corps nucléaires (tiré de Mao et al., 2011b)..	19
Figure 2 : Diagramme de phase présentant l'évolution des propriétés matérielles des condensats biomoléculaires (tiré de Shin and Brangwynne, 2017).	21
Figure 3 : Assemblage du nucléole par séparation de phase multiple (adapté de Feric et al., 2016)	23
Figure 4 : Représentation schématique des modèles de régulation des réactions biochimiques par des condensats biomoléculaires.....	24
Figure 5 : Corps nucléaires PML dans des cellules normales ou LAP et effet de l'arsenic (tiré de de Thé et al., 2012).	26
Figure 6 : Représentation schématique de la protéine PML (séquence humaine, isoforme I).....	27
Figure 7 : Représentation schématique du domaine RING de PML (séquence humaine).	29
Figure 8 : Représentation schématique du domaine B1 de PML (séquence humaine).	30
Figure 9 : Représentation schématique du domaine B2 de PML (séquence humaine).	31
Figure 10 : Représentation schématique du domaine coiled-coil de PML (séquence humaine).....	32
Figure 11 : Représentation schématique des différentes isoformes de PML produites à partir de la séquence génomique humaine (en blanc) (adapté de Nisole et al., 2013).	33
Figure 12 : Principales modifications post-traductionnelles de PML (séquence humaine).	35
Figure 13 : Assemblage des corps nucléaires PML.....	37
Figure 14 : Représentation schématique des différentes fonctions associées à PML	42
Figure 15 : Représentation schématique de l'hématopoïèse	52
Figure 16 : Représentation schématique des protéines PML, RARa et PML-RARa (chez un patient LAP) et désorganisation des CNP dans la LAP.....	54
Figure 17 : Colorations de May-Grunwald Giemsa de cellules de moelles osseuses saines et LAP de souris	55
Figure 18 : Effet thérapeutique de la combinaison d'ATRA et d'arsenic dans le traitement de la LAP.....	56
Figure 19 : L'arsenic induit la dégradation de l'oncoprotéine PML-RARa (adapté de Jeanne et al., 2010).	58
Figure 20 : Effet moléculaire de la combinaison ATRA / arsenic (ATO) dans la guérison de la LAP initiée par la dégradation de l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$ (adapté de de Thé et al., 2017).....	59
Figure 21 : Différentes formes naturelles d'arsenic.....	64
Figure 22 : Le Dr. Jun Zhu arrivant en France avec les premières ampoules de trioxyde d'arsenic en 1995	66
Figure 23 : Modèle de liaison de l'arsenic sur les protéines codées par le répresseur bactérien ArsR (adapté de Shen et al., 2013).	68
Figure 24 : La protéine 5xFm-PML <sup>C57-60A</sup> s'assemble pour former la coque des corps arti-PML, dont l'assemblage est contrôlable.....	132
Figure 25 : Formation des corps arti-PML dans une lignée de MEF Pml <sup>KO</sup> .....	132
Figure 26 : Caractéristiques matérielles des condensats biologiques (adapté de Wang et al., 2022).....	140
Figure 27 : Assemblage des trimères de TRIM $\alpha$ en maille hexamérique (adapté de Wagner et al., 2016)	141
Figure 28 : Schéma récapitulatif des résultats principaux	147
Figure 29 : Oxydation des résidus cystéines des protéines par des oxydants (adapté de Ezraty et al., 2017)	151

Figure 30 : Régulation de l'assemblage des CNP par la boîte B2 et son implication en physiopathologie	160
Figure 31 : Caractérisation des défauts d'assemblage et de SUMOylation du mutant Pml <sup>A220V</sup> dans les conditions basales et en réponse aux oxydants.....	195
Figure 32 : Etude de la réponse du mutant Pml <sup>A220V</sup> à un stress oxydant chronique .....	196

## Liste des tableaux:

Tableau 1: Liste des drogues utilisées dans cette étude.....	133
Tableau 2: Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences.....	134
Tableau 3: Liste des anticorps utilisés pour le Western blot .....	136
Table 4: List of the reagents used in this study .....	187
Table 5: List of the machines used in this study.....	187
Table 6: List of the primers used for site-directed mutagenesis.....	188
Table 7: Data collection and refinement statistics .....	189
Tableau 8: Liste des drogues utilisées dans cette étude.....	198
Tableau 9: Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences.....	203



# Introduction

# 1. Organisation du noyau

## 1.1. Généralités

Les cellules eucaryotes sont caractérisées par la présence d'un noyau contenant le matériel génétique sous la forme de chromosomes. Il est le lieu de réplication de l'ADN, de sa réparation, de la régulation de l'expression génique (notamment *via* les empreintes épigénétiques), de la fabrication des ARN et de l'assemblage des sous-unités ribosomales, deux éléments indispensables pour la synthèse protéique. Le noyau est entouré de deux membranes, la première dans la continuité du réticulum endoplasmique (RE) et la seconde faisant face à la chromatine. Ces deux membranes fusionnent au niveau des pores nucléaires qui régulent le transport de macromolécules entre le cytoplasme et le nucléoplasme.

L'une des problématiques fondamentales de la biologie est d'organiser l'espace cellulaire afin de permettre le contrôle spatial et temporel des réactions biochimiques. L'une des manières d'effectuer cette régulation spatiotemporelle consiste à réguler la localisation cellulaire des différentes biomolécules en créant des compartiments subcellulaires. Cette compartimentalisation des fonctions biologiques est ubiquitaire chez les organismes vivants et permet de faciliter ou d'inhiber les réactions en concentrant ou ségrégant les molécules. Dans le cytoplasme, cette compartimentalisation des fonctions est assurée par des organelles délimitées par des membranes lipidiques équipées de systèmes de transport spécialisés permettant de réguler leur composition interne. Il est possible de citer les mitochondries permettant la production d'énergie sous forme d'ATP, l'appareil de Golgi lieu de la maturation et du tri des protéines, les lysosomes ou les peroxysomes, deux organelles de détoxification, dépourvues de matériel génétique, ou encore l'endosome permettant notamment l'internalisation d'ADN viral. A l'inverse du cytoplasme, le noyau est dépourvu d'organelles délimitées par des membranes nécessitant des stratégies de compartimentalisation différentes.

Les organelles sans membranes ont été décrites pour la première fois dans le noyau de cellules neuronales dans les années 1830. Cette observation fait référence à ce qui sera plus tard

reconnu comme le nucléole (Wagner, Rudolph, 1835; Valentin G, 1836). Les organelles sans membranes nucléaires, également appelés corps nucléaires (CN), sont des structures micrométriques qui se forment dans le nucléoplasme, dans des régions pauvres en chromatine. Les CN répondent aux caractéristiques suivantes : 1) ils forment des structures visibles au microscope, *a minima*, durant certaines phases du cycle cellulaire, 2) ils concentrent des biomolécules nucléaires (protéines et/ou ARNs), 3) ils échangent constamment avec le nucléoplasme qui les entoure, ce qui les différencie des simples agrégats protéiques. Ces types de structures sont également retrouvés dans le cytoplasme (P-bodies, granules de stress...) où ils assurent des fonctions spécialisées, qui ne seront pas traitées dans le cadre de ce manuscrit.

## 1.2. Organisation et assemblage des organelles sans membranes

### 1.2.1. Une diversité de compartiments nucléaires

Une grande diversité d'organelles sans membranes sont retrouvées dans le noyau. Ces CN assurent la régulation de fonctions biologiques essentielles, souvent en lien avec la régulation de l'expression génique. Ces fonctions sont assurées de manière complémentaire, voire redondante entre les différents corps nucléaires, signe de leur importance. Parmi eux sont retrouvés : le nucléole, lieu de la transcription des ARN ribosomiaux et de l'assemblage des sous-unités ribosomiques (Stochaj and Weber, 2020), les corps de Cajal qui permettent l'assemblage et la modification de petites ribo-nucléoprotéines (Nizami et al., 2010) ou encore les nuclear speckles, paraspeckles et les corps associés aux locus d'histones impliqués dans la production et l'export des ARN messagers (ARNm) (Fox et al., 2018; Nizami et al., 2010; Spector and Lamond, 2011). Enfin, les corps nucléaires PML (ProMyelocytic Leukemia, CNP), au cœur de mon travail de thèse, font partie de ces organelles et régulent de nombreuses fonctions biologiques (Lallemand-Breitenbach and De Thé, 2010) (Figure 1).

Les corps nucléaires ont une composition variée et complexe en protéines et la majorité d'entre eux sont associés à des acides nucléiques. Le nombre de protéines retrouvées dans ces

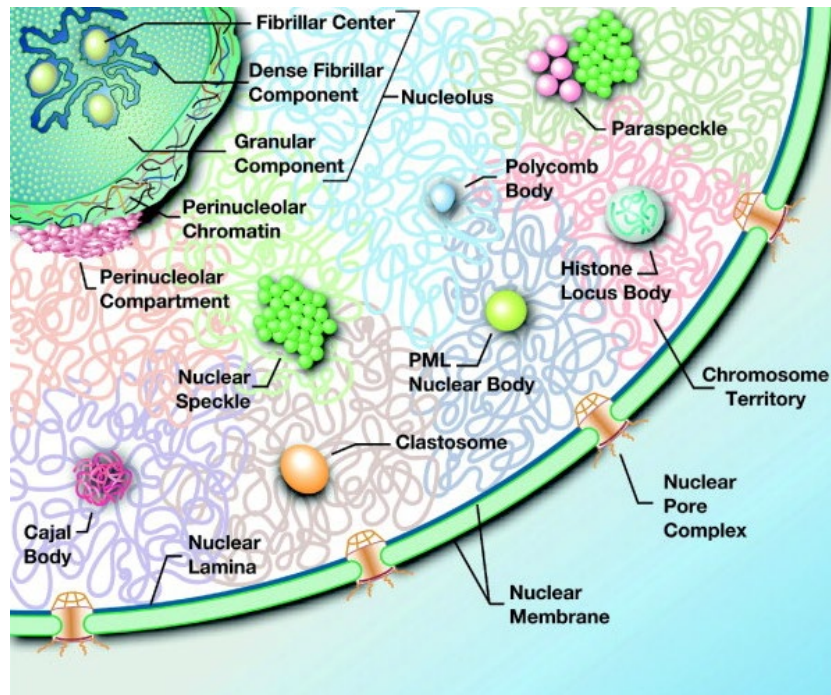


Figure 1 : Représentation schématisique de la diversité des corps nucléaires (tiré de Mao et al., 2011b).

Le noyau est entouré par l'enveloppe nucléaire, une double membrane qui permet de séparer physiquement le nucléoplasme du cytoplasme. Le transport de matériel entre le cytoplasme et le nucléoplasme est assuré par les pores nucléaires. A l'interphase, le matériel génétique organisé au sein des chromosomes est retrouvé dans des territoires chromosomiques distincts. La compartimentalisation des fonctions du noyau est assurée par des organelles sans membranes possédant des fonctions spécialisées : les corps nucléaires.

structures est très variable. En effet, une quarantaine de protéines ont été identifiées aux paraspeckles (Naganuma et al., 2012) et des études de protéomique ont identifié plus de 4500 protéines au nucléole (Ahmad et al., 2009). Certaines protéines sont retrouvées dans plusieurs corps nucléaires comme par exemple la coiline qui est retrouvée aux corps associés aux locus d'histones et aux corps de Cajal (Frey and Matera, 1995) ou la protéine des paraspeckles PSPC1 (paraspeckles protein 1) initialement identifiée par spectrométrie de masse dans le nucléole (Fox et al., 2002). Les protéines composant les CN peuvent avoir des rôles opposés dans l'assemblage, comme c'est le cas dans les nuclear speckles dont certaines protéines favorisent la formation du corps alors que d'autres la déstabilisent (Dopie et al., 2020; Ilik et al., 2020; Rivera et al., 2021; Tripathi et al., 2012).

L'association des protéines aux CN est dynamique et une multitude d'études de FRAP (retour de fluorescence après photoblanchiment) ont démontré que de nombreuses protéines

retrouvées aux CN s'échangent rapidement avec le nucléoplasme, permettant une régulation dynamique de leur composition (Mao et al., 2011b). Ces structures peuvent être sensibles au stress qui peut induire leur assemblage et modifier leur composition.

Les corps nucléaires ont une organisation tridimensionnelle interne. Il a été proposé que cette dernière régule les fonctions qui leur sont associées. L'exemple le plus saisissant est le nucléole où la synthèse des ribosomes résulte d'un mécanisme vectoriel. En effet, le nucléole est constitué de trois compartiments : un centre fibrillaire, une composante fibrillaire dense et une composante granulaire. Il est entouré de chromatine péri-nucléolaire composée de régions chromosomiques inactives (Németh et al., 2010). Les gènes codant pour des protéines ribosomiques sont concentrés au centre fibrillaire (Correll et al., 2019). La transcription des ARNr est initiée par l'ARN polymérase I, à la jonction entre le centre fibrillaire et la composante fibrillaire dense. La maturation des ARNr, impliquant leurs modifications post-transcriptionnelles et leur clivage sur des sites spécifiques, est réalisée par plus d'une centaine de protéines durant leur transit depuis la frontière entre le centre fibrillaire et la composante fibrillaire dense vers la composante granulaire. Enfin la synthèse des sous-unités ribosomales à partir des ARNr est réalisée dans la composante granulaire (Hernandez-Verdun and Louvet, 2004).

Du fait de la complexité des CN, les mécanismes qui maintiennent et régulent leur structure, contrôlent leur composition et modulent leur(s) activité(s) biochimique(s) en l'absence d'une barrière physique les isolant du nucléoplasme, restent flous.

## *1.2.2. La séparation de phase liquide-liquide*

### *1.2.2.1. Principes de la séparation de phase liquide-liquide*

La séparation de phase liquide-liquide (LLPS) décrit le processus passif par lequel une solution, contenant un solvant et un soluté, évolue vers un système non-homogène qui contient au moins deux phases liquides distinctes (une phase dense en soluté et une phase pauvre en soluté) par « démixtion ». Dans ce système, les molécules seront miscibles jusqu'à ce qu'elles atteignent une concentration saturante « [Csat] ». A ce stade, les interactions soluté-soluté

seront suffisamment fortes pour permettre leur agrégation et la formation de deux phases liquides distinctes (ex : l'huile dans l'eau). A l'équilibre, le LLPS permet de maintenir des concentrations en soluté différentes dans deux compartiments distincts, dont la composition est dynamique et sans apport d'énergie. Le LLPS propose donc une hypothèse de travail intéressante dans la compréhension des mécanismes d'assemblage de structures qui ne sont pas délimitées par des barrières physiques comme les organelles sans membranes.

Dans un système biologique, le soluté renvoie à une protéine ou à un acide nucléique et le solvant au cytoplasme ou au nucléoplasme. A l'équilibre, les macromolécules peuvent s'assembler en condensats biomoléculaires par l'établissement d'interactions multiples et réversibles de faible intensité aboutissant à l'agrégation des différents composants. Ces interactions peuvent s'établir à partir de domaines modulaires (Banani et al., 2016; Li et al., 2012) et de domaines intrinsèquement désordonnés (IDR) ou de faible complexité (LCD) (Lin et al., 2017; Uversky, 2017). En fonction de la force de l'interaction entre les différentes macromolécules du condensat ainsi que de leur concentration, des condensats avec diverses propriétés matérielles peuvent être assemblés (Figure 2). Ainsi le LLPS permet de former des structures de type liquide (haute fluidité, interactions réversibles) jusqu'à des structures solides ou des fibres (aucune fluidité, irréversible).

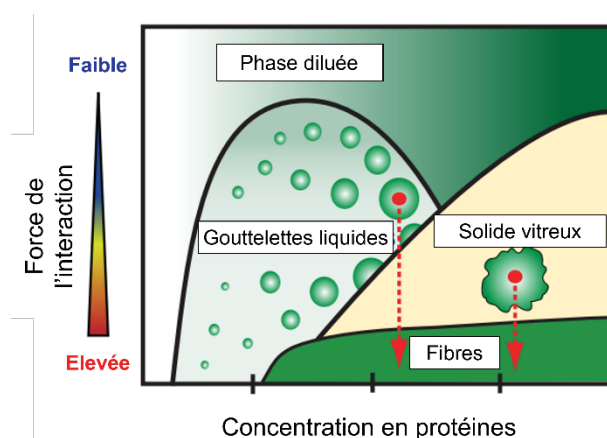


Figure 2 : Diagramme de phase présentant l'évolution des propriétés matérielles des condensats biomoléculaires (tiré de Shin and Brangwynne, 2017).

La force de l'interaction entre les macromolécules et leur concentration peuvent modifier les propriétés matérielles des condensats biomoléculaires qu'ils forment.

De nombreux travaux réalisés par un grand nombre d'équipes se sont intéressés au rôle du LLPS dans l'assemblage des organelles sans membranes et ont posé les bases de ce qui caractérise une structure s'assemblant par LLPS dans un système biologique (revu dans Banani et al., 2017), à savoir :

- 1) Une sphéricité de la structure résultant de la minimisation de la tension de surface,
- 2) Une capacité à fusionner/fissionner,
- 3) Un assemblage dépendant de la concentration des différents composants,
- 4) Une grande mobilité des composants au sein de la structure et un échange permanent avec le milieu environnant.

#### 1.2.2.2. LLPS et corps nucléaires

Depuis l'émergence de cet axe de recherche, tous les CN ont été en partie revisités avec le spectre de la séparation de phase liquide-liquide. Le nucléole est le CN qui a été le plus étudié sous cet angle.

Le nucléole a une structure sphérique, a la capacité de fusionner avec un nucléole voisin (Brangwynne et al., 2011), présente un assemblage dépendant de la concentration en protéines (Berry et al., 2015; Weber and Brangwynne, 2015) et les protéines qui le composent sont dynamiquement échangées entre le corps nucléaire et le nucléoplasme (Feric et al., 2016; L. Zhu et al., 2019).

Des études approfondies ont été menées sur des protéines particulièrement abondantes au nucléole : la nucléophosmine principalement retrouvée dans la composante granulaire et la fibrillarine retrouvée dans le centre fibrillaire et la composante fibrillaire dense. Ces deux protéines ont la capacité de s'assembler en gouttelettes liquides par LLPS *in vitro* et *in cellulo* à partir d'une multiplicité d'interactions de faible énergie entre leurs domaines non structurés (Feric et al., 2016; Mitrea et al., 2016; Weber and Brangwynne, 2015). Lorsque la nucléophosmine et la fibrillarine sont mises en présence *in vitro* ou *in cellulo*, les deux protéines s'assemblent en condensats biomoléculaires mutuellement exclusifs selon un processus de séparation de phase multiple (Figure 3). Ce processus aboutit à la formation de condensats de nucléophosmine contenant des condensats de fibrillarine, évocateurs de la distribution de ces protéines dans le nucléole (Feric et al., 2016). L'ARN est également impliqué dans la formation du nucléole par LLPS et favorise la séparation de phase *in vitro* et *in cellulo* (Berry et al., 2015; Falahati et al., 2016; Yao et al., 2019). Considérés dans leur ensemble, ces résultats suggèrent un assemblage du nucléole par LLPS.

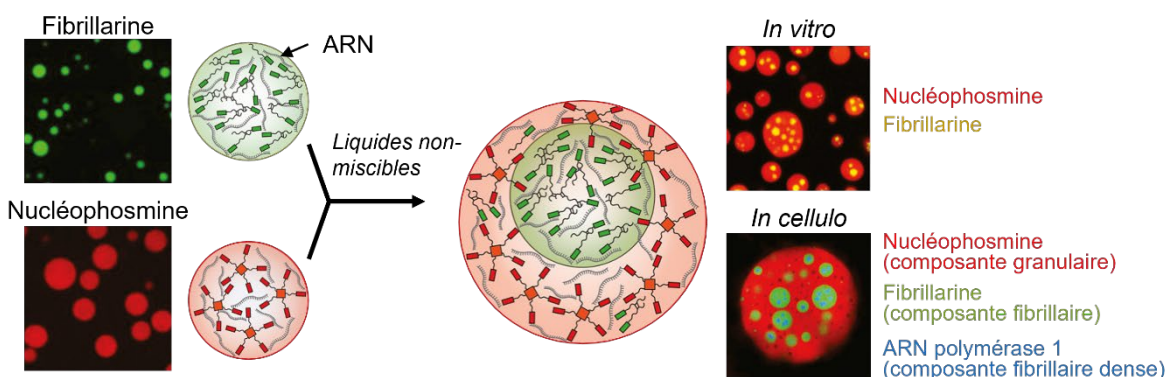


Figure 3 : Assemblage du nucléole par séparation de phase multiple (adapté de Feric et al., 2016)

La fibrillarine et la nucléophosmine se comportent comme deux liquides non miscibles. Une fois mélangés *in vitro* ou *in cellulo*, ces deux protéines forment des compartiments mutuellement exclusifs du fait de leur immiscibilité.

Le lien entre l'assemblage de condensats biomoléculaires par LLPS et la fonction qui leur est associée reste à démontrer (Lu et al., 2021; Lyon et al., 2021). Des études récentes réalisées avec des systèmes artificiels *in vitro* et *in cellulo* suggèrent un lien entre la régulation de leur composition, la dynamique d'assemblage des protéines et leur fonction (Frottin et al., 2019; Simon et al., 2019; L. Zhu et al., 2019). Il a été proposé que les condensats biomoléculaires



puissent réguler les réactions biochimiques de plusieurs façons (Figure 4): 1) en augmentant la cinétique de réaction en concentrant des enzymes et des substrats spécifiques à l'intérieur du condensat, 2) en inhibant l'activité biochimique de certaines molécules en séquestrant une enzyme ou son substrat, 3) en séquestrant certains régulateurs négatifs au condensat (Lyon et al., 2021). En retour, les réactions biochimiques réalisées au sein des condensats biomoléculaires pourraient réguler le LLPS.

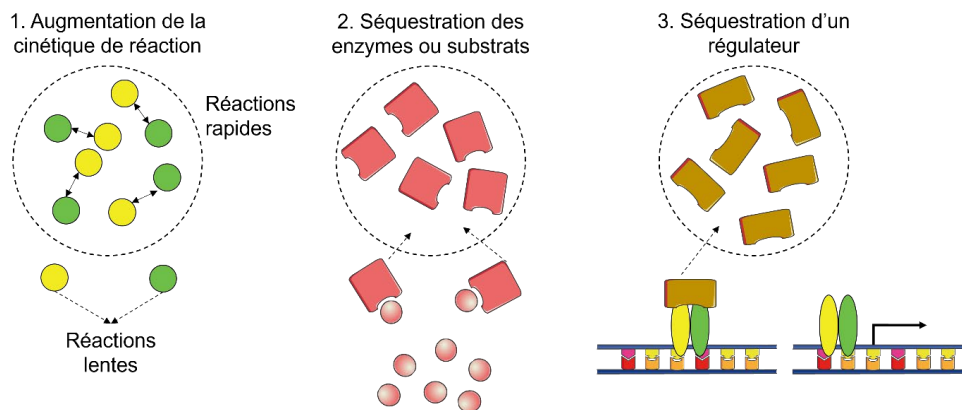


Figure 4 : Représentation schématique des modèles de régulation des réactions biochimiques par des condensats biomoléculaires

### 1.2.2.3. Limites du LLPS

Bien que le LLPS constitue un modèle élégant pour expliquer l'assemblage des corps nucléaires, certains CN ne s'assemblent pas selon ce mécanisme. C'est par exemple le cas pour les paraspeckles.

Les paraspeckles sont des corps nucléaires core-shell (cœur-coque) localisés à l'interchromatine ayant une forme de cylindre arrondi aux extrémités, s'opposant à leur formation par un mécanisme de LLPS classique (Souquere et al., 2010; West et al., 2016). Ils sont composés d'ARN et d'une quarantaine de protéines possédant toutes des domaines permettant de lier l'ARN (Naganuma et al., 2012). Les paraspeckles s'assemblent aux sites de transcription d'un long ARN non codant de 27kb nommé NEAT1, qui fait office de protéine d'échafaudage (nuclear enriched abundant transcript 1) (Mao et al., 2011a). De manière intéressante, la transcription de NEAT1 doit être active pour permettre la formation des paraspeckles et l'augmentation de sa

quantité induit une élongation des paraspeckles, contredisant la théorie du LLPS qui prévoit la formation de structures sphériques (Barra et al., 2020).

Le modèle d'assemblage par LLPS, ne permet pas d'expliquer de façon universelle la formation des CN. De nouveaux modèles d'assemblage des CN ont été proposés ces dernières années. Cela montre la complexité de ce type d'études et reflète la diversité d'assemblage et de fonction des CN dans le noyau. Dans la suite du travail de thèse restitué dans ce mémoire, il convient donc de considérer la participation du LLPS à la formation des CNP tout en envisageant des modèles d'assemblage alternatifs.

## 2. Les corps nucléaires PML

La protéine PML (ProMyelocytic Leukemia) forme le squelette organisateur d'organelles sans membranes nucléaires sensibles au stress: les corps nucléaires PML (CNP) (Hsu and Kao, 2018; Lallemand-Breitenbach and De Thé, 2010) (Figure 5). Les CNP sont des structures multiprotéiques à la structure « core-shell » et dont la biogenèse est séquentielle, impliquant un assemblage dynamique de PML pour former la coque des CNP, suivi de la modification post-traductionnelle de PML par SUMOylation [conjugaison à des groupements SUMO (small ubiquitin-like modifier)] (Sahin et al., 2014). Une fois modifiée, en particulier sur son résidu K160, la coque de PML recrute une grande variété de protéines partenaires aux cœurs des CNP, où elles seront elles-mêmes SUMOylées (Sahin et al., 2014; Tessier et al., 2022). Ainsi, les CNP pourraient moduler l'activité des protéines qui y sont recrutées. PML est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques comme la transcription, l'apoptose, la sénescence ou le métabolisme cellulaire, mais le rôle des CNP en tant que tels reste à démontrer.

Les CNP ont été découverts dans une forme rare de leucémie nommée leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). Dans cette pathologie, *PML* est associé au récepteur de l'acide rétinoïque *RAR $\alpha$*  à la suite d'une translocation chromosomique qui conduit à l'expression d'une oncoprotéine de fusion *PML-RAR $\alpha$*  qui désorganise les CNP. La combinaison d'acide rétinoïque et

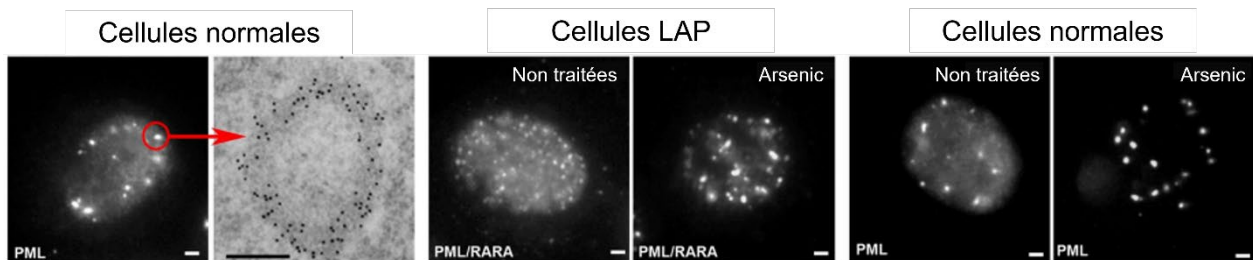


Figure 5 : Corps nucléaires PML dans des cellules normales ou LAP et effet de l'arsenic (tiré de de Thé et al., 2012).

Analyse par microscopie confocale de la distribution de PML dans le noyau. Dans les cellules normales (gauche), PML est distribué dans le noyau sous forme nucléoplasmique diffuse et sous forme assemblée aux CNP. La flèche rouge indique un CNP analysé par microscopie électronique. Barre d'échelle : 1 $\mu$ m. L'analyse par microscopie électronique du marquage réalisé avec des anticorps anti-PML couplés à des billes d'or révèle que PML forme la coque du CNP. Barre d'échelle : 0,5 $\mu$ m. Dans les cellules LAP, l'expression de la protéine *PML-RAR $\alpha$*  induit la désorganisation des CNP (centre). Le traitement avec du trioxyde d'arsenic induit l'assemblage de PML et de *PML-RAR $\alpha$*  en CNP dans les cellules normales et LAP associée à une diminution de la fraction nucléoplasmique (centre et droite). Analyses réalisées dans des cellules CHO exprimant de manière stable PML ou *PML-RAR $\alpha$*  et traitées avec 1 $\mu$ M de trioxyde d'arsenic durant une heure.

de trioxyde d'arsenic (ATO) guérit les malades, sans chimiothérapie additionnelle (de Thé et al., 2017). De façon déterminante, l'arsenic peut se lier directement à PML, induire le réassemblage des CNP et l'activation d'un programme de sénescence, bloquant l'auto-renouvellement des cellules leucémiques et conduisant à la guérison des patients. PML a ensuite été impliquée dans la réponse anti-virale (Maul et al., 1993) et plus récemment le traitement de maladies neurodégénératives (Guo et al., 2014). Les CNP sont également altérés dans d'autres formes de cancers (Hsu and Kao, 2018).

La compréhension des mécanismes de formation des CNP présente donc un intérêt dans la compréhension d'un mécanisme de biologie fondamentale et dans le développement de thérapies les ciblant.

## 2.1. Structure et domaines de la protéine PML

### 2.1.1. Généralités sur les TRIM

PML appartient à la famille des TRIM (tripartite motif). Cette famille regroupe des protéines comportant des motifs tripartites ayant la capacité de former des homo-multimères (Reymond, 2001). Ces protéines partagent une structure appelée RBCC (RING, B-box de type 1 ou 2 et domaine coiled-coil), suivie d'un domaine C-terminal variable (Figure 6). Les différences principales proviennent du nombre de boîte B et de la nature du domaine C-terminal. Au cours de l'évolution, les TRIM sont retrouvées à partir du taxon des métazoaires, bien que des boîtes B (B-box) soient retrouvées chez les plantes et les eucaryotes unicellulaires.

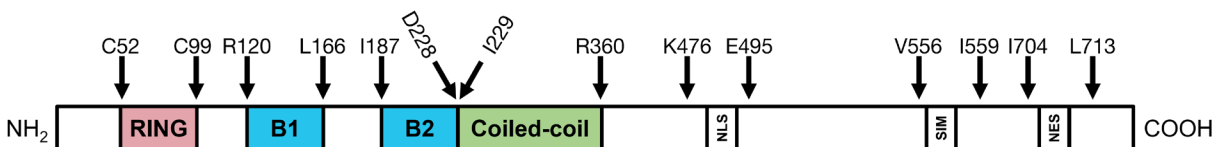


Figure 6 : Représentation schématique de la protéine PML (séquence humaine, isoforme I).

Plus de 70 TRIM ont été identifiées chez l'Homme. Elles sont exprimées de manière constitutive et ubiquitaire et de nombreuses TRIM possèdent une fonction d'ubiquitine E3 ligase,

catalysant le transfert de la petite protéine ubiquitine depuis l'enzyme E2 vers la protéine ciblée, à laquelle l'ubiquitine sera liée covalamment sur une lysine (Meroni and Desagher, 2022). Cette famille de protéines est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comprenant la progression du cycle cellulaire, la différenciation, le développement, l'oncogenèse et l'apoptose.

### 2.1.2. Le domaine RING finger

Le domaine RING (Really Interesting New Gene) finger de la protéine PML est un domaine de type doigt de zinc et avec une séquence canonique :

C-X(2)-C-X(9-39)-C-X(1-3)-H-X(2-3)-C-X(2)-C-X(4-48)-C-X(2)-C (où X est un acide aminé).

Les cystéines et histidines coordonnatrices maintiennent la structure tridimensionnelle en liant deux atomes de zinc, ce qui induit un repliement globulaire.

Contrairement au RING des autres TRIM qui s'associent en dimères pour interagir avec des E2 ubiquitines ligases, celui de PML s'associe en tétramère et lie l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO, UBC9 (Duprez et al., 1999; Wang et al., 2018). Plus précisément, le RING de PML (Figure 7) est structuré autour du zinc, coordonné par des acides aminés conservés au cours de l'évolution (en gras et en noir). L'équipe a montré que le RING multimérisé *via* des interactions hydrophobes entre les résidus du sous-domaine SD1 et certains présents à la surface du domaine doigt de zinc SD2 (notés en gras et en vert) (Wang et al., 2018). Le SD1 est très conservé au cours de l'évolution (un orthologue est retrouvé chez la tortue), mais il est également spécifique de PML puisqu'il n'est présent dans aucun RING des autres TRIM (Wang et al., 2018). Aussi, la tétramérisation du RING finger est une spécificité de PML parmi les TRIM. Des tests en double hybride dans un système de mammifère ont démontré que cette tétramérisation favorise l'interaction d'UBC9 sur le RING de PML. Une enzyme fixée sur un des monomères du tétramère permettrait une modification en *trans* des autres monomères de PML. Cette observation est à mettre en regard du rôle des CNP dans le contrôle de la SUMOylation, quand les RING des autres TRIM jouent un rôle dans l'activité E3 ligase contrôlant l'ubiquitination. Il a été proposé que l'arsenic se fixe à PML au niveau du RING en venant remplacer l'un des atomes de zinc (Zhang et al., 2010).

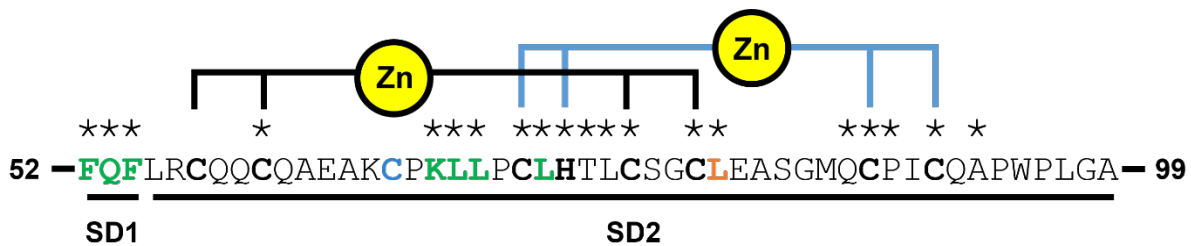
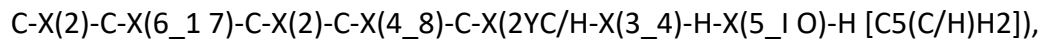


Figure 7 : Représentation schématique du domaine RING de PML (séquence humaine).

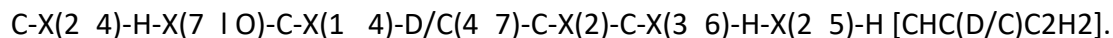
Les astérisques représentent la conservation de ce domaine au cours de l'évolution. Les acides aminés en gras et en noir sont impliqués dans la coordination du zinc. Les acides aminés en gras et en vert sont impliqués dans la multimérisation du domaine. Les abréviations SD1 et SD2 (subdomain 1 et 2) correspondent aux deux différents sous-domaines du domaine RING monomérique.

### 2.1.3. Les domaines boîtes B (B-box)

Les boîtes B sont des domaines à doigts de zinc organisés de façon croisée, identifiées au début des années 1990 pour les protéines PML et TIF1 (Reddy et al., 1992; Reddy and Etkin, 1991). Les boîtes B1 ont comme séquence canonique :



Alors que les boîtes B2 ont une séquence canonique de type :



Les TRIM portent toutes une boîte B2, mais seulement un quart des TRIM humaines présentent des B-box en tandem avec une boîte B1 en N-terminal (Short and Cox, 2006). Les fonctions des B-box sont encore floues, mais elles pourraient être impliquées dans la régulation de l'interaction protéine-protéine et dans la régulation de l'ubiquitination des protéines (Massiah, 2019; Reymond, 2001).

Les analyses par résonance magnétique nucléaire et cristallographie ont démontré que la boîte B1 de PML a la capacité de former des homo-oligomères *in vitro* avec une préférence pour les formes dimériques et tétramériques (Li et al., 2019). Les interfaces entre les différents monomères sont composées d'acides aminés spécifiques à PML et non conservés dans les autres protéines TRIM. De manière intéressante, tout comme pour l'association tétramérique du RING,

la multimérisation de la boîte B1 repose sur des interactions hydrophobes. Lors de cette association, les résidus K160 se retrouvent concentrés et exposés à l'extérieur de la structure, ce qui est corrélé à la formation de longues chaînes de poly-SUMO préférentiellement sur ce résidu (S.-Y. Huang et al., 2014; Li et al., 2019) (Figure 8).

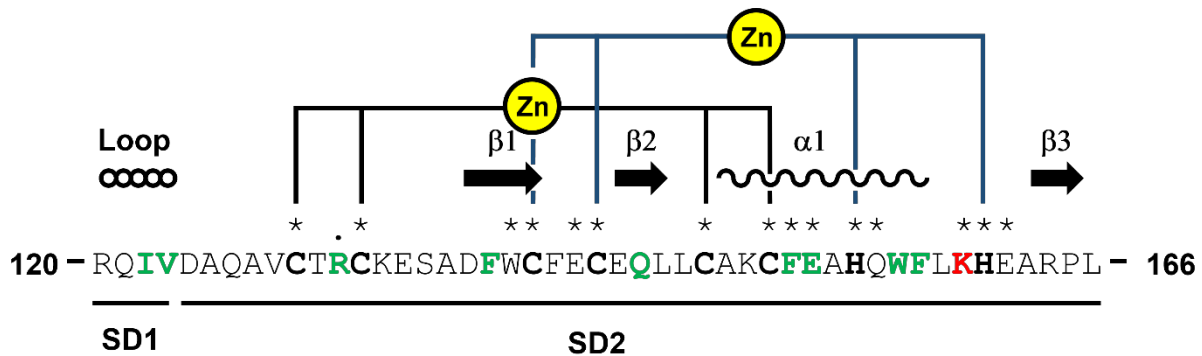


Figure 8 : Représentation schématique du domaine B1 de PML (séquence humaine).

Les astérisques représentent la conservation de ce domaine au cours de l'évolution. Les acides aminés en gras et en noir sont impliqués dans la coordination du zinc. Les acides aminés en gras et en vert sont impliqués dans la multimérisation du domaine. Les abréviations SD1 et SD2 (subdomain 1 et 2) correspondent aux deux différents sous-domaines du domaine B1 monomérique. Les abréviations loop, β1, 2, 3 et α1 renvoient respectivement à une structure secondaire en forme de boucle, feuillet β ou hélice α. La lysine K160 est indiquée en gras et en rouge.

Malgré de multiples tentatives par plusieurs groupes, la boîte B2 de PML n'a jamais pu être cristallisée. Il est prédit qu'elle respecte l'organisation de toute boîte B avec deux doigts de zinc, repliés en un croisillon et coordonnés chacun par trois cystéines et une histidine (Figure 9). Le domaine B2 semble impliqué dans la formation des CNP car une mutation de la cystéine en position 212 vers une alanine induit une désorganisation des corps nucléaires (Jeanne et al., 2010). L'équipe a proposé que le doublé de cystéines C212 et C213 soit impliqué dans la liaison directe de l'arsenic à la protéine (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2010). De plus, le domaine B2 est retrouvé muté chez des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire et résistants aux thérapies à l'ATO et à l'acide rétinoïque, confortant l'idée que ce domaine pourrait constituer le site de liaison de l'arsenic (de Thé et al., 2017). Cependant, aucune étude n'a encore étudié de manière approfondie le rôle de ce domaine dans la formation des CNP ou dans le mécanisme par lequel l'ATO favoriserait leur assemblage. Aussi, le domaine B2 constitue donc le candidat idéal

pour étudier plus en profondeur la formation des CNP et la réponse à différents stress, en particulier l'ATO.

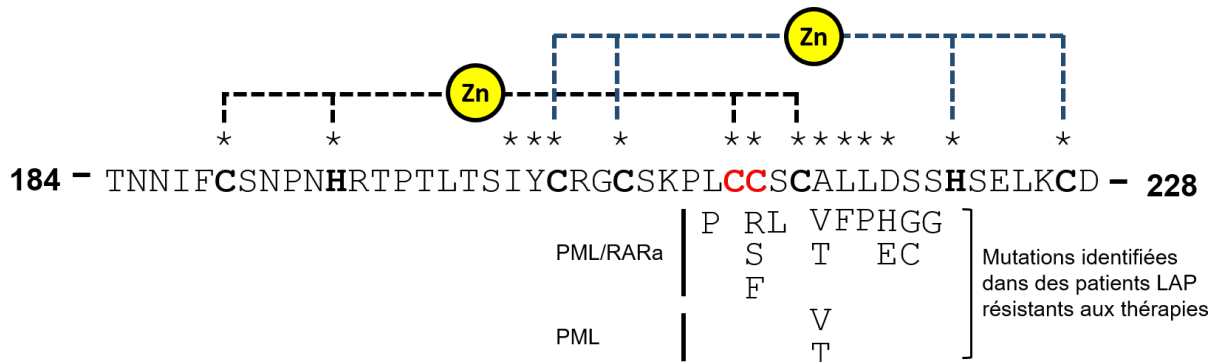


Figure 9 : Représentation schématique du domaine B2 de PML (séquence humaine).

Les astérisques représentent la conservation de ce domaine au cours de l'évolution. Les acides aminés en gras et en noir ont été prédits comme étant impliqués dans la coordination du zinc. Les acides aminés en gras et en rouge sont impliqués dans la liaison de l'arsenic.

#### 2.1.4. Le domaine coiled-coil

Les domaines coiled-coil sont formés lorsqu'au moins deux hélices  $\alpha$  s'assemblent en s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une superhélice gauche. La majorité des coiled-coil possèdent une séquence répétée en heptade de type (abcdefg)<sub>n</sub> (Grigoryan and Keating, 2008). D'un point de vue structural, chaque heptade constitue deux tours d'hélice  $\alpha$  avec un résidu hydrophobe tous les sept acides aminés, leur permettant d'être situés sur la même face de l'hélice, créant la force motrice de l'assemblage de ce domaine.

Le domaine coiled-coil de PML n'a jamais été cristallisé mais la séquence primaire suggère qu'il comporte quatre hélices, dont l'hélice 1 qui est remarquablement longue. Si l'espacement de acides aminés hydrophobes est globalement conservé, la séquence du domaine coiled-coil de PML n'est pas conservée au cours de l'évolution (Figure 10). Il est essentiel pour l'homomultimérisation de PML et pour son association avec le récepteur à l'acide rétinoïque alpha dans la leucémie aiguë promyélocytaire (Fagioli et al., 1998; Grignani et al., 1999; Huang et al., 2008; Occhionorelli et al., 2011). Une équipe a montré que ce domaine purifié a la capacité de multimériser en solution, avec une préférence pour les formes tétramériques (Antolini et al., 2003).





Figure 10 : Représentation schématique du domaine coiled-coil de PML (séquence humaine).

Les astérisques représentent la conservation de ce domaine au cours de l'évolution. Les abréviations α1, 2, 3, 4 renvoient respectivement à une structure secondaire en forme d'hélice α. (\*) indique une position conservée, (:) indique une mutation conservative, (.) indique une mutation semi-conservative.

### 2.1.5. Les séquences C-terminales

La séquence C-terminale de PML est extrêmement variable et peut présenter des homologies de séquence avec des protéines d'autres familles. Le gène *PML* (séquence humaine) contient neuf exons dont l'épissage alternatif conduit à l'expression de sept isoformes principales de la protéine, variant au niveau de la partie C-terminale qui est positionnée à distance du RBCC (Bernardi and Pandolfi, 2007; Condemine et al., 2006; Jensen et al., 2001; Nisole et al., 2013) (Figure 11). Certains variants correspondent à des isoformes ne possédant pas la région codée par l'exon 5 (acides aminés 419-466), nommés « a », « b » renvoie à des isoformes sans les régions codées par les exons 5 et 6 (acides aminés 419-552) et « c » désigne des isoformes sans les régions codées par les exons 4, 5 et 6 (acides aminés 395-552) (Nisole et al., 2013). L'isoforme I est la seule à posséder tous les exons, dont le domaine NES, lui conférant la capacité d'échanger entre le cytoplasme et le nucléoplasme (Condemine et al., 2007). Les isoformes VI et VII ne contiennent pas de domaine SUMO Interacting Motif (SIM), abrogeant leur interaction avec les partenaires SUMOylés. Enfin, l'isoforme VII ne possède pas le domaine NLS (nuclear localization signal), rendant sa localisation exclusivement cytoplasmique. Chez la souris, seules les isoformes PMLI et

PMLIV ont pu être identifiées, indiquant que cette variété des isoformes est apparue tardivement dans l'évolution.

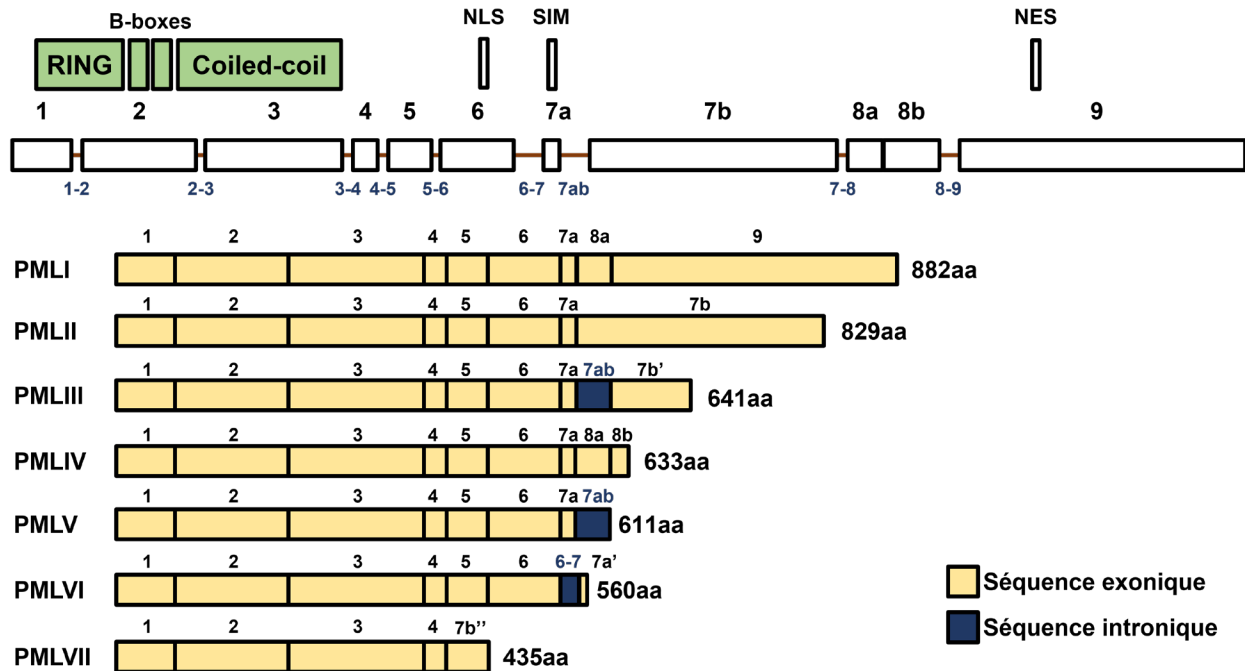


Figure 11 : Représentation schématique des différentes isoformes de PML produites à partir de la séquence génomique humaine (en blanc) (adapté de Nisole et al., 2013).

NLS : nuclear localisation signal, SIM : SUMO interacting motif, NES : nuclear export signal

Toutes les isoformes nucléaires de PML s'assemblent au sein des mêmes CNP par leur domaine RBCC. Bien que les différentes études menées sur l'assemblage des isoformes en corps nucléaires n'obtiennent pas toutes les mêmes conclusions, chaque isoforme pourrait réguler de manière différente l'assemblage de la protéine en CNP et/ou leur dynamique d'assemblage (Brand et al., 2010; Condemine et al., 2006; Cuchet et al., 2011; Hands et al., 2014; Weidtkamp-Peters et al., 2008). La régulation fine de l'assemblage des CNP et la multiplicité des fonctions associées à PML pourrait être, en partie, le reflet de fonctions spécialisées des différents domaines C-terminaux des isoformes de PML. Il a notamment été démontré que l'isoforme IV de PML a une activité pro-sénescence en se liant spécifiquement à ARF au niveau de son domaine C-

terminal (Ivanschitz et al., 2015). L'interaction entre PML IV et ARF stabilise UBC9 (l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO) aux corps nucléaires, induisant la SUMOylation de p53 résultant en son activation.

## 2.2. Assemblage de PML en corps nucléaires

Dans le noyau, PML est retrouvée sous deux formes : une forme nucléoplasmique et une forme assemblée en CNP, toutes deux exclues des domaines d'hétérochromatine. L'aspect core-shell suggère des mécanismes de biogenèse complexes qui n'ont jusqu'ici pas été élucidés. Un noyau contient 10 à 30 CNP. Les analyses par microscopie électronique ou à super-résolution (STED) ont démontré que ces sphères sont creuses et ont un diamètre variant entre 0,1 et 1µm (Dellaire and Bazett-Jones, 2004; Lallemand-Breitenbach and De Thé, 2010; Maul et al., 1995; Sahin et al., 2014). Toutes les sous-unités du domaine RBCC décrites ci-dessus sont essentielles pour la formation des CNP, contrairement à d'autres TRIM (Jeanne et al., 2010; Jensen et al., 2001; Li et al., 2019; Wang et al., 2018).

### 2.2.1. PML et stress oxydant

PML contient plusieurs cystéines libres, dont le groupement soufre est susceptible à être modifié par l'oxydation. En particulier, l'équipe a montré que PML peut former des homomultimères covalamment reliés par des ponts disulfures en plus des interactions de faible intensité s'établissant par le RBCC (Jeanne et al., 2010; Niwa-Kawakita et al., 2017; Sahin et al., 2014). L'action des antioxydants comme le N-acétyl-cystéine abolit la formation des CNP (Jeanne et al., 2010) et les agents alkylants induisent leur désorganisation (Conlan et al., 2004). Les résidus impliqués dans ce processus restent à identifier mais il ne fait aucun doute que les cystéines de PML sont nécessaires à l'assemblage des CNP.

*In vivo*, l'ATO – qui se fixe sur PML mais induit aussi la production de ROS - ou des oxydants comme l'acétaminophène, le paraquat et des poisons mitochondriaux induisent la formation des CNP (Jeanne et al., 2010; Sahin et al., 2014). Dans la leucémie aiguë promyélocytaire, les oxydants

induisent comme l'ATO la formation d'homo-multimères reliés par des ponts disulfures de la protéine oncogénique PML-RAR $\alpha$ , suivie de sa dégradation et permettent d'induire la mort des cellules leucémiques (Freitas et al., 2009; Jeanne et al., 2010).

Il a été proposé que ces ponts disulfures constituent la première étape de la formation des CNP en permettant l'assemblage de PML dans le nucléoplasme et soient responsables de la formation des CNP en réponse aux oxydants *in vivo*.

### 2.2.2. Modifications post-traductionnelles de PML

La protéine PML est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT), tout particulièrement la SUMOylation/ubiquitination, mais aussi la phosphorylation et l'acétylation. La plupart des modifications de PML sont réalisées par des enzymes spécifiques, conduisant en des combinaisons de MPT complexes qui peuvent être régulés par une signalisation spécifique ou selon le type cellulaire. De nombreux sites de modifications post-traductionnelles ont été identifiés sur PML (Figure 12), suggérant des mécanismes de régulation fins.

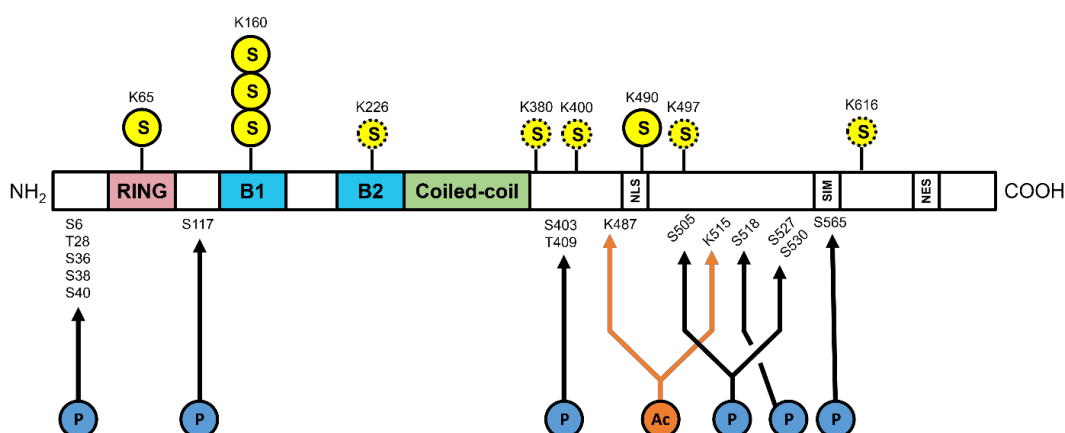


Figure 12 : Principales modifications post-traductionnelles de PML (séquence humaine).

Sur le schéma, (S) correspond à la SUMOylation, (P) à la phosphorylation, et (Ac) à l'acétylation. Les trois sites principaux de SUMOylation sont entourés d'un cercle noir et les sites alternatifs de SUMOylation par un cercle en pointillés.

### 2.3.2.1. SUMOylation / ubiquitination

Les protéines SUMO (small ubiquitin-like modifier) présentent une forte identité de séquence et une forte similitude de structure tridimensionnelle avec l'ubiquitine. Parmi les cinq paralogues retrouvés dans le génome humain, SUMO1, 2 et 3 sont exprimés de manière ubiquitaire et ont été les plus largement étudiés (Sahin et al., 2022). Les fonctions de SUMO4 et 5 sont encore floues.

La conjugaison des protéines à SUMO est transitoire et est réalisée en suivant quatre étapes:

1. Les petites protéines SUMO sont maturées par des protéases spécifiques (famille des SENP).
2. Les protéines SUMO sont activées par un complexe E1 d'activation de SUMO.
3. Les protéines SUMO sont transférées sur l'unique enzyme E2 de conjugaison, UBC9, qui conjugue le groupe CH<sub>3</sub> C-terminal de SUMO sur le groupe NH<sub>3</sub> des lysines des protéines cibles, formant une liaison covalente.
4. Les enzymes E3 ligases peuvent stabiliser la formation du complexe UBC9-substrat et facilitent le transfert de la protéine SUMO sur son substrat.

Bien que covalamment relié aux protéines, le SUMO peut être retiré par l'action des SUMO protéases qui le clivent pour le recycler.

SUMO a initialement été décrit comme une protéine liant PML dans une expérience de criblage utilisant la technique du double-hybride (Boddy et al., 1996). La coque du CNP a la capacité de recruter UBC9, permettant la SUMOylation de PML sur trois résidus lysine en position K65, K160 et K490, avec la formation de chaînes poly-SUMO sur la lysine K160 (Kamitani et al., 1998; Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Sahin et al., 2014). Cinq résidus minoritaires K226, K380, K400, K497 et K616 ont été identifiés par spectrométrie de masse en conditions de surexpression de SUMO ou de PML sans que l'on ne connaisse la relevance physiologique de ces modifications (Galisson et al., 2011; Vertegaal et al., 2006).

Le CNP peut alors recruter des partenaires *via* des interactions intermoléculaires entre le SUMO conjugué sur PML et le motif SIM d'interaction avec SUMO (SIM : SUMO interacting motif) des protéines partenaires permettant leur regroupement à l'intérieur de la structure (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Sahin et al., 2014; Van Damme et al., 2010; Zhong et al., 2000) (Figure 13).

La SUMOylation de PML a été initialement proposée comme requise pour la biogenèse des CNP (Müller et al., 1998; Shen et al., 2006) mais il est aujourd'hui établi que ce mécanisme n'est pas nécessaire pour la formation des corps nucléaires. Les cellules exprimant une protéine PML mutée sur les trois sites de SUMOylation ou présentant une délétion du SIM forment toujours des corps nucléaires creux (Barroso-Gomila et al., 2021; El Asmi et al., 2014; Sahin et al., 2014;

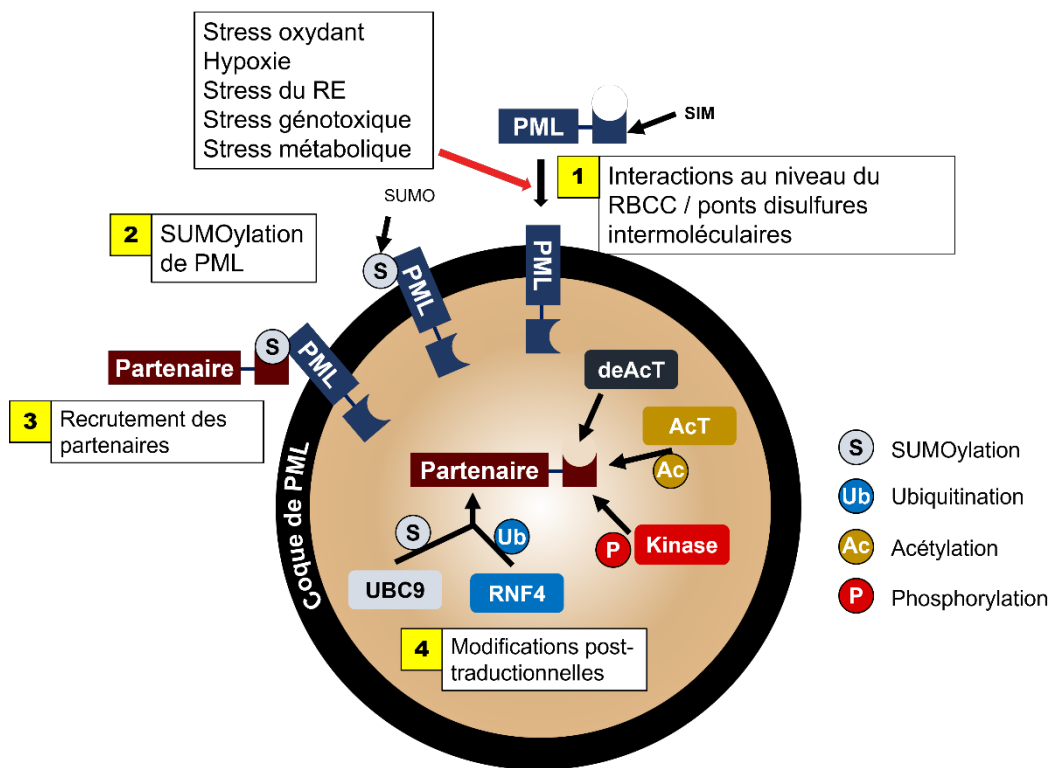


Figure 13 : Assemblage des corps nucléaires PML

Les CNP s'assemblent selon un processus séquentiel : assemblage de PML pour former la coque du CNP, SUMOylation de la coque du CNP, recrutement des protéines partenaires par des interactions SUMO-SIM et modifications post-traductionnelles des protéines partenaires. Les CNP permettent principalement la SUMOylation des protéines partenaires bien qu'ils soient également impliqués dans leur acétylation, leur phosphorylation ou leur ubiquitination. S: SUMO, P: Phosphoryl, Ac: acétyl, Ub: ubiquitine, AcT: acetylase, deAcT: dé-acétylase.

Weidtkamp-Peters et al., 2008). Cela renforce l'idée que les CNP sont issus de l'oligomérisation de PML par des interactions entre certains résidus clé qui restent à identifier.

La formation de chaînes poly-SUMO sur la lysine 160 de PML crée un site d'ancrage pour l'E3 ubiquitine ligase RNF4 qui présente quatre motifs SIM (Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Tatham et al., 2008). RNF4 fixe alors l'ubiquitine sur la chaîne SUMO, initiant la dégradation de PML par le protéasome. Ce processus s'applique aussi bien à PML qu'à la protéine oncogénique PML-RAR $\alpha$  impliquée dans la leucémie aiguë promyélocytaire. La SUMOylation de PML est donc un élément clé de la régulation de sa stabilité. PML a été le premier substrat de RNF4 décrit chez les mammifères et depuis plusieurs autres protéines ont été identifiées comme étant des cibles de RNF4 (Kumar et al., 2017).

#### 2.3.2.2. La phosphorylation et l'acétylation

Différentes kinases modifient PML et il a été démontré que la phosphorylation des domaines SIM joue un rôle dans l'interaction avec les protéines SUMO (Gareau and Lima, 2010). PML est notamment phosphorylée par ERK2 (Hayakawa and Privalsky, 2004), ATR (Bernardi et al., 2004), et CHK2 (Yang et al., 2002). PML peut également être phosphorylée par la CK2, une kinase fréquemment activée dans les cancers humains, sur une sérine dans le SIM, permettant d'augmenter la dégradation dépendante de l'ubiquitine de PML (Scaglioni et al., 2006). Dans cette étude, la mutation des sites de phosphorylation par la CK2 sur PML, où une inhibition pharmacologique de cette enzyme augmentent les capacités suppressives de tumeurs de PML *in vivo*. Des expériences de phosphorylation *in vitro* indiquent que la CK2 peut également phosphoryler PML sur quatre résidus sérines positionnés autour du SIM, augmentant la conjugaison de PML avec SUMO1 (Cappadocia et al., 2015; Stehmeier and Muller, 2009). Le dialogue entre phosphorylation et SUMOylation de PML et leur rôle dans les fonctions associées au corps nucléaires ne sont pas encore élucidés malgré des premiers résultats intéressants du point de vue thérapeutique (Scaglioni et al., 2006).

L'acétylation de PML est également étroitement liée à sa SUMOylation. L'acétylation de PML par p300 sur ses résidus lysines K487 et K515 favorise sa SUMOylation (Hayakawa et al., 2008). De plus, l'histone désacétylase SIRT1 qui est recrutée aux corps nucléaires promeut la SUMOylation de PML par SUMO1 (Campagna et al., 2011). Bien que les liens entre acétylation et SUMOylation ne soient pas complètement élucidés, il semble qu'il existe, comme pour la phosphorylation, un dialogue entre acétylation et SUMOylation de PML par SUMO1.

Dans cette partie du manuscrit, nous avons vu que la formation des CNP est un mécanisme séquentiel initié par l'assemblage de PML à la coque, permettant le recrutement de l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO, UBC9. La SUMOylation de PML n'est pas nécessaire à son assemblage en CNP mais permet le recrutement des protéines partenaires via des interactions SUMO/SIM. D'autres modifications post-traductionnelles comme des acétylations, des phosphorylations ou des ubiquitinations sur des résidus précis ont également été identifiées. Cependant, les mécanismes précis d'assemblage de PML aux CNP ne sont pas encore totalement élucidés.

### *2.2.3. Séparation de phase liquide-liquide et assemblage des CNP*

Tout comme pour la biogenèse d'autres organelles sans membranes, il est intéressant de considérer le rôle de la séparation de phase liquide-liquide dans le mécanisme d'assemblage des CNP, mais à ce jour aucune étude complète n'a été menée sur le sujet. Plusieurs articles, pour certains publiés avant l'émergence de ce domaine de recherche, suggèrent que PML pourrait s'assembler par LLPS.

La sphéricité des CNP est connue depuis leurs premières observations dans les années 1960 (G. De Thé et al., 1960) et a été confirmée depuis par des techniques de microscopie électronique et à super-résolution (Hands et al., 2014; Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018; Lang et al., 2010). La dépendance de la formation des corps nucléaires à la concentration en protéine est suggérée par plusieurs études. Les cellules *Pml<sup>KO</sup>* sont dépourvues de CNP et la transfection d'un plasmide permettant la surexpression de PML permet de restaurer la formation de ces corps nucléaires (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000). De la même manière l'activation



transcriptionnelle de PML par l'interféron induit la formation des CNP (Chelbi-Alix et al., 1995; Lavau et al., 1995; Stadler et al., 1995) tout comme l'entrée des cellules en sénescence induite par des oncogènes qui entraînent une augmentation de la quantité de PML intracellulaire (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). A l'inverse, l'induction de sa dégradation en réponse à des oxydants (ATO, paraquat) ou l'augmentation du volume nucléaire, réalisée sur des noyaux purifiés en réponse à une diminution de la concentration extracellulaire en sels, induisent une perte de ces corps nucléaires (Hancock, 2004; Jeanne et al., 2010; Lallemand-Breitenbach et al., 2008; Sahin et al., 2014). Des fusions des CNP ont été rapportées en réponse à une compression de la chromatine par une pince optique (Hoischen et al., 2018) et des fissions ont été observées au cours de la réplication de l'ADN ou en réponse à des chocs de température (heat shock), des traitements aux métaux lourds ou des dommages à l'ADN (Dellaire, 2006; Dellaire et al., 2006; Eskiw et al., 2004, 2003). Cependant aucune étude ne décrit de fusions ou de fissions des CNP en absence de stress. Enfin, des expériences de FRAP menées sur différents modèles cellulaires ont démontré que la protéine PML est dynamique au sein des CNP et est en équilibre entre la fraction nucléoplasmique et la fraction associée aux corps (Hoischen et al., 2018; Jeanne et al., 2010; Weidtkamp-Peters et al., 2008). L'un des objectifs de ma thèse a donc consisté à étudier l'assemblage des CNP à travers le prisme du LLPS.

### *2.3. Recrutement des protéines partenaires et modifications post-traductionnelles*

Comme expliqué précédemment, les CNP ont la capacité de regrouper des protéines partenaires ainsi que leurs enzymes de modification. Entre cent et deux cents protéines partenaires des CNP ont été identifiées à ce jour et l'association des partenaires à ces structures est modulée en réponse à différents stimuli (stress oxydant, transformation, traitement à l'interféron et infections virales) (Van Damme et al., 2010). La multitude de fonctions biologiques dans lesquelles les CNP sont impliquées sont vraisemblablement le reflet de la diversité de protéines recrutées aux corps nucléaires.

Les protéines partenaires de PML sont redistribuées dans le noyau des cellules *Pml<sup>KO</sup>* soit sous forme diffuse, soit sous la forme de ponctuations de petites tailles. La réintroduction de PML dans ces cellules restaure la formation des CNP et le recrutement des protéines partenaires l'intérieur du CNP (Ishov et al., 1999; Zhong et al., 2000). Le recrutement des protéines partenaires aux corps nucléaires résulte d'un mécanisme séquentiel, débutant par la SUMOylation de PML sur sa lysine 160 qui permet ensuite le recrutement des protéines partenaires par leur SIM (Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Sahin et al., 2014). Des expériences utilisant uniquement le domaine SIM de protéines partenaires de PML fusionné à la GFP ont démontré que ce motif est suffisant pour induire leur recrutement aux CNP (Sahin et al., 2014).

Ce processus permet de recruter les protéines partenaires ainsi que leurs enzymes de modification aux corps nucléaires. Les protéines partenaires sont très mobiles et sont recrutées de manière transitoire aux CNP, en particulier en réponse au stress (Sahin et al., 2014; Weidtkamp-Peters et al., 2008). Les CNP réguleraient ainsi les modifications post-traductionnelles des protéines partenaires, en particulier leur SUMOylation et leur ubiquitination (Sahin et al., 2014; Tessier et al., 2022; Van Damme et al., 2010). *In vivo*, la délétion de PML induit une baisse significative de la quantité de protéines SUMOylées et l'altération du site consensus de SUMOylation autour de la lysine 160 bloque l'hyper-SUMOylation des protéines partenaires en réponse au stress (Sahin et al., 2014; Tessier et al., 2022).

Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer le rôle des CNP dans la modulation de l'activité des protéines partenaires par les modifications post-traductionnelles: la séquestration des protéines aux CNP, l'activation de leurs fonctions biochimiques et l'induction de leur dégradation par SUMO-ubiquitination (Bernardi and Pandolfi, 2007; Guo et al., 2014; Lallemand-Breitenbach and De Thé, 2010; Sahin et al., 2014).

## 3. Fonctions associées à PML et aux corps nucléaires

### 3.1. Généralités

Les CNP présentent une multitude de fonctions biologiques auxquelles ils sont associés. Le gène *Pml* n'est pas essentiel puisque les souris *Pml*<sup>KO</sup> sont viables et ont un développement comparable à des souris sauvages (Wang et al., 1998). Cependant, dès la première publication sur ce modèle de souris, l'étude de la tumorigenèse induite par l'exposition de la peau à du diméthylbenzanthracène utilisé ou non en combinaison avec de l'acétate de tétradécanoylphorbol - connu pour induire des papillomes, des sarcomes et des fibrosarcomes - ont démontré le rôle protecteur de PML dans le développement des tumeurs (Wang et al., 1998). Ces premiers rapports ont fourni les premières preuves que PML est indispensable dans la réponse au stress et agit comme un suppresseur de tumeurs. Les études publiées depuis ont démontré le rôle versatile de PML dans les conditions physiologiques et pathologiques (Figure 14).

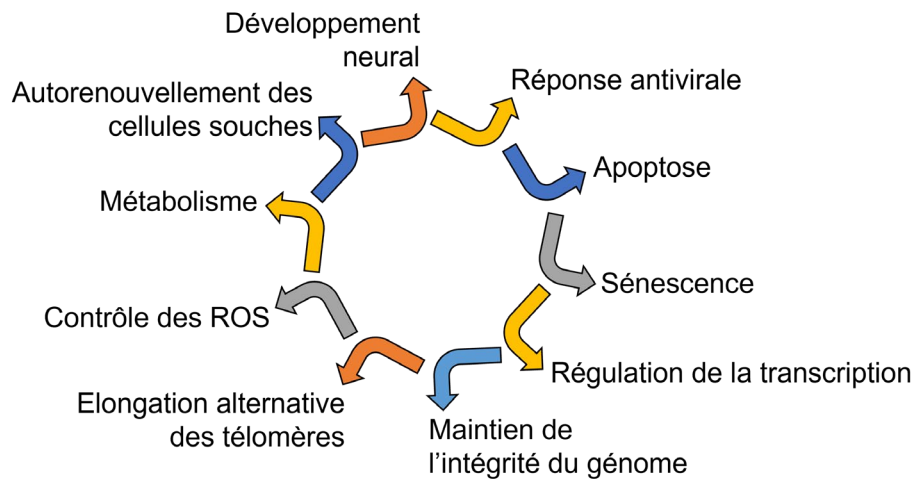


Figure 14 : Représentation schématique des différentes fonctions associées à PML.

## 3.2. Apoptose

Du fait de son rôle dans le développement cancéreux, l'implication de PML dans la régulation de l'apoptose et de la sénescence a été très largement étudié dès la création des modèles de souris déficients en PML.

### 3.2.1. Régulation de la voie p53

L'apoptose médiée par p53 a été largement décrite. Dans des cellules non stressées son ubiquitination par l'E3 ubiquitine ligase MDM2 permet de maintenir des niveaux faibles de p53 en contrôlant sa dégradation par le protéasome. En réponse à divers stress, les niveaux de p53 sont stabilisés et cette protéine active l'expression de gènes de la famille BCL-2 comme PUMA ou NOXA. Ces protéines vont aller lier ou inhiber l'activité de protéines pro-survie de la même famille en libérant les effecteurs BAX et BAK. L'activation de BAX et BAK induit une augmentation de la perméabilité de la membrane et l'activation des voies caspases induisant la mort cellulaire.

Une étude réalisée par l'équipe a interrogé le lien entre PML et la régulation du stress oxydant *in vivo* en comparant les niveaux d'oxydation dans les conditions basales ou induites par différents stress chez des animaux *Pml<sup>WT</sup>* et *Pml<sup>KO</sup>* (Niwa-Kawakita et al., 2017). Dans les foies de souris et dans un modèle de fibroblastes primaires humains, PML diminue les niveaux de ROS basaux et active des voies antioxydantes médiées par p53. A l'inverse, lors d'un stress oxydant induit par l'acétaminophène ou le jeûne, PML active des voies d'apoptose et de sénescence médiées par p53. PML joue donc un rôle de senseur de ROS et régule l'activité de p53 *in vivo*.

D'un point de vue mécanistique, de nombreux régulateurs de la voie p53, et p53 elle-même, sont recrutés aux corps nucléaires (Fogal, 2000; Garcia and Attardi, 2014). Les CNP contrôlent les niveaux de SUMOylation de ces protéines régulatrices dans les conditions basales et en réponse au stress oxydant (Ivanschitz et al., 2013; Tessier et al., 2022). Les CNP, par l'intermédiaire de la kinase HIPK2 et de l'acétyltransférase CBP régulent la phosphorylation et l'acétylation de p53, modulant son activité (Conrad et al., 2016; Ivanschitz et al., 2013; Kriehoff-Henning and Hofmann, 2008; Pearson et al., 2000). La protéine MDM2 dont la fonction est d'induire la

dégradation de p53 en l'ubiquitinylant dans les conditions basales, est délocalisée au nucléole par PML en réponse à des dommages à l'ADN, stabilisant p53 et induisant l'apoptose (Bernardi et al., 2004; Kurki et al., 2003; Louria-Hayon et al., 2003; Wan et al., 2019; Wei et al., 2003; Zhu et al., 2003).

Réciproquement, *PML* est un gène cible de p53 par une boucle de régulation positive qui augmente son expression en réponse à différents stress (de Stanchina et al., 2004; Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000).

### 3.2.2. *Autres facteurs régulateurs de l'apoptose*

PML a également été décrite comme régulant l'apoptose induite par la voie JNK. En réponse aux UV, les cellules entrent en apoptose en suivant une voie p53 indépendante, mais JNK/c-Jun dépendante (Tournier, 2000). En effet, les fibroblastes *Jnk<sup>KO</sup>* sont résistants à l'apoptose, tout comme les cellules *Pml<sup>KO</sup>*, suggérant une régulation de l'apoptose par PML indépendante de p53, mais dépendante de JNK/c-Jun. PML est alors nécessaire à l'activation transcriptionnelle de c-Jun et à sa liaison à l'ADN. De plus, le chaperon d'histone DAXX, régulateur de la voie JNK, est recruté et SUMOylé aux CNP, induisant sa séquestration dans les cellules entrant en apoptose, ce qui permet la dérégulation des gènes pro-apoptotiques (Chang, 1998; Li et al., 2000; Sahin et al., 2014; Yang et al., 1997; Zhong et al., 2000).

La protéine FLASH (FLICE-associated huge protein), est un complexe multiprotéique médiateur de l'induction de l'apoptose par Fas. FLASH co-localise partiellement aux CNP dans les conditions normales. En réponse à Fas, FLASH est relargué des corps nucléaires et s'accumule dans les mitochondries induisant l'apoptose par une voie dépendante des caspases (Krieghoff et al., 2007; Milovic-Holm et al., 2007). D'autres protéines à domaine de mort, comme TRADD qui a la capacité d'induire l'apoptose de manière PML/p53 dépendante (Morgan et al., 2002), ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) (Crowder et al., 2005) ont été identifiées comme pouvant induire l'apoptose, respectivement de manière PML/p53 et interféron/PML dépendante.

La sensibilité des cellules à l'apoptose dépend de leur capacité à transférer des ions calcium depuis le réticulum endoplasmique vers la mitochondrie. Une structure spécialisée, appelée membranes associées aux mitochondries (MAMs) sert d'interface entre le RE et les mitochondries. En utilisant des cellules *Pml<sup>KO</sup>* et une protéine PML fusionnée avec un signal d'adressage au RE, il a été démontré que PML peut s'associer aux MAMs et activer PP2A, induisant une ouverture du récepteur IP3, ce qui augmente le flux calcique vers l'intérieur de la mitochondrie et sensibilise les cellules à l'apoptose (Giorgi et al., 2010; Missiroli et al., 2016).

### 3.3. Sénescence

La sénescence est un arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1 découvert sur des fibroblastes humains en culture et qui est spontanément induit après un certain nombre de réplifications (Hayflick and Moorhead, 1961). La morphologie des cellules change et elles ont une activité  $\beta$ -galactosidase lysosomale accrue qui permet leur détection. Elle peut être induite par de multiples stimuli comme les dommages à l'ADN, le stress oxydant, l'activation oncogénique, la dysfonction mitochondriale ou la chimiothérapie. Cet arrêt du cycle cellulaire s'accompagne d'une réduction de la consommation d'énergie, assurant la survie de la cellule. Ce mécanisme implique les axes p53/p21 et p16/Rb (Childs et al., 2015; Nardella et al., 2011).

PML a initialement été impliquée dans la régulation de la sénescence lorsqu'il a été démontré que l'introduction de l'oncogène *KRAS<sup>G12V</sup>* induit une sénescence dépendante de la présence de PML (Ferbeyre et al., 2000; Pearson et al., 2000). Un traitement à l'interféron  $\beta$  activant l'expression de PML, ou la surexpression de PML induisent également l'entrée en sénescence (Ferbeyre et al., 2000; Moiseeva et al., 2006; Pearson et al., 2000). De manière intéressante, la régulation de la sénescence médiée par PML est liée à la régulation des voies p53/p21 ainsi que p16/Rb. Comme cité dans la partie précédente, les CNP ont été identifiés comme régulateurs de la voie p53 dans les conditions basales et en réponse au stress. Cela est également vrai dans le contexte de la sénescence, où ils activent p53 en induisant son acétylation, sa phosphorylation ou sa SUMOylation aux CNP en réponse à des dommages à l'ADN ou à l'expression de l'oncogène

comme *KRAS*<sup>G12V</sup> (Bischof, 2002; Ivanschitz et al., 2015; Vernier et al., 2011). Dans ces conditions, les CNP séquestrent également le complexe E2F/Rb, induisant un arrêt du cycle cellulaire (Alcalay et al., 1998; Mallette et al., 2004; Vernier et al., 2011). L'isoforme IV de PML régule la sénescence induite par p53. Elle possède un domaine C-terminal spécifique, interagissant avec ARF, le régulateur nucléolaire de p53 ayant pour fonction de stabiliser p53 en la protégeant de la dégradation médiée par MDM2 (Bischof, 2002; Ivanschitz et al., 2015).

### 3.4. Réponse antivirale

De nombreuses protéines de la famille des TRIM sont impliquées dans l'infection et/ou la réponse antivirale innée (Carthagena et al., 2009; van Tol et al., 2017).

Les souris *Pml*<sup>KO</sup> sont plus sujettes aux infections et produisent plus de virus (Hsu and Kao, 2018; Wang et al., 1998). Inversement, la surexpression de PML, ou son induction par l'interféron, permettent une diminution de l'infection par certains virus (Everett, 2006; Everett and Chelbi-Alix, 2007).

Les CNP recrutent des chaperons comme DAXX et ATRX, des polymérase, des facteurs de restriction viraux ou encore la nucléocapside néosynthétisée des virus, réprimant ainsi l'infection (Catez et al., 2012; Dutrieux et al., 2015; Maroui et al., 2011; Niu et al., 2017; Reichelt et al., 2011). PML peut également promouvoir la SUMOylation de protéines virales, comme IE1p72 du cytomégalovirus humain (hCMV) et Tax du HTLV1 (Human T-cell lymphotropic Virus type 1), stoppant leur réplication (Dassouki et al., 2015; Reuter et al., 2017). Enfin, les corps nucléaires séquestrent l'ADN de HSV-1 (herpes simplex virus 1) et contrôlent sa chromatinisation *via* l'action de DAXX/ATRX et HIRA, induisant l'entrée en phase de latence de l'infection (Cohen et al., 2018). De manière intéressante, tout comme pour le contrôle de la sénescence, le domaine C-terminal de PML IV semble particulièrement impliqué dans la réponse antivirale médiée par PML (Maroui et al., 2011; Reichelt et al., 2011).

Il est établi que plusieurs virus à ADN ou ARN codent pour des protéines qui co-localisent aux corps nucléaires et induisent leur désorganisation, suggérant que l'altération de la structure des

corps puisse être une stratégie pour échapper à un mécanisme antiviral inné (Geoffroy and Chelbi-Alix, 2011; Giovannoni et al., 2019). D'autres virus induisent la dégradation de PML par une voie SUMO et protéasome-dépendante après recrutement de certaines protéines virales aux corps nucléaires (El Mchichi et al., 2010; Geoffroy and Chelbi-Alix, 2011).

### 3.5. Régulation de la transcription

Le processus précis selon lequel les CNP régulent la transcription n'est pas encore totalement établi. Contrairement à la plupart des autres corps nucléaires, les CNP ne contiennent pas d'acides nucléiques en conditions normales (Boisvert et al., 2000). Les CNP pourraient jouer un rôle direct dans la régulation de la transcription *via* une interaction avec la chromatine et/ou avoir une action indirecte en régulant l'activité de facteurs de transcription transitant aux corps nucléaires.

Comme cité précédemment, les CNP recrutent de nombreuses protéines partenaires dont des facteurs de modification de la chromatine comme CBP ou HP-1, des chaperons d'histones comme DAXX, des remodelleurs de la chromatine comme ATRX ou encore des facteurs de transcription comme p53. Les CNP modulent leur activité en régulant leurs modifications post-traductionnelles (ex : p53) ou en les séquestrant aux corps nucléaires (ex : E2F). Très récemment, une étude de laboratoire basée sur l'analyse par spectrométrie de masse de protéines conjuguées à SUMO a identifié que la SUMOylation du complexe KAP1 et d'autres régulateurs maîtres de la transcription comme DPPA2 est induite par PML, en réponse à l'ATO, dans un modèle de cellules souches embryonnaires de souris (mESC) (Tessier et al., 2022). Une étude transcriptionnelle approfondie en mESC a mis en évidence que PML régule indirectement leur état de totipotence en contrôlant la SUMOylation de ces cibles.

Des observations par microscopie électronique ont révélé que les corps nucléaires sont entourés de chromatine et établissent des contacts physiques avec cette dernière (Corpet et al., 2020). PML n'est pas associée au hasard sur la chromatine et les corps nucléaires ont tendance à se localiser près des loci présentant une haute activité transcriptionnelle (Shiels et al., 2001; Wang et al., 2004). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré que PML



est associé au niveau des régions promotrices de certains gènes et proposent que l'association entre les CNP et des locus spécifiques pourrait avoir un rôle dans l'organisation tridimensionnelle de la chromatine, créant un environnement favorable à l'expression des gènes associés (Corpet et al., 2020).

### 3.6. Réponse aux dommages à l'ADN

Les CNP sont sensibles aux dommages à l'ADN et agiraient comme un senseur et un modulateur de la réparation. En réponse à des radiations ionisantes, leur nombre augmente rapidement (Carbone et al., 2002; Dellaire et al., 2006) et la juxtaposition des CNP avec les sites de cassures augmente graduellement au cours du temps (Carbone et al., 2002). La déplétion de PML diminue de manière drastique la recombinaison homologue (Attwood et al., 2020; Yeung et al., 2012) et de nombreux facteurs de détection de la cassure double-brin ainsi que des protéines permettant sa réparation sont retrouvés aux CNP (Hsu and Kao, 2018). La désorganisation des CNP induite par l'expression de PML-RAR $\alpha$  dans un modèle pré-leucémique ou leucémique retarde l'apparition de ce mécanisme de réparation (di Masi et al., 2016; Yeung et al., 2012). Enfin, l'expression d'un mutant du RING de PML abolissant la formation des CNP induit des défauts dans l'activation des voies de réparation de l'ADN par recombinaison homologue et par jonction d'extrémités non-homologues (Voisset et al., 2018). Cela suggère que les caractéristiques structurales des CNP sont essentielles pour le contrôle de la réparation de l'ADN médiée par PML.

### 3.7. Elongation alternative des télomères

Dans la majorité des cancers, le raccourcissement des télomères est compensé par l'activité des télomérases qui synthétisent de l'ADN télomérique *de novo* par transcription inverse d'une matrice ARN (Granger et al., 2002; Greider and Blackburn, 1989; Shay, 2001). Une catégorie de cancers, majoritairement des sarcomes et des gliomes, n'exprime pas de télomérase et maintiennent la taille de leurs télomères par un mécanisme appelé « Alternative Lengthening of

Telomeres » (ALT) (Heaphy et al., 2011), au cours duquel de l'ADN télomérique peut être synthétisé en utilisant un télomère sur la chromatide sœur ou un autre chromosome comme matrice (Henson et al., 2002; Pickett and Reddel, 2015). Les télomères de ces cellules sont associés physiquement avec des CNP anormaux, les « corps nucléaires PML associés à l'ALT » (APB : ALT-associated Promyelocytic leukemia Bodies) qui permettent l'organisation et la concentration des répétitions télomériques (Osterwald et al., 2015; Yeager et al., 1999). Les APB recrutent également des protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles-brins, la recombinaison homologue et le secours des fourches de réplication bloquées, permettant la synthèse d'ADN durant l'ALT réalisée spécifiquement aux APBs, selon un mécanisme dépendant de PML (Cesare and Reddel, 2010; Osterwald et al., 2015; Wu et al., 2000; Zhang et al., 2019).

### 3.8. Métabolisme des acides gras

La régulation du métabolisme énergétique médié par PML a été particulièrement étudié dans le contexte de l'auto-renouvellement des cellules souches dans les conditions cancéreuses. PML régule ce processus en agissant comme un répresseur de mTOR ou encore de PGC1 $\alpha$  et de la voie PPAR (et sera décrit dans la partie 4.2.1.).

Par ailleurs, en dehors du contexte cancéreux, il a été rapporté que les souris *Pml*<sup>KO</sup> accumulent de la graisse plus rapidement que les souris sauvages en réponse à un régime alimentaire riche en acides gras en raison d'une augmentation de l'adipogenèse (Carracedo et al., 2012; Kim et al., 2011). La perte de PML induirait une expression des facteurs de transcription CCAAT/enhancer binding protein $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , impliqués dans l'adipogenèse (Kim et al., 2011). Réciproquement, l'expression de *Pml* est augmentée dans le foie de patients présentant une obésité morbide ou dans un modèle de souris nourries avec un régime riche en acides gras (Carracedo et al., 2015). Cela pourrait indiquer que PML est exprimé comme un mécanisme de réponse ou d'adaptation pour contrecarrer l'augmentation de l'adipogenèse.

Enfin, des études récentes montrent que dans certaines cellules présentant des accumulations de lipides dans le noyau, PML s'associe à la surface des gouttelettes. Ces structures

présentent à leur surface des enzymes de biosynthèse des lipides, suggérant qu'elles pourraient être impliquées dans la synthèse des acides gras et la régulation de la quantité d'acides gras (Lee et al., 2020; McPhee et al., 2022; Ohsaki et al., 2016).

## 4. PML et pathologies

### 4.1. La leucémie aiguë promyélocytaire

#### 4.1.1. Généralités

Les leucémies sont un type de cancer caractérisé par une prolifération de cellules malignes dérivées de la moelle osseuse et qui envahissent la circulation sanguine, les organes et induisent une perte de la moelle osseuse saine. Il existe un large spectre de leucémies décrites, variant de formes bénignes à des formes hautement agressives. Elles sont généralement classées en leucémies « aiguës » ou « chroniques » en fonction du statut de différenciation initial de la cellule cancéreuse (« aiguë » renvoie à une cellule souche ou dans les premiers stades de différenciation et « chronique » renvoie à une cellule mature) et « lymphoïdes » ou « myéloïdes » en fonction de la lignée cellulaire affectée. Toutes les leucémies partagent certaines caractéristiques : 1) formule sanguine anormale, anémie, hémorragies causées par la déficience en plaquettes et infections liées à la perte des cellules lymphoïdes/myéloïdes, 2) masse tumorale importante avec une grande quantité de cellules leucémiques dans le sang et les organes. Un grand nombre de leucémies aiguës sont traitées avec des molécules affectant la réplication de l'ADN, induisant des liaisons transversales sur l'ADN, ciblant les topoisomérases ou la synthèse des nucléotides, avec une efficacité accrue chez les cancers pédiatriques.

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est le sous-type M3 de leucémie aiguë myéloïde d'après la classification FAB (French-American-British). Elle a initialement été identifiée en 1957 par Hillestad qui l'a décrite chez trois patients présentant une leucémie très agressive caractérisée par un grand nombre de promyélocytes infiltrant la moelle osseuse du fait d'un blocage de la différenciation de la lignée des granulocytes (Hillestad, 1957) (Figure 15). La LAP représente environ 10%-15% des cas de leucémie aiguë myélocytaire et affecte environ 1900 patients chaque année en Europe (Dinmohamed and Visser, 2019). Les symptômes incluent fatigue, fièvre, malaise, pâleur, une diathèse hémorragique et l'apparition de purpura. Le diagnostic est réalisé par une analyse de la formule sanguine, prouvant la présence d'un grand nombre de cellules blastiques. Ce diagnostic est confirmé avec une biopsie de moelle osseuse.

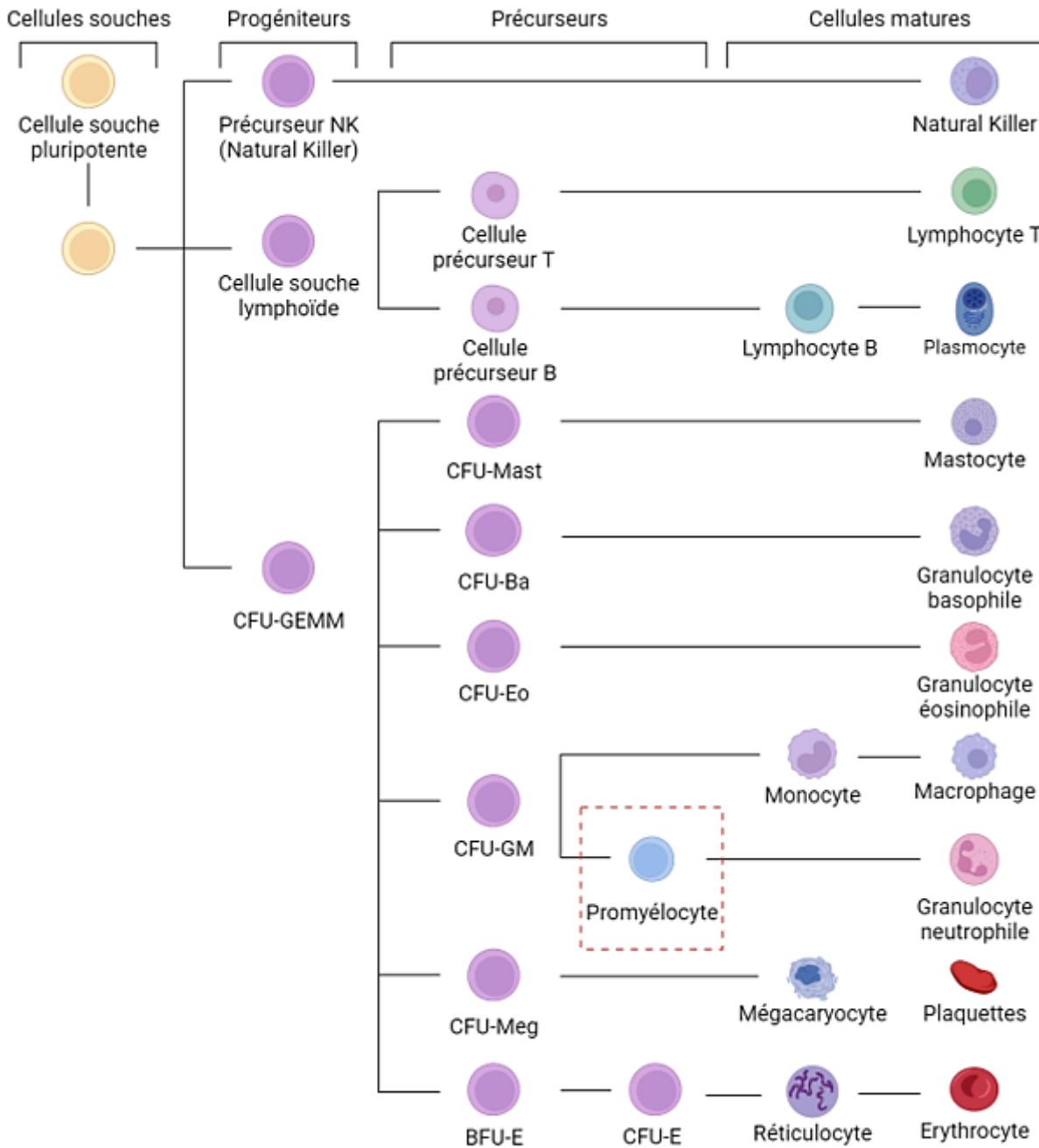


Figure 15 : Représentation schématique de l'hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques sont localisées dans la moelle osseuse. Elles s'autorenouvellent ou se différencient en progéniteurs hématopoïétiques engagés dans le processus de différenciation aboutissant à la production de cellules sanguines fonctionnelles. Dans la leucémie aiguë promyélocytaire, la différenciation des cellules est bloquée au stade de promyélocyte (encadré en rouge).

#### 4.1.2. *PML-RAR $\alpha$ initiateur de la LAP*

Le récepteur à l'acide rétinoïque  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) appartient à la superfamille des récepteurs à l'acide rétinoïque regroupant des récepteurs hormonaux nucléaires qui activent ou répriment l'activité transcriptionnelle de leurs gènes cibles dépendamment de la présence de l'hormone (Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1995). Dans les conditions normales, RAR $\alpha$  dimérise avec le récepteur X aux rétinoïdes  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), formant un hétérodimère qui reconnaît des gènes répondant à l'acide rétinoïque. En l'absence d'acide rétinoïque, l'hétérodimère agit comme un répresseur en recrutant des corépresseurs et des régulateurs épigénétiques qui maintiennent la chromatine dans un état inactif (Privalsky, 2004). L'acide rétinoïque est produit par l'oxydation enzymatique de la vitamine A et est impliqué dans la différenciation hématopoïétique. Plusieurs isomères de l'acide rétinoïque sont ainsi produits, constituant l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA). L'ATRA cible la superfamille des récepteurs à l'acide rétinoïque regroupant des récepteurs hormonaux nucléaires qui activent ou répriment l'activité transcriptionnelle de leurs gènes. La fixation de l'ATRA sur RAR $\alpha$  induit un changement de conformation du récepteur, induisant un relargage des corépresseurs et un recrutement de coactivateurs, permettant l'induction de l'expression des gènes cibles de l'acide rétinoïque (P. Huang et al., 2014).

La translocation chromosomique unique entre le gène codant pour PML sur le chromosome 15 et le récepteur à l'acide rétinoïque alpha (RAR $\alpha$ ) situé sur le chromosome 17 (t15,17), identifiée par *De Thé et al.* en 1990 (de Thé et al., 1990), est à l'origine de 98% des cas de LAP (Figure 16). Ce gène de fusion code pour l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  qui altère les fonctions de différenciation liées à la fixation de l'acide rétinoïque sur RAR $\alpha$  et induit la désorganisation des corps nucléaires PML, entraînant un arrêt au stade promyélocytaire.

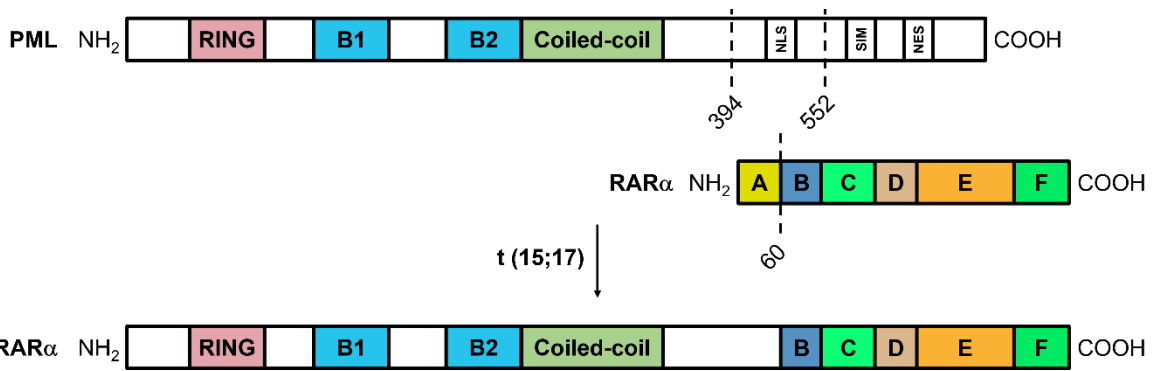


Figure 16 : Représentation schématique des protéines PML, RARα et PML-RARα (chez un patient LAP) et désorganisation des CNP dans la LAP.

Sur ce schéma, les domaines RING, B1, B2 et coiled-coil sont retrouvés comme précédemment. Les domaines de la protéine RARα sont également représentés. Le domaine C correspond au domaine de liaison sur l'ADN et le domaine E au domaine de liaison aux hormones. Deux sites de cassure ont été identifiés sur PML en positions 394 et 552, conduisant à la formation d'une forme longue et d'une forme courte de l'oncoprotéine de fusion PML-RARα.

Il existe deux isoformes de la protéine PML-RARα, différant uniquement par les séquences de PML, générées par des points de cassure hétérogènes sur le chromosome 15 (Chen et al., 1992; Chillón et al., 2000; de Thé et al., 1991; Grimwade et al., 1996; Pandolfi et al., 1992). Pour ces deux isoformes, le domaine RBCC de PML est toujours exprimé dans PML-RARα et induit la multimérisation de la protéine de fusion *via* le domaine coiled-coil de PML, permettant l'assemblage de PML-RARα en CNP anormaux (Occhionorelli et al., 2011). Bien que l'oncoprotéine PML-RARα soit à l'origine de la presque totalité des cas de LAP, plusieurs protéines fusionnant avec RARα et initiant cette maladie ont été identifiés (Geoffroy and de Thé, 2020). De manière intéressante, une caractéristique commune de toutes protéines fusionnant avec RARα est la présence d'un domaine de dimérisation et/ou de liaison à l'ADN (Geoffroy and de Thé, 2020; Licht, 2006).

Les CNP anormaux formés par PML-RARα peuvent recruter différents partenaires comme DAXX, des corépresseurs transcriptionnels, des histones désacétylases, des protéines du complexe Polycomb ou RXR alpha, agissant comme un répresseur, insensible à des concentrations physiologiques d'acide rétinoïque (Ablain and de Thé, 2014). L'oncoprotéine PML-RARα affecte également l'expression de gènes qui ne sont pas des cibles canoniques de RARα (Martens et al., 2010; Melnick and Licht, 1999). Il a été proposé que les domaines de multimérisation des différentes protéines fusionnant avec RARα puissent promouvoir son homo ou

hétérodimérisation et facilitent le recrutement de répresseurs transcriptionnels indispensables à l'arrêt de la différenciation et l'immortalisation des progéniteurs hématopoïétiques (Zhou et al., 2006).

Il existe deux variantes morphologiques de la LAP : une forme hyper-granulaire dite « typique » et une forme hypo-granulaire. Les deux formes présentent des promyélocytes avec des noyaux bilobés anormaux (Figure 17). La forme hyper-granulaire représente 60 à 70% des cas et présente une numération leucocytaire faible et des promyélocytes avec de larges granules azurophiles et des corps d'Auer, structure en forme de bâtonnets rouges. La forme hypo-granulaire présente une leucocytose et de nombreux promyélocytes caractérisés par un noyau irrégulier et des granulations plus fines que la forme hyper-granulaire. Les corps d'Auer sont plus rares dans cette forme.

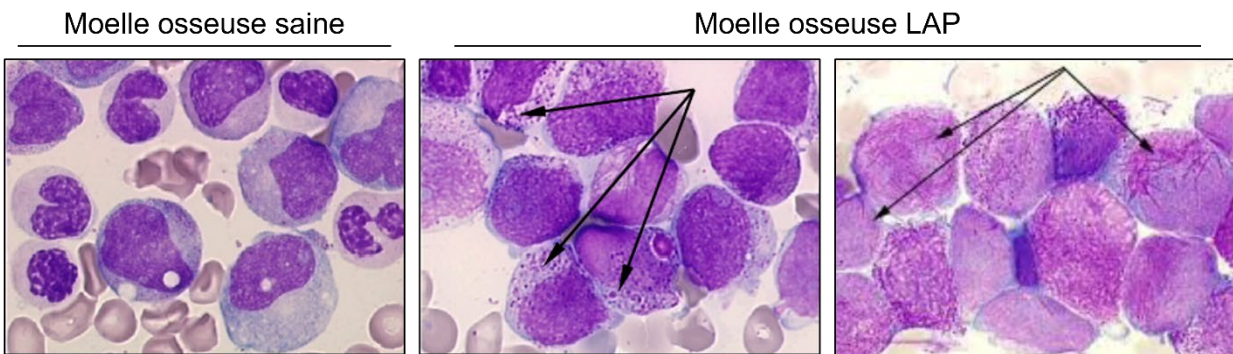


Figure 17 : Colorations de May-Grunwald Giemsa de cellules de moelles osseuses saines et LAP de souris

Les cellules leucémiques sont bloquées au stade de différenciation du promyélocyte. Ces cellules présentent une accumulation de granules azurophiles désignées par les flèches sur le panneau central. Certaines cellules présentent des corps d'Auer désignés par les flèches sur la photo de droite.



### 4.1.3. L'arsenic et l'acide rétinoïque : la première thérapie anticancéreuse ciblée

Le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire fait figure d'exemple parmi les thérapies anti-cancéreuses. Il s'agit de la première stratégie thérapeutique ciblée permettant une rémission totale et sans rechute d'une très grande majorité des patients et ne faisant pas appel à la chimiothérapie (de Thé, 2018; Lo-Coco et al., 2013; Quignon et al., 1997; Wang and Chen, 2008). La LAP est traitée par une combinaison d'ATO et d'acide rétinoïque, ciblant respectivement PML et RAR $\alpha$  et éliminant les promyélocytes et les cellules initiateuses de leucémie (Nasr et al., 2008) (Figure 18).

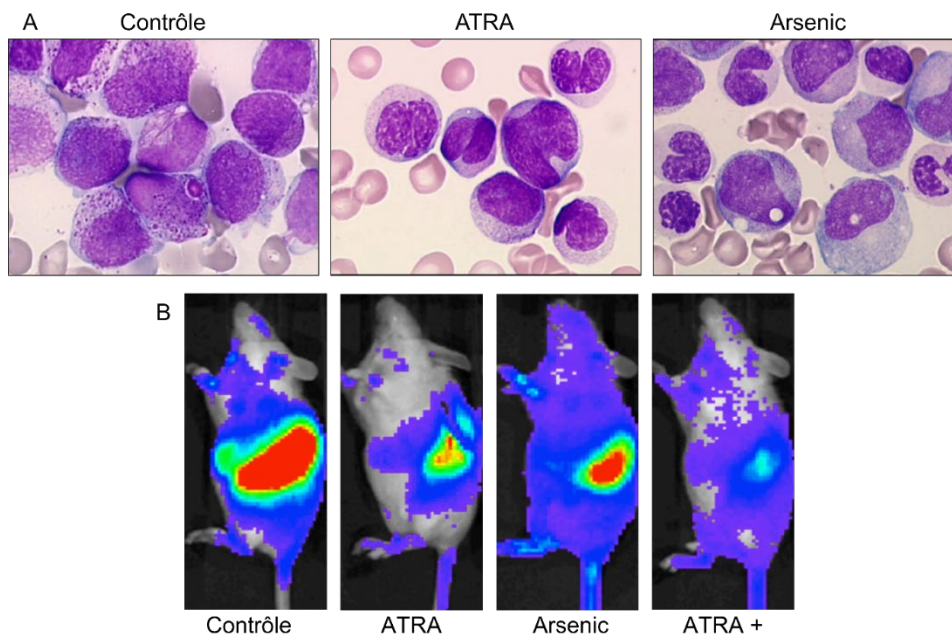


Figure 18 : Effet thérapeutique de la combinaison d'ATRA et d'arsenic dans le traitement de la LAP

- A. L'ATRA et l'arsenic induisent une élimination des cellules LAP de la moelle osseuse des patients. Colorations de May-Grunwald Giemsa de cellules de moelles osseuses LAP traitées avec de l'ATRA ou de l'arsenic révélant la disparition des blastes.
- B. La combinaison de l'ATRA et de l'arsenic induit l'éradication de la charge leucémique. L'effet synergique de ces deux molécules est révélé après trois jours de traitement par l'analyse du signal bioluminescent émis par des cellules LAP dans des rates de souris.

#### 4.1.3.1. La thérapie par différenciation

Jusque dans les années 2000, la LAP était traitée avec des hautes doses d'ATRA qui induisent la différenciation rapide des blastes *in vivo* et *ex vivo* (Breitman et al., 1981; Chomienne et al., 1990; Huang et al., 1988) et qui permettent des rémissions transitoires chez 80% des patients en combinaison avec une chimiothérapie (Lo-Coco et al., 2013; Warrell et al., 1993). Le modèle classique explique que la fixation de l'acide rétinoïque sur RAR $\alpha$  entraîne le recrutement des coactivateurs, permettant l'expression des gènes cibles de l'acide rétinoïque impliqués dans la différenciation myélocytaire (revu dans de Thé and Chen, 2010). La réactivation des voies de transcription bloquées par PML-RAR $\alpha$  en réponse à de fortes doses d'acide rétinoïque a logiquement été avancée pour expliquer l'induction de la différenciation des promyélocytes et le traitement de la maladie faisant de la LAP un modèle de maladie traitée par thérapie de différenciation. Cependant, ce modèle n'explique pas pourquoi l'acide rétinoïque doit être utilisé en combinaison avec des chimiothérapies pour être efficace (Degos et al., 1995) ni pourquoi d'autres rétinoïdes, induisant une différenciation des cellules promyélocytaires équivalente à celle de l'ATRA n'induisent pas une perte de clonogénicité des cellules LAP (Ablain et al., 2013).

#### 4.1.3.2. La thérapie par dégradation

En comparaison, l'ATO seul induit une rémission chez 70% des patients (Mathews et al., 2010). Ce traitement ne cause que de faibles changements transcriptionnels chez les cellules LAP (Shao et al., 1998; Zheng et al., 2005). L'ATO ne permet donc pas la guérison de la LAP par une induction de la différenciation des cellules leucémiques, comme suggéré pour le traitement à l'acide rétinoïque.

Il a depuis été démontré que l'ATO cible directement la partie PML de PML-RAR $\alpha$  et induit la reformation des CNP (Lallemand-Breitenbach et al., 1999; Zhu et al., 1997) accompagnée de l'hyper-SUMOylation de la protéine oncogénique (Lallemand-Breitenbach et al., 2008). L'ubiquitine E3 ligase activée par SUMO, RNF4, responsable de l'ubiquitination de PML et de la dégradation du PML SUMO-ubiquitylé par le protéasome est alors recrutée aux CNP (Geoffroy

et al., 2010; Tatham et al., 2008). L'hyperSUMOylation de la partie PML de PML-RAR $\alpha$  par l'ATO va ainsi entraîner la dégradation par le protéasome de la protéine oncogénique (Figure 19).

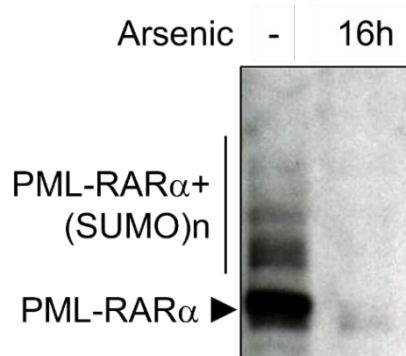


Figure 19 : L'arsenic induit la dégradation de l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  (adapté de Jeanne et al., 2010).

Analyse par Western blot de la dégradation de PML-RAR $\alpha$  en réponse à 16h de traitement à l'arsenic dans un modèle de fibroblastes embryonnaires transformés de souris.

Il a également été démontré que l'acide rétinoïque induit la dégradation de PML-RAR $\alpha$ , en ciblant sa moitié RAR $\alpha$ , expliquant son effet thérapeutique dans l'APL (Nervi et al., 1998; Raelson et al., 1996; Zhu et al., 1999). Cet effet est détectable en réponse à un traitement prolongé à l'acide rétinoïque ou en utilisant un acide rétinoïque encapsulé dans des liposomes, qui permettent de délivrer des quantités plus importantes de drogue à l'intérieur des cellules leucémiques (Estey et al., 1999; Tsimberidou et al., 2006; Zhu et al., 2005).

La dégradation de la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  et la reformation de corps nucléaires fonctionnels à partir de l'allèle non muté entraînent l'activation de la voie p53, une perte de l'auto-renouvellement des cellules souches initiatrices de leucémie, ou leur sénescence, conduisant à la guérison complète de la LAP (Ablain et al., 2014; Jeanne et al., 2010; Lallemand-Breitenbach et al., 2008) (Figure 20).

L'action combinée de l'ATO et de l'acide rétinoïque permet ainsi la guérison sans rechute de 95% des patients (de Thé et al., 2017). Malgré l'efficacité de cette combinaison dans l'éradication de la leucémie, certains patients subissent des effets indésirables causés par la toxicité intrinsèque de l'ATO (Zhang, 2017). Le développement de nouvelles molécules permettant

d'induire la dégradation de la protéine oncogénique mais présentant une toxicité moindre est nécessaire pour améliorer la qualité de vie des patients durant leur traitement.

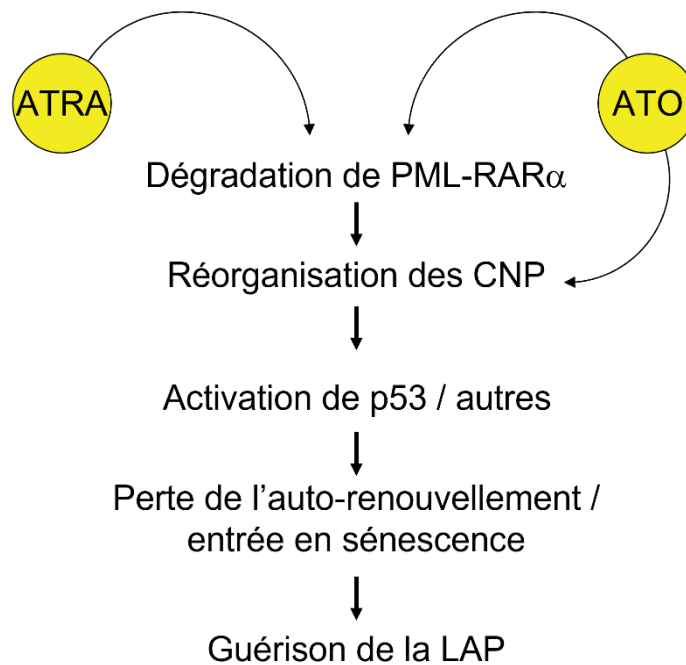


Figure 20 : Effet moléculaire de la combinaison ATRA / arsenic (ATO) dans la guérison de la LAP initiée par la dégradation de l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  (adapté de de Thé et al., 2017).

## 4.2. PML, une cible thérapeutique au-delà de la LAP

### 4.2.1. Implications de PML dans d'autres cancers

La multitude de fonctions biologiques associées à PML et son implication dans la LAP ont soulevé la question du rôle de cette protéine dans les autres types de cancers. Comme exposé précédemment, dès la première publication sur le modèle de souris *Pml*<sup>KO</sup>, l'étude de la tumorigenèse induite par l'exposition à des carcinogènes a démontré le rôle protecteur de PML dans le développement des tumeurs (Wang et al., 1998). L'expression de la protéine PML est fréquemment perdue chez l'Homme dans des cancers d'origines histologiques variées et cette perte est associée à un stade élevé de tumorigenèse et une plus grande progression du cancer (Gurrieri et al., 2004). Ainsi, l'expression de la protéine PML est abolie dans des lignées tumorales dérivées d'adénocarcinomes de la prostate, du colon, de carcinomes du sein et du poumon, de

lymphomes, de tumeurs du système nerveux central (médulloblastomes et tumeurs oligodendrogiales) et tumeurs de la lignée germinale et lymphomes non hodgkiniens. D'autres études ont démontré une diminution de l'expression de PML dans les carcinomes du sein, les cancers gastriques, les carcinomes du poumon à petite cellules, cancers de la peau et les tumeurs épithéliales invasives (Hsu and Kao, 2018). Cependant, bien que les niveaux d'expression de PML soient réduits dans une grande variété de cancers, l'ARNm de PML est toujours exprimé dans les tumeurs, est rarement muté et n'est pas sujet à l'hétérozygotie, suggérant que PML puisse être dégradée par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles (Gurrieri et al., 2004).

De manière contre-intuitive, PML a été décrite comme jouant un rôle pro-tumoral dans certaines études du fait de son implication dans l'auto-renouvellement des cellules souches et la régulation du métabolisme énergétique. Initialement, l'étude de la leucémie chronique myéloïde (une maladie affectant les cellules souches hématopoïétiques) a permis de démontrer que PML est hautement exprimée dans les cellules initiatrices de leucémie et est indispensable pour leur maintien (Ito et al., 2008). PML exerce ce maintien en diminuant l'activité de la voie mTOR, en induisant l'expression de PPAR $\delta$  et en augmentant le métabolisme des acides gras, permettant la division asymétrique des cellules souches (Ito et al., 2012). Un mécanisme similaire a été décrit dans les cancers du sein et de l'ovaire. Dans le cancer du sein triple négatifs, PML induit la désacétylation de PGC1 $\alpha$ , augmentant son activité transcriptionnelle sur les gènes cibles du métabolisme énergétique comme la famille PPAR, et induit la voie Myc, permettant le maintien des cellules initiatrices du cancer (Arreal et al., 2020; Carracedo et al., 2012; Martín-Martín et al., 2016). De la même manière, dans le cancer de l'ovaire, une sous-population de cellules cancéreuses présentent un métabolisme des acides gras très actifs, induit par la désacétylation de PGC1 $\alpha$  par PML (Gentric et al., 2019).

Ces études mettent en avant une dualité dans l'action de PML dans les cancers. D'une part la protéine agit comme un suppresseur de tumeur classique, d'autre part elle facilite leur survie et leur développement. Cela pourrait suggérer que les cellules cancéreuses altèrent l'expression de la protéine ou la formation des corps nucléaires dans la plupart des cas *via* des mécanismes de

régulation post-traductionnels mais qu'elles conservent PML au niveau génomique afin de pouvoir profiter de ses effets pro-survie et pro-auto-renouvellement dans des contextes spécifiques.

#### 4.2.2. *Autres stratégies anticancéreuses ciblant PML*

En plus du traitement de la LAP, plusieurs stratégies ciblant PML ont démontré leur efficacité dans le traitement anti-cancéreux.

La première stratégie vise à induire la formation des corps nucléaires PML pour exacerber leurs fonctions suppressives de tumeurs. Dans les leucémies aiguës myéloïdes présentant des mutations de NPM1c, le traitement à l'acide rétinoïque permet d'améliorer le pronostic des patients en stabilisant PML *via* l'inhibition de l'isomérase Pin1 (Hleihel et al., 2021; Schlenk et al., 2009). PML induit alors l'activation de la voie p53, favorisant la réponse aux chimiothérapies. Dans le même modèle, le traitement à l'actinomycine D induit une augmentation de la production d'espèces réactives à l'oxygène à partir de la mitochondrie, induisant la formation des corps nucléaires et la sénescence médiée par p53 (Wu et al., 2021).

Dans un modèle murin de glioblastome, l'induction de l'expression de PML par l'interféron permet d'améliorer les effets anti-cancéreux du témozolomide en activant une voie d'apoptose médiée par p73 (un homologue de p53) et YAP (Okazaki et al., 2012).

Le traitement utilisant une combinaison d'interféron et d'ATO, induisant l'expression de PML et la formation des corps nucléaires, dans la leucémie de l'adulte à cellule T permet de dégrader la protéine oncogénique TAX par la voie SUMO-ubiquitine et permet d'améliorer le pronostic des patients lorsqu'il est utilisé en consolidation de la chimiothérapie classique (Dassouki et al., 2015; Marçais et al., 2020). Dans les néoplasies myéloprolifératives présentant une mutation de *JAK2<sup>V617F</sup>*, cette combinaison induit un arrêt de croissance des progéniteurs hématopoïétiques issus d'un modèle murin ou de patients et permet d'éradiquer la plupart des cellules initiatrices de la maladie dans un modèle murin en induisant leur sénescence (Dagher et al., 2021).

La deuxième stratégie vise à diminuer la quantité de PML afin d'inhiber la croissance des cellules souches cancéreuses dépendantes de PML. Dans un modèle de xéno greffe utilisant des tumeurs dérivées de cellules souches de gliomes, le traitement à l'ATO induit la dégradation de PML, qui déclenche une diminution de la quantité de c-Myc et inhibe la croissance tumorale (Zhou et al., 2015). La dégradation de PML induite par l'ATO provoque une réponse similaire dans un modèle murin de cancer du sein triple négatif, permettant une élimination des cellules initiatrices du cancer et l'induction de la sénescence médiée par p27 (Arreal et al., 2020).

La compréhension des mécanismes de formation des CNP pourrait permettre de mettre au point des stratégies thérapeutiques spécifiques à PML visant à stabiliser la protéine et/ou forçant la formation des CNP ou au contraire induisant spécifiquement sa dégradation.

#### **4.2.3. PML et maladies neurodégénératives**

L'expression de PML dans le cerveau n'est pas encore totalement élucidée. PML est exprimée lors des phases de développement précoce du cerveau dans les cellules gliales matures ainsi que dans les neurones et les souris *Pml<sup>KO</sup>* ont une paroi corticale plus fine (Regad et al., 2009). Des tests comportementaux, ont mis en évidence que les souris déficientes en PML présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémoire spatiale ainsi qu'une anxiété diminuée (Butler et al., 2013). PML est également impliquée dans la régulation du rythme circadien en contrôlant la localisation nucléaire et la stabilité de la protéine PER2 qui induit l'expression des gènes de l'horloge circadienne (Miki et al., 2012). Enfin, la protéine ARC qui est cruciale pour la régulation de la plasticité synaptique et la mémoire est recrutée aux CNP et PML est requise pour son activité de régulation de la transcription des gènes impliqués dans la plasticité neuronale (Bloomer et al., 2007; Korb et al., 2013).

PML a été particulièrement impliquée dans la dégradation de protéines mal conformées à extension de poly-glutamines. Ces maladies sont causées par des expansions de triplets CAG sur l'ADN qui codent pour une extension de glutamines sur des protéines spécifiques. Les protéines présentant une extension de glutamines sont mal conformées et forment des dépôts de type amyloïde dans le système nerveux central. Dans l'ataxie spinocérébelleuse, l'expression de PML

est augmentée dans les neurones présentant des agrégats d'ataxine à extension de glutamines (Chort et al., 2013; Takahashi et al., 2003). Dans un modèle murin d'ataxie spinocérébelleuse causée par l'ataxine 7, le traitement à l'interféron  $\beta$  induit l'expression de PML, la formation des corps nucléaires et la dégradation de l'ataxine 7 mutante, améliorant les résultats des animaux aux tests de comportement (Chort et al., 2013). A l'inverse, la désorganisation des CNP induite par du cadmium conduit à l'agrégation de l'ataxine 7 (Janer et al., 2006). De la même manière, dans un modèle murin exprimant l'ataxine 1 avec extension de poly-glutamines, la déficience en PML exacerbe la formation d'agrégats protéiques et l'apparition de la maladie (Guo et al., 2014). Les CNP peuvent colocaliser avec les agrégats de protéines mal conformées et induire leur SUMO-Ubiquitination puis leur dégradation par le protéasome (Chort et al., 2013; Guo et al., 2014; Janer et al., 2006; Marinello et al., 2019). Les CNP pourraient également dégrader par le même mécanisme d'autres protéines mal conformées comme l'huntingtine, le TDP-43 ou les produits défectueux du ribosome (Guo et al., 2014; Mediani et al., 2019). Ici encore, le développement de molécules permettant l'induction de la formation des CNP présenterait un intérêt thérapeutique.



## 5. L'arsenic

### 5.1. L'arsenic, la plus vieille drogue du monde

L'arsenic (numéro atomique : 33, masse atomique : 75u) appartient à la classe des métalloïdes. Dans la nature, il existe sous forme organique liée covalamment à des atomes de carbone, ou sous formes inorganiques dont les trois formes principales sont : l'arsenic rouge  $As_4S_4$ , également appelé « Realgar », l'arsenic jaune  $As_2S_3$ , également appelé orpiment et l'arsenic blanc  $As_2O_3$  également appelé trioxyde d'arsenic (Figure 21).

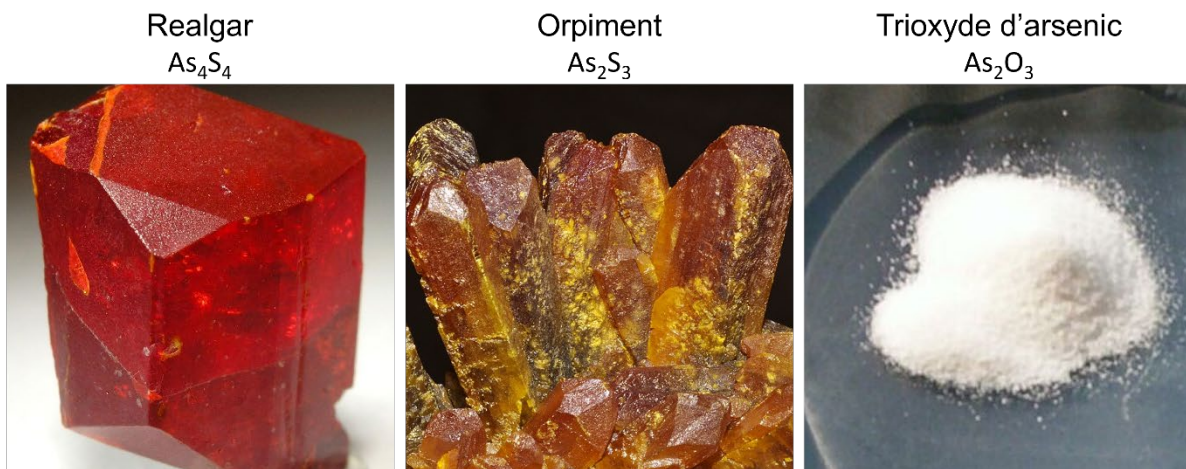


Figure 21 : Différentes formes naturelles d'arsenic

Le nom arsenic provient du grec « arsenikon » qui peut se traduire par « puissant ». Les premières traces écrites faisant mention de son utilisation à des fins médicales sont attribuées à Hippocrate (460-370 av. J.C.) qui rapporte l'utilisation de Realgar pour traiter les ulcères. Les sources relatent l'utilisation d'arsenic à des fins médicales dans les civilisations antiques grecques, romaines, arabes, chinoises et indiennes.

Incolore, inodore et insipide une fois en solution, l'arsenic a également été utilisé dès sa découverte comme poison, provoquant l'apparition de symptômes retrouvés dans des maladies communes comme des nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales, arythmies cardiaques ou encore des gonflements cutanés. Du fait de son utilisation à des fins d'élévation sociales ou politiques du moyen-âge jusqu'au XIXe siècle, l'arsenic sera même désigné sous le

nom de « poudre de succession ». Enfin, sa mention dans des œuvres de fiction comme celles d'Agatha Christie ou de Gustave Flaubert ancreront sa funeste réputation dans l'inconscient collectif.

L'entrée de l'arsenic dans la médecine moderne peut être attribuée à Thomas Fowler dont la solution éponyme contenant 1% d'arsénite de potassium a été largement utilisée au XIXe siècle pour traiter une large variété de maladies incluant l'asthme, la chorée, l'eczéma, le psoriasis, les rhumatismes, la tuberculose ou encore les ulcères. L'arsenic sera ensuite utilisé pour ses propriétés antimicrobiennes pour traiter des maladies infectieuses comme la trypanosomiase africaine (ou maladie du sommeil), la malaria ou la syphilis. L'utilisation de la solution de Fowler pour le traitement des leucémies a été rapportée à deux reprises, une première fois par le docteur allemand Berl Klin Wochenschr dès 1865 et une seconde fois par Forkner et Scott en 1931 au Boston City Hospital dans le cadre du traitement des leucémies myéloïdes chroniques. L'arsenic et l'irradiation resteront les formes principales de traitement des leucémies chroniques myéloïdes jusqu'à l'arrivée de l'agent alkylant Busulfan en 1953.

## *5.2. La réintégration de l'arsenic dans la médecine moderne*

Dans les années 1970, un groupe de l'université de médecine de Harbin au nord-est de la Chine a étudié l'effet thérapeutique d'injections en intraveineuse d'Ailin1, également appelé « 713 » – un mélange de trioxyde d'arsenic ( $As_2O_3$ ) et de faibles quantités de mercure - sur des patients présentant différents cancers. Deux tiers des patients atteints de LAP sont entrés en rémission grâce à ce traitement avec un taux de survie à 10 ans de 30%. Zhang et ses collaborateurs proposeront que l'ATO soit le seul agent thérapeutique de l'Ailin1, le mercure présentant une haute toxicité rénale (Zhang T D, Rong F X., 1979; Sun HDML, Hu XC, Zhang TD., 1992; Zhang, P. et al., 1996). Des essais cliniques avec de l'ATO pur, conduits en collaboration entre l'université de médecine de Harbin et l'université de médecine de Shanghai confirmeront l'efficacité de ce traitement chez des patients LAP présentant des rechutes après un traitement à l'acide rétinoïque accompagné d'une chimiothérapie (Chen et al., 1996; Shao et al., 1998). Une

collaboration franco-chinoise entre le Pr. Hugues de Thé et le Pr. Chen Zhu de l'université de médecine de Shangaï permettront ensuite de montrer que l'ATO provoque la dégradation de PML-RAR $\alpha$  (Zhu et al., 1997) (Figure 22). A la suite de ces découvertes, l'utilisation de l'ATO en combinaison avec l'ATRA sera préconisée à travers le monde pour le traitement de la LAP.

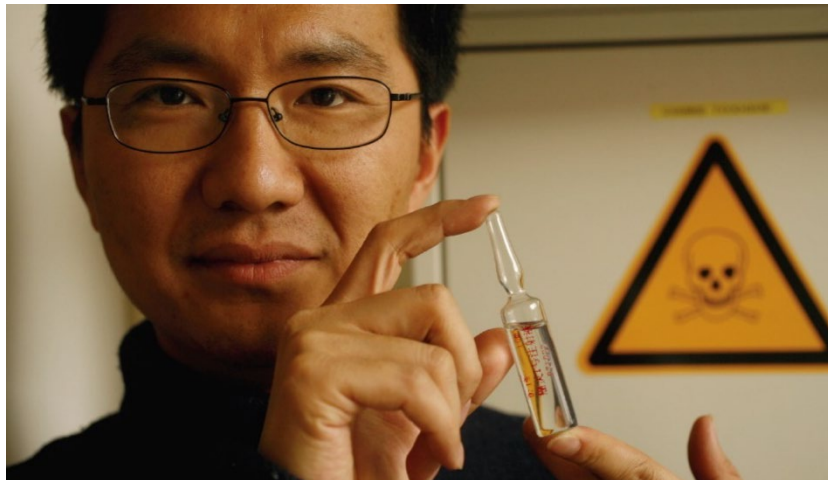


Figure 22 : Le Dr. Jun Zhu arrivant en France avec les premières ampoules de trioxyde d'arsenic en 1995

## 5.3. Mécanismes d'action de l'arsenic

### 5.3.1. Oxydation induite par l'arsenic

La reformation des corps nucléaires et la dégradation de PML-RAR $\alpha$  a été rapportée à des doses de l'ordre du nano-molaire, mettant en évidence l'extrême sensibilité de PML pour cette drogue (Chen et al., 1997; Sides et al., 2011; Zhu et al., 1997). Il a été proposé que le mécanisme d'action de l'ATO sur PML soit lié à deux phénomènes : la production de ROS induite par l'ATO et sa liaison aux groupements thiols des résidus cystéines.

L'ATO a la capacité d'induire la production de ROS par plusieurs mécanismes : à partir de sa toxicité pour la mitochondrie qui induit des dysfonctionnements de la chaîne de respiration mitochondriale, en se liant directement au niveau des sites actifs à thiols des protéines antioxydantes ou par la production de formes d'arsenic méthylées au fort pouvoir oxydant lors de sa métabolisation au niveau du foie (Islam et al., 2015).

Comme exposé précédemment (partie 2.2.1) PML est une protéine sensible à l'oxydation et le stress oxydant induit la formation des CNP (Niwa-Kawakita et al., 2017; Sahin et al., 2014). Brièvement, *ex vivo*, l'ATO tout comme des oxydants induisent la multimérisation de PML et PML-RAR $\alpha$  reliés pas des ponts disulfures (Jeanne et al., 2010). Dans la leucémie aiguë promyélocytaire, le paraquat, comme l'ATO, induit la dégradation de PML-RAR $\alpha$  et permet d'induire la mort des cellules leucémiques (Jeanne et al., 2010). De plus, des traitements avec des anthracyclines, induisant du stress oxydant, permettent d'améliorer le pronostic des patients lorsqu'il est utilisé en combinaison avec l'ATRA, en comparaison à l'ATRA seul (Tallman et al., 2002). L'oxydation de PML induite par l'ATO pourrait donc contribuer à ses effets thérapeutiques.

### 5.3.2. *La liaison de l'arsenic*

L'arsenic a également la capacité d'interagir directement avec les protéines du fait de sa forte affinité pour les groupements sulfhydriles des cystéines. Sa liaison sur les protéines a été particulièrement étudiée chez les bactéries où l'arsenic provenant de l'environnement est reconnu par des protéines spécialisées, qui sont composées d'hélices  $\alpha$  et lient l'arsenic, d'autres métalloïdes et des métaux lourds au niveau de cystéines hautement réactives. Les protéines périplasmiques AioX (arsenite oxydases) et leurs orthologues sont les premiers effecteurs d'un système de signalisation dont le rôle est de réguler l'expression d'enzymes de métabolisation de l'arsenic. Ces protéines lient l'arsenic au moyen d'un résidu cystéine unique en position 106. La liaison de l'arsenic à ce résidu induit un changement de conformation de la protéine ce qui pourrait être lié à son activation (Badilla et al., 2018; Liu et al., 2012). La liaison de l'arsenic sur un résidu cystéine unique suggère la formation de multimères coordonnés par la liaison de ce métalloïde.

Dans le système de défense bactérien codé par l'opéron *ars*, l'arsenic se lie au répresseur homo-dimérique ArsR sur trois résidus cystéines répartis sur les deux sous-unités du complexe (Ordóñez et al., 2008) (Figure 23). Cela induit un changement de conformation de la protéine ArsR qui se détache de son site de liaison à l'ADN, permettant d'induire l'expression des protéines impliquées dans la détoxification aux métalloïdes et aux métaux lourds (Ordóñez et al., 2008; Rawle et al., 2021).

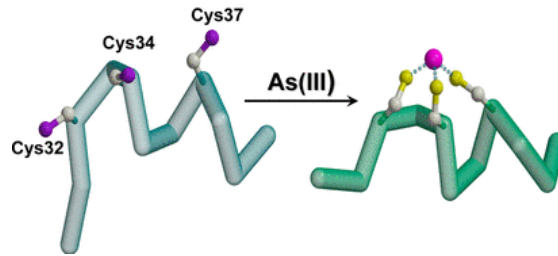


Figure 23 : Modèle de liaison de l'arsenic sur les protéines codées par le répresseur bactérien ArsR (adapté de Shen et al., 2013).

*La fixation de l'arsenic sur cette protéine induit un changement de conformation du répresseur. Le trioxyde d'arsenic se lie sur les Cys32, 34 et 37 et débobine l'hélice  $\alpha$ , induisant une perte de la liaison du répresseur sur l'ADN et l'expression des gènes de résistance à l'arsenic. Les groupements thiols des cystéines sont orientés de manière à ce que la liaison de l'arsenic ne puisse s'effectuer qu'en induisant un débobinage de l'hélice  $\alpha$ .*

L'oxydation de PML ne peut à elle seule récapituler l'effet thérapeutique de l'arsenic dans la LAP. En effet, l'effet combiné de l'ATRA + ATO permet d'obtenir chez les patients un meilleur taux de survie et un plus grand nombre de rémissions sans rechutes que l'ATRA + chimiothérapies (Lo-Coco et al., 2013; Ma et al., 2016; Powell et al., 2010; Torcka et al., 2016; H.-H. Zhu et al., 2019). De plus, des dérivés mono ou di-méthylés de l'arsenic, au fort pouvoir oxydant n'ont pas d'effet sur la formation des CNP et la dégradation de PML-RAR $\alpha$  (Wang et al., 2015). Enfin, des mutations ponctuelles au sein d'une courte séquence de la boîte B2 de PML induisent une résistance des patients LAP à la thérapie par l'ATO (de Thé et al., 2017). La liaison de l'arsenic sur PML pourrait expliquer ces observations.

La protéine PML lie l'arsenic puisque les CNP sont identifiables lors d'un marquage des cellules avec de l'arsenic fluorescent, qui ne fluoresce qu'une fois lié aux cystéines des protéines (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2010). Cette molécule s'accumule majoritairement à la coque du CNP (Jeanne et al., 2010). Chez l'Homme, un crible à haut débit utilisant de l'arsenic-biotine a

démonstré que 360 protéines lient l'arsenic. Une grande partie des candidats identifiés étaient des protéines présentant des domaines liant le zinc et présentant trois résidus cystéines proches les uns des autres (Zhang et al., 2015). Parmi toutes les protéines identifiées, PML était l'une des plus abondantes. L'équipe a montré que des mutations des acides aminés C212 et C213 de la boîte B2 abolissent la liaison de l'arsenic fluorescent sur PML et induisent une perte de la sensibilité de progéniteurs hématopoïétiques transformés par PML-RAR $\alpha$  pour cette drogue (Jeanne et al., 2010). Cette étude et les mutations retrouvées chez les patients LAP résistants à l'ATO – qui sont situées autour de ces résidus - suggèrent un rôle central de la séquence autour des acides aminés C212 et C213 dans la liaison directe de l'arsenic sur PML, responsable de ses effets thérapeutiques.

La compréhension du rôle de l'oxydation sur la formation des CNP et la compréhension du mode de liaison de l'arsenic sur PML permettront d'élucider leurs mécanismes d'assemblage en réponse à cette drogue ainsi que les effets thérapeutiques qui en découlent.

# Questions biologiques et problématique

Les CNP sont des structures *core-shell* et PML s'auto-assemble de façon dynamique pour former la coque structurante des CNP. PML est requis pour l'association au cœur de ces structures de protéines partenaires, dont certaines enzymes de modification, contrôlant en particulier leur SUMOylation. Cette dernière a été impliquée dans la formation de condensats de protéines par séparation de phase liquide-liquide *in vitro*. Pourtant PML peut s'assembler en CNP en absence de SUMOylation et sans partenaires associés. PML est également impliquée dans de nombreuses pathologies, en particulier la leucémie aiguë promyélocytaire dans laquelle les CNP sont désorganisés. Leur reformation en réponse à de faibles doses d'ATO permet la guérison des patients en induisant la dégradation de l'oncoprotéine de fusion PML-RAR $\alpha$  et la perte de l'auto-renouvellement des cellules leucémiques. Dans des cellules non-LAP, l'ATO change également l'équilibre des protéines PML entre fraction diffuse et fraction assemblée en CNP, augmentant la formation des CNP. Cette molécule a un double mécanisme d'action, de par son affinité pour les thiols des cystéines : il induit un stress oxydant et se lie à PML.

Avant mon arrivée, le laboratoire avait mis en évidence que le stress oxydant induisait la formation d'homo-multimères de PML, covalamment reliés par des ponts disulfures intermoléculaires (Jeanne et al., 2010; Sahin et al., 2014). Ces ponts disulfures intermoléculaires pourraient constituer la première étape de la formation des CNP et divers oxydants pourraient induire leur formation par ce mécanisme.

Une étude publiée et des résultats préliminaires de l'équipe suggéraient un rôle central de la boîte B2 de PML dans la formation de ces ponts disulfures ainsi que la liaison de l'arsenic sur cette protéine (Jeanne et al., 2010). A l'inverse un autre groupe avait montré une liaison de l'arsenic au RING finger de PML, en remplacement du zinc (Zhang et al., 2010). Le domaine B2 de PML contient un doublé de cystéines en positions 212-213, dont l'une des cystéines doit être libre car elle ne coordonne pas le zinc. La séquence entourant ces résidus est retrouvée mutée chez les patients LAP résistants à l'arsenic, suggérant son rôle clé dans la réponse au traitement.

Mon projet de thèse a porté sur la compréhension des mécanismes d'assemblage des CNP dans les conditions basales et en réponse à l'arsenic. Il s'est articulé autour de trois axes :

*1- Comprendre les mécanismes contrôlant l'assemblage dynamique de PML aux CNP en conditions basales.*

La première partie de mon projet a consisté à déterminer si les CNP s'assemblent en suivant un processus de LLPS. Je me suis particulièrement intéressé au rôle de la boîte B2 de PML dans ce mécanisme. Nous avons établi une collaboration internationale avec l'équipe du Dr. Naranmandura de l'université de Hangzhou, spécialisée en biologie structurale, afin de déterminer la structure tridimensionnelle du domaine B2. J'ai alors étudié l'effet de mutations ponctuelles des différents acides aminés de la boîte B2 et mené une étude comparative pour comprendre leur rôle dans la dynamique d'assemblage des CNP.

*2- Elucider les mécanismes d'action de l'arsenic ciblé sur PML, responsable de son effet thérapeutique dans la LAP.*

Afin de déterminer le rôle de la boîte B2 dans le mécanisme d'action ciblé de l'ATO sur l'assemblage des CNP, j'ai cherché à identifier précisément les cystéines ciblées, le rôle des ponts disulfures intermoléculaires et de la liaison directe de l'arsenic et enfin à étudier les aspects dynamiques de l'assemblage, en exploitant la structure 3D du domaine B2. Dans le contexte de la LAP, j'ai cherché à déterminer le rôle de la boîte B2 de PML et des cystéines clés dans la formation de microdots PML/RAR $\alpha$ , la désorganisation des CNP endogènes et enfin dans l'effet de l'arsenic sur la perte de l'auto-renouvellement des cellules progénitrices hématopoïétiques transformées.

*3. Comprendre le lien entre dynamique, structure et fonction des CNP par bio-ingénierie*

En collaboration avec l'équipe du Dr. Zohar Gueroui du laboratoire P.A.S.T.E.U.R. à l'ENS, nous avons cherché à construire des corps PML artificiels *in cellulo* qui seraient contrôlables par LLPS avec des dynamiques différentes, que l'on pourrait désassembler à façon. Grâce à ces corps artificiels notre ambition était d'interroger l'assemblage core-shell ainsi que des liens entre dynamique et l'activité de SUMOylation.



# Résultats

## **Résultats principaux**

Arsenic ties PML B2-box trimer to switch Nuclear Body assembly dynamics and trigger anti-leukemia response (Article en préparation)

## Résumé

### *L'arsenic lie le trimère de la boîte B2 de PML pour changer la dynamique de l'assemblage des corps nucléaires et déclencher une réponse anti-leucémique*

La protéine PML (ProMyelocytic Leukemia) structure des organelles sans membranes sensibles au stress nommés corps nucléaires PML (CNP). Les CNP recrutent de nombreuses protéines partenaires et contrôlent leurs modifications post-traductionnelles, en particulier leur SUMOylation. Dans la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), l'oncoprotéine chimérique PML-RAR $\alpha$  désorganise les CNP. Le trioxyde d'arsenic a la capacité de se lier sur PML et induit la dégradation de PML-RAR $\alpha$  et la reformation des CNP, permettant la guérison des patients dans 70% des cas. Dans d'autres cancers, la liaison de l'arsenic à une protéine PML normale permet aussi des effets anticancéreux liés à l'induction de la formation des CNP. Cependant, le mécanisme par lequel la liaison de l'arsenic sur PML provoque cet assemblage demeure inconnu. Nous avons donc cherché à identifier les mécanismes régulant l'assemblage des CNP dans les conditions normales et en réponse à l'arsenic.

Nous avons utilisé des lignées de fibroblastes embryonnaires de souris *Pml*<sup>KO</sup> exprimant de façon stable une protéine PML fluorescente, permettant l'étude de la dynamique de la protéine aux CNP en cellules vivantes. Nos résultats indiquent que les CNP présentent des caractéristiques d'organelles sans membranes s'assemblant par séparation de phase liquide-liquide : sphéricité, assemblage dépendant de la concentration, capacité à fusionner - avec une estimation de la visco-élasticité proche de celle d'autres organelles sans membranes formées par LLPS comme le nucléole -, et un échange dynamique des protéines PML. Pourtant, la dynamique d'échange de PML aux CNP est lente comparée à d'autres corps nucléaires, ce qui signe une affinité forte des protéines PML entre elles et surtout un tiers des protéines PML aux corps sont immobiles. De plus, la structuration en core-shell est fixe et n'est pas celle d'une gouttelette dans une gouttelette. De façon significative, La liaison de l'arsenic sur PML induit une transition de phase vers une structure moins dynamique de type gel (Figure 1). A l'inverse, la fusion à RAR $\alpha$

dans la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  rend la dynamique d'assemblage plus rapide et induit sa distribution sous la forme de microdots très nombreux, qu'un traitement des cellules à l'arsenic transforme également en corps de types gel.

L'arsenic ayant une action double sur les protéines (liaison directe sur les résidus cystéines et production de ROS), nous nous sommes intéressés au rôle de l'oxydation de PML dans la formation des CNP. Nous avons identifié deux résidus cystéines libres, les cystéines C213 et C389, comme responsables de la formation de ponts disulfures intermoléculaires sur PML, en particulier dans les cellules soumises au stress oxydant induit par l'arsenic ou l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En comparant les effets de l'arsenic à ceux de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en étudiant la distribution nucléaire du mutant PML C389S, nous avons montré que ces ponts disulfures intermoléculaires ne sont pas impliqués dans la formation des CNP. Nos résultats pointent plutôt vers un rôle de la C213 portée par la boîte B2 de PML dans ce mécanisme (Figure 2).

La boîte B2 de PML est un domaine liant le zinc dont une courte séquence forme un *hotspot* de mutations chez des patients LAP résistants à la thérapie par l'arsenic. Cette séquence est très conservée dans l'évolution et est spécifique à PML en comparaison à d'autres protéines de la même famille. Nous avons déterminé la structure tridimensionnelle de ce domaine qui se replie autour de 2 atomes de zinc selon une structure typique de doigt de zinc B2. De façon remarquable la séquence conservée forme une courte hélice  $\alpha$  qui expose à son extrémité la C213 vers l'extérieur (Figure 3). Nous avons mené une étude comparative de la dynamique d'assemblage des CNP par des protéines présentant des mutations sur la boîte B2. La structure en doigt de zinc est nécessaire pour positionner correctement l'hélice. Cependant un défaut de l'hélice alpha ou de la C213, qui n'impacte pas la structure, conduit à la formation d'un unique corps très liquide, démontrant le rôle clé de cette séquence dans le contrôle de la dynamique d'assemblage caractéristique des CNP (Figure 4).

Puisque l'arsenic utilisé en clinique est trivalent, nous avons émis l'hypothèse que le site de liaison de l'arsenic sur PML puisse nécessiter l'assemblage trimérique de la boîte B2. Des résultats *in silico* confirmés expérimentalement *in vitro* et *in cellulo* démontrent que ce domaine peut former des homo-trimères coordonnés par des interactions faibles entre les hélices  $\alpha$ , de

type hydrophobe. Ces liaisons hydrophobes contrôlent la dynamique d'assemblage des CNP. Les L217 centrales lient chaque monomère de B2 aux deux autres et leur mutation bloque totalement l'assemblage (Figure 5). De façon remarquable, la formation de ce trimère positionne trois résidus C213 au centre de la structure. L'arsenic vient se fixer sur cette triade de cystéines, transformant des interactions hydrophobes faibles en interactions covalentes, responsables de la transition de phase vers une structure de type gel et à l'origine de son effet sur la formation des CNP (Figure 6). Nous avons pu créer un mutant PML C213V qui restaure l'assemblage et la dynamique typique des CNP, mais qui est insensible à l'arsenic.

Dans le contexte de PML-RAR $\alpha$ , la perte de l'auto-renouvellement des cellules transformées par l'oncoprotéine PML-RAR $\alpha$  induite par l'arsenic dépend également de cette triade de cystéines (Figure 7).

Ces résultats mettent en évidence un mécanisme de stéréosélectivité de PML pour l'arsenic et le rôle clé de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 comme rhéostat de la dynamique d'assemblage des CNP selon l'état de la C213. Ainsi nous avons élucidé la première étape du mécanisme d'action ciblé de l'arsenic sur PML, ouvrant la voie au développement clinique de nouvelles molécules, basé sur la structure, pour activer la biogenèse des CNP.

1           **Arsenic ties PML B2-box trimer to switch Nuclear Body assembly**  
2                           **dynamics and trigger anti-leukemia response.**

3  
4 Pierre Bercier<sup>1,2</sup>, Qian Qian Wang<sup>3,4</sup>, Omar Ferhi<sup>1,2</sup>, Caroline Berthier<sup>1</sup>, Marie-Claude Geoffroy<sup>1,2</sup>,  
5 Majdouline Abou-Ghali<sup>1,2</sup>, Zoher Gueroui<sup>5</sup>, Chun Zhou<sup>3,6</sup>, Hua Naranmandura<sup>\*3,4</sup>, Hugues De  
6 Thé<sup>\*1,2</sup>, Valérie Lallemand-Breitenbach<sup>\*1,2</sup>

7  
8 <sup>1</sup>Center for Interdisciplinary Research in Biology, U1050, Nuclear Organization and Post-  
9 Translational Control in Physio-Pathology, Paris, France, <sup>2</sup>Saint-Louis Research Institute, U944,  
10 Genomes and Cell Biology of Diseases, Paris, France, <sup>3</sup>School of Medicine and Public Health,  
11 Zhejiang University, Department of Toxicology, Hangzhou, China, <sup>4</sup>College of Pharmaceutical  
12 Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, China, <sup>5</sup>École Normale Supérieure, Department of  
13 chemistry, Paris, France, <sup>6</sup>Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine,  
14 Hangzhou, China

15  
16 **Abstract**

17 Arsenic trioxide (ATO) alone cures 70% of patients with acute promyelocytic leukemia (APL). Its  
18 PML-RARA driver disorganizes PML Nuclear Bodies (NBs), while ATO allows its degradation and  
19 NB reformation, ultimately driving APL cures. Critically, in non-APL cells, arsenic binding onto  
20 normal PML also enforces NB formation and can exert anticancer effects. We show that PML NBs  
21 display liquid-like properties but become gel-like upon ATO exposure. We demonstrate that ATO  
22 targets the B2 Box, rather than the RING and elucidate B2 structure. In the later, an  $\alpha$ -helix allows  
23 assembly into trimer wherein three C213 residues converge to form an arsenic-binding pocket.  
24 Accordingly, C213 triad controls the dynamics of NB formation, on which covalent trivalent  
25 arsenic binding drives gel-like transition, PML or PML-RARA sumoylation, and loss of PML-RARA-  
26 driven self-renewal. We have thus identified C213 as an ATO-targeted rheostat that controls PML  
27 NB function, paving the way to structure-based activators of NB biogenesis as novel cancer drugs.

## 28 INTRODUCTION

29 ProMyelocytic Leukemia (PML) protein organizes the formation of stress-sensitive  
30 membrane-less organelles (MLO), the PML Nuclear Bodies (NBs). PML controls various biological  
31 functions, such as apoptosis, senescence, or stem cell self-renewal (Hsu and Kao, 2018;  
32 Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018). PML may elicit these functions by scaffolding the  
33 spherical shell of NBs, subsequently acting as hubs of post-translational modifications, in  
34 particular SUMOylation, for the large range of proteins trafficking through the inner core of PML  
35 NBs. PML NBs are disrupted in Acute Promyelocytic Leukemia (APL) driven by the PML-RARA  
36 oncogenic fusion protein, as well as in several other cancers in which PML protein amount  
37 dropped (de Thé et al., 2017; Gurrieri et al., 2004; Koken et al., 1995). The combination of arsenic  
38 trioxide (ATO) and retinoic acid treatments drives complete APL cure by enforcing both PML-RARA  
39 degradation and PML NB re-assembly, subsequently leading to the activation of a senescence  
40 program in APL cells (Ablain et al., 2014; de Thé et al., 2017; Lallemand-Breitenbach et al., 1999;  
41 Lo-Coco et al., 2013). ATO, which as single therapy cure 70% of APL patients, directly binds PML-  
42 RARA and non-rearranged PML proteins (Jeanne et al., 2010; Mathews et al., 2006). However, the  
43 mechanism of ATO-enforced NB assembly remains unsolved.

44 Biogenesis of MLO has been revisited through the prism of liquid-liquid phase separation  
45 (LLPS). Biomolecular condensates may arise by multivalent weak interactions between proteins,  
46 or proteins and RNAs, which demix from the surrounding media to form spherical structures,  
47 maintained as an equilibrium despite dynamic exchange of their components (Banani et al., 2017;  
48 Shin and Brangwynne, 2017). LLPS has been proposed to increase kinetics of biochemical  
49 reactions, and could have functional roles in diseases (Mann and Donnelly, 2021; Mehta and  
50 Zhang, 2022). In leukemia, chimeric transcription factors may condensate, resulting in aberrant  
51 3D chromatin structures and contributing to their aberrant transcriptional activity (Ahn et al.,  
52 2021; Chong et al., 2022). *In vitro*, chimeric GFP-polySUMO proteins condense in droplets through  
53 LLPS when combined with chimeric proteins containing repetitions of SUMO-Interacting motif  
54 (SIM) (Banani et al., 2016). Yet, PML sumoylation is dispensable for PML NB assembly (Barroso-  
55 Gomila et al., 2021; Sahin et al., 2014) and contribution of LLPS in PML NB assembly remains  
56 elusive.

57 In this study, focusing on the PML domain targeted by ATO, we elucidate the crystal  
58 structure of its B2-box (B2) and identify an  $\alpha$ -helix that mediates hydrophobic trimerization,  
59 controlling PML NB assembly and PML dynamics. We uncover that this  $\alpha$ -helix-mediated trimer  
60 clusters a triad of free C213 cysteines to which trivalent arsenic covalently docks, switching PML  
61 NBs from liquid-like to gel-like bodies. Critically, B2 trimer and C213 are mandatory for ATO-  
62 triggered loss of self-renewal of PML-RARA-transformed progenitors, uncovering the very first  
63 step by which ATO achieves its anti-leukemia cure.

64

## 65 RESULTS

### 66 PML NBs switch from liquid-like to gel-like structures upon ATO

67 PML NBs form spherical membrane-less organelles (Hoischen et al., 2018; Sahin et al.,  
68 2014), reminiscent of liquid-like condensates, although forming core-shell structures (Fig. 1A). To  
69 determine whether PML assembly in NBs is related to liquid-liquid phase separation (LLPS), we  
70 have generated *Pml knockout (KO)* mouse embryonic fibroblasts (MEFs) stably expressing GFP-  
71 PML and assessed other hallmarks of liquid-like MLO (solubility limit, fusion/relaxation, dynamic  
72 exchange). First, we looked whether PML could demix from the nucleoplasmic fraction above a  
73 concentration threshold by live cell imaging after cell transduction. PML was first homogeneously  
74 distributed in the nucleoplasm, then, as GFP-PML expression increased, the first PML NB  
75 appeared (Fig. 1B), becoming more numerous while the diffuse fraction remained constant  
76 (Supplementary Fig. S3A). Similarly, the number of PML NBs is increased with PML transcriptional  
77 activation upon IFN alpha treatment (Stadler et al., 1995; Tessier et al., 2022). These observations  
78 support that PML de-mixes from a diffuse nucleoplasmic fraction above a concentration  
79 threshold.

80 Second, live cell imaging revealed that two PML NBs can fuse and relax in a novel single  
81 spherical body, again supporting liquid-like behavior of PML NBs (Fig. 1C and Supplementary Fig.  
82 S1). The analysis of the relaxation curves, plotting the size of PML NBs as function of timescale,  
83 allowed extraction of the diffusion coefficient of PML proteins during fusion and a PML NB  
84 viscosity of  $10^3$  Pa.s (Brangwynne et al., 2009), a similar scale to the viscosity computed for the



85 nucleoli or nuclear speckles (Brangwynne et al., 2011; Kim et al., 2019). We then quantified the  
86 numbers of events within 1 hour leading to GFP-PML nucleation from the nucleoplasmic fraction,  
87 PML NB fusions or budding (Fig. 1D). The number of fusion events was similar to that of  
88 nucleation, maintaining a mean number of 40 PML NBs per nucleus, while fragmentation was rare  
89 or absent within this time frame.

90 Finally, we assessed the dynamics of PML NB assembly by Fluorescence Recovery After  
91 Photobleaching (FRAP). As expected, PML protein dynamically exchanges between the  
92 nucleoplasm and NBs, with a recovery  $t_{\text{half}}$  of 3.2 min (Fig. 1E) (Geoffroy et al., 2010; Jeanne et al.,  
93 2010; Weidtkamp-Peters et al., 2008). Taken together, these results show that PML NBs exhibit  
94 some hallmarks of liquid-liquid phase separated organelles. However, the residence time of PML  
95 at NBs is longer compared with other nuclear MLO, such as Cajal bodies, speckles or nucleoli  
96 (minute versus second ranges), indicating higher affinity order of PML interactions (knowing that,  
97 in our experiments, diffusion does not contribute to PML recovering at NBs, see methods).  
98 Moreover, 32% of the GFP-PML fluorescence bleached at NBs never recovers (Fig. 1E), suggesting  
99 two PML fractions at NBs, one exchanging with the surrounding nucleoplasm, while a third of the  
100 PML proteins remains immobile, and challenging a pure liquid-like dynamics of the PML proteins.

101 Both ATO treatment and PML fusion to RARA -in the oncogenic PML-RARA protein- alter  
102 the distribution of PML in the nucleus. Indeed, ATO rapidly increased PML NB fraction at the  
103 expense of the diffuse one, while GFP-PML-RARA localized into a high number of tiny dots with  
104 diameter below 100nm in *Pml* KO MEFs or in hematopoietic progenitors, as expected (Jeanne et  
105 al., 2010) (Fig. 1F). Upon ATO, PML NB assembly dynamics was dramatically dropped, and almost  
106 all PML was immobilized (Fig. 1E and Supplementary Fig. S3B). Live-cell imaging and super-  
107 resolution microscopy showed that PML NBs tend to aggregate with one another without  
108 achieving complete fusion, forming PML NB strings, consistent with an increase in the viscosity-  
109 elasticity (Fig. 1G and Supplementary Fig. S2). Thus, ATO triggers transition from liquid-like to gel-  
110 like PML NBs. Conversely, the dynamics of GFP-PML-RARA at the dispersed microdots was  
111 increased compared to PML at NBs, with a  $t_{\text{half}}$  of 1.37 min and no immobile fraction, in cells  
112 deficient for endogenous PML (Fig. 1H). Again, ATO treatment decreased drastically PML-RARA

113 exchange. Thus, PML assembly dynamics changes in opposite manner with oncogenic context  
114 versus ATO-therapy that leads to transition toward gel-like PML- or PML-RARA-driven NBs.

115

116 **PML NB assembly depends on a reactive C213 cysteine in the B2-box domain**  
117 **rather than di-sulfide bridges**

118 We wanted to explore the biochemical determinants of the PML NB dynamics and ATO-  
119 induced transition towards gel-like. Arsenic atom binds sulfur groups thus targeting cysteine  
120 residues in cells. Within PML, ATO has been proposed to directly target cysteines of the RING  
121 finger, in which arsenic would replace the structuring zinc atom, but also the B2 box (B2), another  
122 zinc-finger domain which contains a di-cysteine sequence (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2015,  
123 2010). In the latter, the C213 residue might not be involved in zinc coordination, according to  
124 homology with other TRIM proteins (Supplementary Fig. S4H) (Reymond, 2001). We assessed the  
125 role of free cysteines in NB formation by using N-ethyl-maleimide (NEM), a chemical that only  
126 alkylates reactive cysteines residues with a free -SH group. PML NB assembly were disrupted upon  
127 NEM, and pretreatment with NEM also blocked ATO effect on NB formation and *vice-versa* (Fig.  
128 2A). These observations, showing that the free cysteines required for base-line NB assembly are  
129 also those targeted by ATO, exclude the RING as the preferential ATO target site.

130 ATO exposure also induces ROS production due to GSH scavenging and mitochondrial  
131 poisoning (Echaniz-Laguna et al., 2012; Flora, 1999; Han et al., 2007). We have previously shown  
132 that disulfide bonds link PML monomers and favors its covalent multimerization upon oxidative  
133 stress (Jeanne et al., 2010). Thus, free cysteines could be involved either in direct arsenic binding  
134 or in disulfide bonds, and we wanted to disentangle their respective contribution in PML NB  
135 assembly. We focused on both C213 in B2 and C389, a residue reactive to oxidative modifications  
136 and engaged in disulfide link with a cysteine-containing oncoprotein in a myeloid leukemia  
137 subtype (Weerapana et al., 2010; Wu et al., 2021). PML intermolecular disulfide bonds can be  
138 assessed by Western blot analysis in non-reducing conditions, revealing, high molecular weight  
139 PML multimers that increased upon ATO or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MEFs, and lost under reducing conditions as  
140 expected (Fig. 2B) (Jeanne et al., 2010). C389S mutation impaired ATO-induced disulfides but did

141 not affect those increased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, while C213A decreased PML intermolecular bound species  
142 induced by both ATO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Only double C213A/C389S mutant completely abrogates the  
143 formation of these PML multimers, identifying these two residues as those responsible for PML  
144 intermolecular disulfide bonds upon oxidative stress (Fig. 2B). Subsequent to PML NB assembly,  
145 PML is sumoylated by the UBC9 SUMO-conjugating enzyme and ATO-induced gel-like NBs  
146 increases PML sumoylation (Fig. 2B) (Sahin et al., 2014; Tessier et al., 2022). Interestingly, PML  
147 C213A single and double mutants were defective for sumoylation, while PML C389 was not  
148 affected. We then assess the localization of wildtype (WT) or mutant PML upon those stress.  
149 Surprisingly, in contrast with ATO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has no effect on PML NBs, suggesting that intermolecular  
150 disulfides are not responsible for ATO-induced gel-like transition. Moreover, C213A or C389S  
151 mutations did not have the same effect on NB formation (Fig. 2C). While defective for ATO-  
152 induced disulfide, PML C389S is assembled in NBs with a diffuse fraction identical to PMLWT, and  
153 it was still ATO-sensitive. In contrast, PML C213A remained mainly diffuse, with a single enlarged  
154 body, fully resistant to ATO. Taken together, these results indicate that C213 is essential for PML  
155 NB assembly, but intermolecular disulfide bonds mediated by C213 and C389 are not, supporting  
156 C213 as the direct arsenic binding site.

157

### 158 **Crystal structure of PML B2 box unravels an $\alpha$ -helix ensuring C213 accessibility**

159 B-box domains are found exclusively in TRIM (TRI partite Motif) proteins and are generally  
160 involved in protein-protein interaction (Reymond, 2001). Based on the di-cysteine motif, we  
161 identified a short sequence highly conserved across evolution in proteins all displaying a typical B  
162 box consensus (Fig. 3A). Interestingly, the stretch of conserved residues corresponds to the  
163 hotspot of mutations on PML-RARA in ATO-resistant APL patients (Goto et al., 2011; Iaccarino et  
164 al., 2016; Lehmann-Che et al., 2014; Zhu et al., 2014).

165 Despite extensive trials, PML B2 crystal structure has never been resolved because the B2  
166 domain is highly unstable and prone to precipitation. Thus, we fused MBP to PML B2 to produce  
167 a soluble fusion protein from bacteria, and we managed to crystalize its structure at 2.1 Å  
168 resolution (Fig. 3B, Supplementary Fig. S4A). In this crystal, B2 domain adopted a typical B-box-

169 type zinc finger fold, where C3H1 residues coordinated two zinc atoms in a cross-braced  
170 conformation and with a conserved  $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 1$  arrangement (Figs. 3B-C). Most likely explaining  
171 the stability of the MBP-B2 box fusion structure and the success of its crystallization, B2 was  
172 sandwiched between two MBP molecules. Indeed, B2  $\beta 1$  formed an anti-parallel beta sheet with  
173 MBP  $\beta 8$  through main chain hydrogen bonds, while B2  $\alpha 1$  packed against a hydrophobic patch in  
174 the neighboring MBPs (Supplementary Figs. S4A-C). Structure alignment indicates that overall  
175 PML B2 is very similar to other TRIM family B2 domains, such as TRIM5 $\alpha$  or TRIM28, although  
176 PML B2 appears to be more flexible with longer loops (Supplementary Figs. S4D-G). Interestingly,  
177 in the first zinc finger, zinc coordination involved C212, but not C213 which points out of the  
178 overall B2 due to its positioning at the beginning of the  $\alpha$ -helix (Figs. 3B and C). Moreover, this  
179 helix was folded by the exact evolutionary conserved sequence from residues C213 to L218, which  
180 are specific for PML among TRIM B2 (Fig. 3A, 3C, Supplementary Fig. S4G). Thus, this hydrophobic  
181 helix with its accessible C213 may be important for PML NB assembly and ATO targeting. Note  
182 that, in the second zinc finger, the zinc was coordinated by C227 instead of the Alphafold-  
183 predicted D219 (Fig. 3C and Supplementary Figs. S4D-F). Indeed, C227 is not conserved in TRIM5 $\alpha$   
184 or TRIM28 B2, which display a histidine residue instead of the corresponding PML aspartate D219  
185 (Supplementary Figs. S4G). The residues equivalent to PML C227-containing sequence in TRIM5 $\alpha$   
186 and TRIM28 rather form a  $\beta 3$  strand -that does not coordinate zinc-, thus not present in our PML  
187 B2 structure (Supplementary Figs. S4D-H). Altogether, we have unraveled PML B2 structure,  
188 highlighting a hydrophobic helix that positions the free C213 key for NB assembly and ATO-  
189 targeting in an accessible manner.

190

### 191 **PML B2 $\alpha$ -helix and C213 drive NB assembly dynamics**

192 To determine the respective role of PML B2 zinc finger 1 and the C213-containing helix,  
193 we have performed either structural mutations disrupting zinc coordination (C189S or C212S) or  
194 a point mutation on the helix (L218G) and again stably expressed these GFP-tagged mutants in  
195 *Pml KO* MEFs. All PML mutants assemble between one and three enlarged bodies with an

196 increased nucleoplasmic fraction. This result suggests that  $\alpha$ -helix plays a role at least as  
197 important as B2 folding itself, and equivalent to C213 (Fig. 4A).

198 FRAP analysis showed a slight increase in the GFP-PML C189S and GFP-PML C212S body  
199 assembly dynamics compared to WT PML, and no effect on the immobile fraction (Figs. 4B and  
200 C). Strikingly, C213S or L218G mutations drastically increased the dynamics of PML NB assembly,  
201 with a drop of the half recovery time, from 3.2 min to 0.6 or 0.8 min respectively, and complete  
202 recovery of the photobleached body, similar to fully liquid compartments. These data indicate  
203 that more than the zinc finger structure itself, the helix dictates the typical PML dynamics at NBs.  
204 We thus assessed the crystal structure of MBP-PML B2 helix with double C213A/A216V  
205 mutations, an adverse condition for any effect of  $\alpha$ -helix alteration on the overall B2 folding.  
206 C213A/A216V B2 crystal structure was obtained with a RMSD 0.26 Å over 42 C $\alpha$  atoms and  
207 revealed a folding identical to WT B2 box zinc finger, supporting that the effects of mutations on  
208  $\alpha$ -helix on PML NB assembly dynamics is only due to loss of its biochemical characteristics and  
209 not to B2 folding alterations (Fig. 4D and Supplementary Fig. S4H). Altogether, we conclude that  
210 the conserved PML B2  $\alpha$ -helix and C213 are crucial for the PML dynamics controlling NB assembly,  
211 while organization of the Zn finger 1 is most likely required for the proper positioning and  
212 accessibility of this helix.

213

## 214 **B2 $\alpha$ -helix mediates hydrophobic PML trimerization key for PML NB dynamics**

215 TRIM5 $\alpha$  B2 has been proposed to trimerize through its specific  $\alpha$ -helix around a  
216 tryptophane core *in vitro* (Wagner et al., 2016), and arsenic may be involved in trivalent or  
217 pentavalent interactions. We thus modelled if PML B2 monomers could interact within a trimer  
218 (Fig. 5A). In this model, the trimer is predicted to be driven by  $\alpha$ -helix, involving hydrophobic  
219 interfaces, and in particular, I202, A216, L217 and L218. L217 is predicted to play a very central  
220 role through its two methyl groups, each bridging another PML B2 monomer through its own  
221 L217, as well as with I202 on  $\beta$ 1 (Fig. 5B). Interestingly, L218 - whose mutation impairs PML NB  
222 assembly and dynamics - would also bind I202 of a second PML B2, securing the B2 complex.  
223 Consistently, SEC-MALS analysis revealed three forms of purified MBP-B2 with molecular weights

224 corresponding to monomer, dimer and trimer (Fig. 5C). We also found a majority of monomers  
225 and trimers, supporting our model of B2 trimer formation *in vitro*.

226 To assess the relevance of this model in cell, we have generated discrete point mutations  
227 of these residues. L217G substitution had the most drastic effect, completely blocking PML NB  
228 assembly (Figs. 5D-E). GFP-PML I202 localization was diffuse in the majority of cells and formed  
229 one or two liquid-like bodies in 40% of cells, similar to the single liquid-like PML L218G body (Fig.  
230 5D-E). As predicted by the model, A216G mutation had only minor effects, increasing the diffuse  
231 PML fraction. The default in NB assembly is more severe with A216V mutation - frequently  
232 observed in ATO-resistant patients -, consistently with our model predicting a constraint  
233 environment due to the L217 side chain within the trimer (Figs. 5B and 5E, Supplementary Fig.  
234 S5B). Altogether, this gradient of mutant phenotypes establishes  $\alpha$ -helix as a driver of PML B2  
235 trimer regulating body assembly dynamics, through L217, L218 and I202-mediated hydrophobic  
236 interactions. Strikingly, increasing hydrophobicity by substituting leucine to residues with  
237 aromatic group at position 218 led to the formation of filaments, on which PML exchange was  
238 poorly dynamic (Fig. 5F and Supplementary Fig. S5C-D). This is reminiscent to the solid-like  
239 proteins such as mutant FUS filaments (Patel et al., 2015), supporting that the affinity of PML B2  
240  $\alpha$ -helix interactions tune PML dynamics from a liquid-like to a typical PML bodies. Finally,  
241 quantification of NB number in MEFs expressing PML C212S or C213S supports that zinc finger 1  
242 folding plays a less important role than the C213-containing hydrophobic helix (Supplementary  
243 Fig. S5A).

## 244

### 245 **Arsenic docks on the C213 tri-cysteine pocket of PML trimers and drives gel-like** 246 **transition**

247 In APL, ATO and arsenic derivatives potent for therapy all provide trivalent arsenic (As(III)  
248 oxidation state) in solution at physiological pH and *in vivo*. As(III) can form stable complexes with  
249 thiol groups through covalent binding to sulfur and may form complexes with three glutathiones  
250 in solution (Han et al., 2007). Interestingly, at 180 degree below the L217-ternary interactions,  
251 the key C213 is organized in triad in the very center of the PML B2 helix trimer (Fig. 6A,

252 supplementary S6A). Thus, we hypothesized that ATO could trigger gel-like transition of PML NBs  
253 by targeting this C213 triad. Within the triad, the C213 residues are separated by 3.2 Å, fitting  
254 with an arsenic docking that would lead to an interacting distance of 2.7 Å between arsenic atom  
255 and SH group (Fig. 6A, supplementary S6B). To investigate further the role of this triad  
256 organization, we first tested whether the effect of ATO on PML NBs depends on a valency of 3.  
257 We used monomethyl arsenic (MMA) that can only bind 2 cysteines, as well as the closest  
258 chemical to As(III), antimony trioxide (STO) that releases trivalent Sb. In contrast with ATO, MMA  
259 has no effect on the dynamics of PML NB assembly (Fig. 6B) (Wang et al., 2015), while STO  
260 decreased the diffuse fraction of PML, turned PML NBs in gel-like bodies, with incomplete fusions  
261 and dramatic slower PML dynamics, and subsequently increased PML sumoylation (Fig. 6B,  
262 Supplementary Fig. S6C-D).

263 Then, we used PML point mutants to assess arsenic effect. PML distribution in the nucleus  
264 remained unchanged upon ATO treatment for all B2 mutants impairing B2 folding or trimerization  
265 (Fig. 6C). PML C213S or  $\alpha$ -helix trimerization mutants completely remained liquid-like upon ATO  
266 (Fig. 6D). The Zn-finger1 folding C212S or C189S mutations modestly affecting base line PML  
267 dynamics also impaired ATO-induced gel-like transition (Fig. 6D, Supplementary Fig. S6E). In  
268 contrast, A216G mutation expected to have little effect on trimerization did not affect basal nor  
269 ATO-induced changes in PML NB properties (Fig. 6C-D). B2 mutants were defective for both basal  
270 and ATO-induced sumoylation, with a worst effect of the helix mutations abrogating B2 trimer,  
271 relating PML NB assembly dynamics with its subsequent sumoylation (Fig. 6E). Importantly,  
272 ReAsH - an arsenic derivative that fluoresces when bound to proteins - both triggered aggregation  
273 of WT PML NBs, similar to ATO, and labelled the GFP-PML shell (Fig. 6F) (Jeanne et al., 2010). In  
274 contrast, the shell of the body formed by PML C213S could not bind ReAsH, which accumulated  
275 rather in the inner core, devoid of PML, for a still elusive reason. Similarly, PML L218G cannot  
276 bind ReAsH, showing that arsenic binding on PML both depends on C213 and  $\alpha$ -helix  
277 trimerization. Supporting that covalent arsenic binding directly to PML controls PML NB assembly  
278 dynamics, the effect of ATO on PML NBs was not reversed by washout experiments, and even 4h  
279 after removing ATO (Supplementary Fig. S6G). Thus, As(III) not only directly targets PML C213,

280 but also requires B2 trimerization to bind PML, trigger liquid-like to gel-like transition and  
281 subsequent sumoylation, supporting its covalent interaction within the triad.

282 Above all, while mutations of C213 removing sulfur group (C213S or C213A) or additionally  
283 adding steric hindrance (C213L or C213F) impaired PML NBs assembly, replacing the C213 by  
284 valine rescued the basal NB formation (Fig. 6G). These data indicate that the branched methyl  
285 groups of the valines can maintain hydrophobic interactions in B2 helices organized in trimer,  
286 similar to the L217 on the other side of the helix. PML C213V displayed normal dynamics at the  
287 NBs and was, as expected, resistant to ATO (Fig. 6H). Thus, this C213V mutant replaced covalent  
288 As(III) binding to C213 triad by lower affinity (hydrophobic) interaction still capable to maintain  
289 typical PML NB dynamic properties. Supporting this, PML sumoylation was defected in all C213  
290 mutants but C213V that remained efficiently conjugated (Fig. 6I). SEC-MALS analysis revealed that  
291 MBP-B2 C213A lost PML species corresponding to trimers *in vitro*, supporting a key role of this  
292 cysteine in modulating helix-driven PML self-interactions (Fig. 5C). Finally, alkylation by NEM that  
293 disrupted WT or C389S PML NBs had no effect on PML C213V NBs (Fig. 6J), supporting a central  
294 role of C213 to tune PML B2 trimeric assembly. Altogether our findings demonstrate that PML B2  
295 trimer and C213 triad positioning account for the stereoselectivity of PML to ATO that induces  
296 gel-like transition by turning PML B2 trimers maintained by low affinity hydrophobic interactions  
297 into a high affinity As(III)-C213 triad covalently bounded complex. Our results also uncover B2  
298 helix as a rheostat controlling PML assembly dynamics depending on C213 status (Fig. 6K).

299

## 300 **ATO suppresses clonogenicity of PML-RARA-transformed progenitors by targeting** 301 **C213 triad**

302 To assess the role of PML C213-containing  $\alpha$ -helix in the context of the oncogenic PML-  
303 RARA protein, we have transduced hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) with WT and  
304 mutant PML-RARA, and first analyzed the nuclear distribution of C213S and C213V PML-RARA  
305 mutants. In contrast to PML-RARA C213V that formed numerous small microdots similar to WT  
306 PML-RARA, C213S abolished PML-RARA assembly into dots and PML-RARA C213S was completely  
307 diffuse in the nucleus (Fig. 7A). Interestingly, in these *Pml* WT HSPCs, while PML-RARA C213V



308 disrupted endogenous PML, PML-RARA C213S did not altered them. While ATO triggered WT  
309 PML-RARA assembly into larger and fewer dots similar to NBs and colocalizing with PML, none of  
310 the PML-RARA C213 mutants responded to ATO treatments as expected. In PML-RARA C213S  
311 transduced HSPCs, ATO triggered endogenous PML NB re-assembly, while it was impaired in  
312 C213V PML-RARA cells (Fig. 7A). PML-RARA C213V exchange dynamics at the microdots was  
313 reduced compared to WT PML-RARA and was insensitive to ATO (Fig. 7B-C). Again, in the  
314 oncoprotein context, C213S blocked PML-RARA sumoylation, while PML-RARA C213V was  
315 efficiently sumoylated at baseline, supporting that the decreased in PML-RARA dynamics favors  
316 its sumoylation within the microdots (Fig. 7D). Sumoylation of PML-RARA mutants was unaffected  
317 by ATO, as expected (Fig. 7D).

318         Potent effect of ATO therapy relies on its ability to eradicate leukemic cells with self-  
319 renewal capacity. We thus investigated the effect of these mutations on self-renewal of PML-  
320 RARA-transformed HSPCs in methylcellulose clonogenic assay upon ATO treatments. After 3  
321 passages, PML-RARA WT and PML-RARA C213V-transformed HSPCs were treated for a week with  
322 ATO at low dose and cells were then replated in methylcellulose to count the number of colonies.  
323 The number of WT PML-RARA clones dropped, indicating that ATO had eliminated the self-  
324 renewing transformed cells, while ATO-treated PML-RARA C213V cells were still able to form a  
325 large number of colonies (Fig. 7E). Thus, this mutant is resistant to ATO therapy, supporting C213  
326 as the ATO target site, but also that endogenous PML was blocked by the C213V-enforced  
327 trimerization with mutant PML-RARA.

328

329

## 330 **DISCUSSION**

331         PML nuclear body formation is critical in multiple physio-pathological settings including  
332 innate immunity against viruses, senescence induction or APL therapy. PML NB formation drives  
333 sumoylation of partner proteins which controls, at least in part, downstream PML responses.  
334 Arsenic has played a key role in understanding NB biogenesis. Paradoxically, the molecular target  
335 of arsenic remained ill-understood, as several exclusive models were proposed: interference with

336 Zn binding within the RING finger vs binding to a tri-cysteine motif in the B2 box. Some insights  
337 came for therapy-resistant patients who exhibit highly clustered mutations adjacent to the tri-  
338 cysteine motif in the B2 box. Yet, the molecular interplay between PML and arsenic remains  
339 poorly characterized, in part because of the absence of any structural data. Here we provide a  
340 renewed framework for PML/arsenic interplay.

341 Despite several claims, there is little experimental evidence that PML undergoes phase  
342 transitions and that the latter drive membrane-less organelle biogenesis. Here, we provide direct  
343 evidence that PML can de-mix from the nucleoplasm, fuse and exhibit viscosities similar to those  
344 of other compartments where LLPS was shown to occur, and display dynamic exchange of the  
345 PML protein (Fig. 1). NB-biogenesis as well as transition to liquid phase by LLPS were initially  
346 proposed to rely on interplays between PML SUMOs and SUMO-interacting motifs. We  
347 previously demonstrated that PML can assemble into NBs without any SUMO-conjugation and  
348 several PML B2 mutants that are not efficiently sumoylated can de-mix into liquid phases (Fig. 4-  
349 6), underscoring the dispensable nature of this post-translational modification. One key feature  
350 of PML NBs is their core-shell structure, a phenomenon not easily explained by LLPS. Moreover,  
351 in contrast to simple, "classic" LLPS, FRAP studies demonstrate the existence of two PML pools  
352 within the PML shell: one that exchanges with slow kinetics and one that does not exchange (Fig.  
353 1). The B2 mutants discussed below also exhibit this peculiar core shell organization, even though,  
354 in these settings, all PML exchanges with the nucleoplasm. Future studies should address the  
355 basis for core/shell formation.

356 This study has focused on B2 structure/function analyses and its targeting ATO. Note that  
357 B2 interactions come in addition to many other ones, including RING, B1 and coiled-coil, all of  
358 which are required for proper NB biogenesis. We previously reported the existence of  
359 intermolecular disulfides in PML upon high doses of arsenic exposure (Jeanne et al., 2010). Here,  
360 we demonstrate that these disulfides target two key residues, C389 and C213 and that disulfide  
361 formation can also be promoted by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on C213. Yet, these intermolecular disulfides do not  
362 underlie NB biogenesis and ATO-response, as demonstrated by normal features and ATO-  
363 sensitivity of the C389S mutant (Fig. 2). This highly oxidation-prone residue may be involved in  
364 other functions, for example, ROS buffering possibly to sustain the activity of UBC9, an exquisitely

365 oxidation sensitive enzyme. The B2 structure reported here (Fig. 3) allowed us to propose models  
366 of higher-order assembly that relies on a short hydrophobic  $\alpha$ -helix that yield trimer formation.  
367 This model of assembly resembles that of TRIM5 $\alpha$ , a master restriction factor for HIV (Wagner et  
368 al., 2016). The model presented here is fully supported by a number of mutations engineered to  
369 assess its relevance to NB formation and PML dynamics. Impeding zinc finger formation (C189S  
370 and C212S) yields to the formation of one to three single large NBs with abundant nucleoplasmic  
371 staining, but only modest differences in PML dynamics, in particular the same immobile fraction  
372 as WT. Yet, basal and ATO-induced sumoylation are severely impeded. Thus, efficient SUMO-  
373 conjugation requires zinc finger stabilized B2 structure and not solely an immobile PML shell. It is  
374 actually possible that the single large NB is the consequence of inefficient PML sumoylation, as  
375 these two features were highly correlated among informative mutants. Consistent with the  
376 proposed trimer assembly, the highly conserved  $\alpha$ -helix is key to correct NB formation,  
377 particularly L217 and L218 (Fig. 5). Importantly, substituting either of these two leucine residues  
378 by large hydrophobic ones generated intranuclear rods with gel-like features, implying a key role  
379 of this region in assembly and dynamics of the PML protein (Fig. 4).

380 Besides enforcing B2 trimer formation, one of the key functions of the helix is to position  
381 the key C213 residue at the center of a triad (Fig. 5-6). This central role of the C213 residue in  
382 maintaining the assembled structure was demonstrated by a series of mutations that support a  
383 key role of C213-mediated interactions in NB biogenesis and sumoylation (Fig. 6). The  
384 conservative C to S mutation behaved similarly to mutations impairing helix/helix interactions  
385 (rapid dynamics and no sumoylation), suggesting not only that a key function of the trimer is to  
386 position C213, but also that this residue directly contributes to stabilization of the trimer.  
387 Strikingly, the C213 to V mutation restored a completely normal baseline situation (NB formation,  
388 dynamics, sumoylation), while the bulkier L and F residues allowed some basal sumoylation and  
389 a slightly higher number of NBs, but did not recapitulate the normal phenotype (Fig. 6). This key  
390 observation supports the idea that C213V-mediated hydrophobic interactions enforce B2 trimer  
391 stability, which subsequently allows PML sumoylation and formation of the expected NB profile.  
392 Remarkably, PML C213V was completely insensitive to both arsenic and NEM. Cysteines may have  
393 distinct oxidation status, which could be favored within this 3D arrangement, somehow

394 mimicking an enzymatic active site, although we cannot exclude that intra-molecular disulfide  
395 bounds may stabilize these trimers. Several studies have emphasized the requirement for 3  
396 adjacent cysteine residues on the same polypeptide for efficient arsenic binding (Shen et al.,  
397 2013; Zhang et al., 2015). In this setting, arsenic binding is achieved in a specific 3D arrangement  
398 wherein a key cysteine from distinct polypeptides bind an arsenic atom to lock the trimeric  
399 structure. Clearly, PML is not an arsenic scavenger, but also has redox sensing properties in basal  
400 conditions. How this is achieved molecularly requires further studies. In any case, our results  
401 imply that C213 constitute a sulfur-based redox sensor that behaves as a rheostat to control B2  
402  $\alpha$ -helix trimerization, drive subsequent PML sumoylation and allow NB "maturation" into multiple  
403 smaller domains. The latter may actually be a consequence of PML sumoylation (and possibly  
404 proteolysis). Indeed, mutation of the arsenic-regulated K160 SUMO conjugation site yields a  
405 single large dot, very similar to the ones observed with B2 mutants.

406 PML-RARA degradation by arsenic drives APL remission, while downstream PML NB  
407 reformation (and its own targeting by arsenic) are also required. Our identification of C213 as a  
408 site required for arsenic activity allowed a renewed exploration of the respective roles of PML  
409 and PML-RARA in arsenic response *ex vivo*, using PML-RARA point mutations which solely  
410 impedes arsenic response, but no other known feature of PML. This first demonstrated that PML-  
411 RARA C213S did not colocalized with PML, stressing the essential nature of this residue for  
412 PML/PML intermolecular interactions (Fig. 7). Conversely, PML-RARA C213V delocalized  
413 endogenous PML into microspeckles. Both of these transformed cells were insensible to ATO-  
414 induced NB reformation and SUMOylation. The PML-RARA C213V mutant was also resistant to  
415 ATO-induced loss of clonogenic activity in transformed HSPC, supporting C213 as the ATO target  
416 site on PML-RARA responsible for PML-mediated APL cure.

417 Overall, B2-dependent interactions appear to be tightly regulated, notably by arsenic, and  
418 may constitute the key regulatory hub of NB assembly as well as enforce its oxidative stress  
419 sensing function. Such fine-tuning of NB assembly drives PML, and presumably partner,  
420 sumoylation. Future studies should explore how our findings could enlighten the molecular bases  
421 of oxidative stress sensing by PML. Identification of the key C213 residue and the molecular site  
422 where it assembles could allow the design of novel arsenic-like molecules with therapeutic value.

## 423 **METHODS**

### 424 **Plasmid construction**

425 Mutations of pMSCV<sub>puro</sub>-HA-PMLIII or pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PMLIII constructs were performed  
426 by using the Q5 site-directed mutagenesis kit (NEB: catalog n°E0554S) according to the  
427 manufacturer's protocol (see key resource table for primer sequences). The results were verified  
428 by Sanger sequencing (Eurofins Genomics).

429 The pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PML-RAR $\alpha$  WT, was generated by restriction/ligation using *SfiI* and  
430 *AgeI* restriction sites of parental vectors: pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PMLIII (backbone) et pMSCV-PML-  
431 RAR $\alpha$ <sub>néo</sub> (insert). PML-RAR $\alpha$  B2 mutants were generated by restriction/ligation using *AvrII* and *SfiI*  
432 restriction sites of parental vectors: pMSCV<sub>néo</sub>-PML-RAR $\alpha$  and pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PML-RAR $\alpha$   
433 (backbone) and pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PMLIII harboring the desired B2 mutations (inserts). Restriction  
434 enzymes and T4 DNA ligase were purchased from NEB (see key resource table for references) and  
435 restriction/ligation was performed according to the manufacturer's protocol.

436

### 437 **Cell culture and cell treatments**

438 Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were isolated from E13,5 embryos from BALB/cByJ  
439 *Pml* KO mice described in (Niwa-Kawakita et al., 2017) and transformed with large T antigen from  
440 the SV-40 virus. MEF cells (our laboratory) and Platinum-E cells (Lavau C, USA) were maintained  
441 in DMEM, high glucose, pyruvate (Thermo Fisher Scientific; catalog n°41966052) supplemented  
442 with 10% FBS in the presence of 50U/mL of penicillin and streptomycin and 2mM of glutamine  
443 (see key source table for details) and were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. All cell lines used were  
444 negative for mycoplasma (tested by Eurofins MWG France once a month) and were manipulated  
445 separately to avoid any cross contamination during cell passages. *Pml* KO MEFs were regularly  
446 checked for the absence of PML by IF or WB. No karyotype was performed.

447 *Pml* KO MEFs were transduced using retroviruses produced by Platinum-E packaging cells,  
448 after transfection with effectene reagent pMSCV<sub>puro</sub>-HA-PMLIII or pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PMLIII  
449 constructs expressing *Pml* WT or the indicated PML mutants (Qiagen; catalog n°. 301425). The

450 culture supernatant of 600k Platinum-E cells, at 48 and 72h post-transfection, supplemented with  
451 1µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich; catalog n°TR-1003) was used to transduce 100k *Pml* KO MEFs.  
452 GFP-positive cells with similar levels of fluorescence were sorted by flow cytometry. HA-PMLIII  
453 expressing cells were selected using 2µg/mL puromycin (Sigma-Aldrich; catalog n°P8833).

454  
455 Hematopoietic progenitors were isolated from the bone marrow of 7 weeks old C57Bl/6-  
456 JRj *Pml* WT mice treated with 5-fluorouracil (150µg/g, Sigma-Aldrich; catalog n°F6627) for 5 days.  
457 The bone marrow was collected by flushing the femur with RPMI medium (Thermo Fisher; catalog  
458 n°12633012), supplemented with 10% v/v FBS. The collected cells were centrifuged and red blood  
459 cells were lysed with ammonium chloride (0.8% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA diluted in water and  
460 buffered with KHCO<sub>3</sub>, pH= 7.2 - 7.6). Cells were centrifuged one more time and resuspended in  
461 HBSS (Thermo Fisher; catalog n° 14025092) supplemented with 2% v/v FBS. Cells engaged in a  
462 differentiation program were removed using antibodies against Lin<sup>+</sup> (lineage positives) coupled  
463 to magnetic beads [anti-CD5, CD8, B220, Gr1, Mac (CD11b) (Pharmingen)]. Hematopoietic Lin-  
464 progenitors were cultured in Stemspan medium supplemented with stem cell factor (SCF  
465 50ng/ml) and interleukin 3 and 6. The cell culture mediums and molecules used for hematopoietic  
466 progenitors were provided by Stemcell (see key resource table for references).

467 Hematopoietic progenitors were transformed after infection with the supernatant of  
468 Platinum-E cells transfected with a pMSCV<sub>neo</sub>-PML-RAR $\alpha$  expressing PML-RAR $\alpha$  WT or the  
469 indicated PML-RAR $\alpha$  mutants, as described above. PML-RAR $\alpha$  expressing cells were selected  
470 using 1,2mg/ml of G-418 diluted in the cell culture medium (Invivogen, catalog n°ant-gn-5).

471  
472 Cells were treated with 1-10µM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich; catalog n° 01969), 10µM N-ethyl-  
473 maleimide (Sigma-Aldrich; catalog n°E3876), 500µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich; catalog n°516813), 2µM  
474 Methylarsonic acid (Greyhouse; catalog n°N-12922), 2µM cacodylic acid (Sigma-Aldrich; catalog  
475 n°C0125), 1µM antimony oxide (Sigma-Aldrich; catalog n°637173-100G) and 2µM ReAsH (Thermo  
476 Fisher; catalog n° T34562) when requested.

477

## 478 **Western blot**

479 Samples used for Western-blot analysis in non-reducing conditions were lysed in  
480 homemade Laemmli buffer, allowing the detection of intermolecular disulfide bond formation  
481 between PML monomers (200mM Tris pH 6,8, 8% SDS, 40% glycerol, 0,2% bromophenol blue),  
482 supplemented with 20mM N-ethyl-maleimide (Sigma-Aldrich; catalog n°E3876). To identify  
483 intermolecular disulfide-bonded PML, a part of these samples was supplemented with 50mM  
484 TCEP. The samples that were not used for the identification of intermolecular disulfide bonds  
485 were lysed in commercial Laemmli buffer (Sigma-Aldrich; catalog n° S3401). Samples were boiled  
486 at 95°C for 5 minutes prior to their loading on 4-12% NuPAGE bis-tris gels (Thermo Fisher, catalog  
487 n°NP0336) and transferred to nitrocellulose membranes (BioTrace Pall Laboratory; catalog n°732-  
488 3031). Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and secondary antibodies 1 h at room  
489 temperature (RT). Antibodies used: anti-GFP (1/1000, Roche; catalog n°11814460001), anti-HA  
490 (1/1000, Covance; catalog n°MMS-101R-1000), anti-Actin (1/1000; Sigma-Aldrich; catalog  
491 n°A2066), anti-PML (1/1000, Merck Millipore; catalog n°MAB3738) Secondary antibodies from  
492 Jackson ImmunoResearch: anti-Mouse-HRP (1/5000, catalog n°115-035-062), anti-Rabbit-HRP  
493 (1/5000, catalog n°111-035-045). Proteins were detected using SuperSignal West Dura or Femto  
494 (ThermoFisher; catalog n°34076 and 34096), using Vilber Fusion-Fx (Vilber).

495

## 496 **Immunolabelling and microscopy analysis**

497 Cells were fixed with formalin 10% (Sigma-Aldrich; catalog n°HT501128) for 15 min and  
498 permeabilized in PBS 0.5% Triton x-100 (Sigma-Aldrich; catalog n°T9284) for 15 min. Incubation  
499 with primary or secondary antibodies was performed in PBS 0.5% Triton X-100 for 1h. DAPI was  
500 added with the secondary antibody (1µg/mL, Thermo Fisher ; catalog n° 62248). Primary  
501 antibodies: anti-GFP (1/1000, Roche; catalog n°11814460001), anti-HA (1/1000, Covance; catalog  
502 n°MMS-101R-1000), anti-SUMO2/3 (1/500, Cell Signaling Technologies; catalog n° 4971P).  
503 Secondary antibodies for confocal microscopy analysis : goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1/500,  
504 Jackson ImmunoResearch; catalog n°115-545-003), goat anti-mouse rhodamine red-X (1/500,

505 Jackson ImmunoResearch; catalog n°115-295-003). Secondary antibodies for STED analysis :  
506 goat anti-mouse STAR RED (1/250, Abberior; catalog n° STRED-1001). Image acquisitions were  
507 done by using a confocal microscope LSM 980 (Carl Zeiss Micro-Imaging) equipped with an  
508 Airyscan 2 super-resolution module using a x60 oil-immersion objective or by STED microscopy  
509 using an Axio Observer 7 (Carl Zeiss Micro-Imaging) equipped with a STEDYCON module  
510 (Abberior) using a x100 oil-immersion objective.

511 Stably expressing HeLa cells were grown in culture plates or wells containing glass disks  
512 for 24h. The glass disks were transferred onto slides and washed twice with PBS. After fixation  
513 with 4% paraformaldehyde, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100. Slides were  
514 blocked with 2% BSA in PBS, followed by incubation with anti-Flag antibodies (Sigma-Aldrich;  
515 catalog n° F1804) overnight at 4 °C. The next day, slides were washed thrice with PBS and  
516 incubated with fluorescent-labeled secondary antibodies (Abbkine; catalog n°A23210) at room  
517 temperature for 4 h and then washed thrice with PBS. Slides were mounted using DAPI  
518 Fluoromount-G (SouthernBiotech; catalog n°0100-20) and stored in the dark at 4 °C. The  
519 fluorescent signals were visualized under a Zeiss 510 confocal microscope (Carl Zeiss Micro-  
520 Imaging).

521

522 **Time-lapse analysis of PML NB apparition in living MEF *Pml* KO right after stably**  
523 **expressing GFP-PML WT**

524 MEFs *Pml* KO were plated in glass-bottom culture dishes (IBIDI; catalog n°  
525 81156) and transduced with the culture supernatant of Platinum-E cells transduced two days prior  
526 with a pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-PMLIII vector. To avoid medium evaporation during the acquisition, 1mL  
527 of anti-evaporation oil was added on top of the supernatant (IBIDI; catalog n°50051). The  
528 acquisition was performed on an Axio Observer video-microscope (Carl Zeiss Micro-Imaging)  
529 equipped with a thermostatic chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Laser power [488nm, 1% laser power]]  
530 and exposure time (20ms) were set at minimum levels to avoid phototoxicity. Acquisitions were  
531 performed every 30 minutes on a 12,5µm Z section with a distance between two plans of 0,5µm.

532



533 **Quantification of PML NB nucleation/fusion/fission events**

534 *Pml KO* MEFs stably expressing GFP-PMLIII were plated in glass-bottom culture dishes  
535 (IBIDI; catalog n° 81156). Live acquisitions were performed on a spinning disk confocal microscope  
536 (Nikon Eclipse Ti, Nikon) equipped with a Coolsnap HQ2 high-sensitivity camera (Photometrics) and  
537 a thermostatic chamber (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Cells were imaged during two hours with a 488nm laser  
538 (10% laser power, 100ms exposure time). Acquisitions were performed every 30 seconds on a  
539 12,5µm Z section with a distance between two plans of 0,5µm. Quantification of the  
540 nucleation/fusion/fission events was performed using the FIJI software and are based on  
541 maximum Z projections of n=37 cells from four independent experiments.

542

543 **Analysis of PML dynamics at NBs using Fluorescence Recovery After**  
544 **Photobleaching (FRAP)**

545 MEFs *Pml KO* stably expressing GFP-PMLIII, GFP-PML-RARα or the indicated B2 mutants  
546 were plated in glass-bottom culture dishes (IBIDI; catalog n° 81156). Live acquisitions were  
547 performed on a spinning disk confocal microscope (Nikon Eclipse Ti, Nikon) equipped with a  
548 Coolsnap HQ2 high-sensitivity camera (Photometrics) and a thermostatic chamber (37°C, 5%  
549 CO<sub>2</sub>). For GFP-PMLIII expressing cells, FRAP experiments were performed on regions of interest  
550 (ROI) with a diameter of 1µm, centered on a nuclear body. Imaging was performed with a 488nm  
551 laser (10% laser power, 100ms exposure time) and a x60 oil-immersion objective. For GFP-PML-  
552 RARα expressing cells, FRAP experiments were performed on regions of interest (ROI) with a  
553 diameter of 2µm in the center of the nucleus. Imaging was performed with a 488nm laser (20%  
554 laser power, 100ms exposure time) and a x60 oil-immersion objective. Acquisitions were  
555 performed every 10 seconds on a 12,5µm Z section with a distance between two plans of 0,5µm.  
556 Three images were taken before photobleaching, 15 iterations were used to bleach the ROI.  
557 Fluorescence recovery was followed every 10 seconds for 30 minutes for GFP-PMLIII expressing  
558 cells and for 15 minutes for GFP-PML-RARα expressing cells.

559 Fluorescence recovery was analyzed using the FIJI software. For each photobleached  
560 nucleus, three ROI were determined: the first ROI (NB) refers to the photobleached area, the

561 second ROI (NUCLEUS) refers to the whole nucleus and the third ROI (BACKGROUND) refers to  
562 the background noise. For each studied nucleus, the relative fluorescent intensity (RFI) was  
563 calculated by a plugin following the following program (Sprague et al., 2004):

564 1- Background correction was applied at every time point by calculating:

$$565 \quad \text{NB}_{\text{corrected}}(t) = (\text{NB})_{(t)} - (\text{BACKGROUND})_{(t)}$$

$$566 \quad \text{NUCLEUS}_{\text{corrected}}(t) = (\text{NUCLEUS})_{(t)} - (\text{BACKGROUND})_{(t)}$$

567 2- A double normalization was performed to account for global sample bleaching by  
568 calculating:

$$569 \quad \text{RFI}_{(t)} = [(\text{NUCLEUS})_{\text{pre-bleaching}} / (\text{NB})_{\text{pre-bleaching}}] * (\text{NB}_{\text{corrected}}(t) / \text{NUCLEUS}_{\text{corrected}}(t))$$

570 with  $(\text{NUCLEUS})_{\text{pre-bleaching}} = \text{mean}[(\text{NUCLEUS})_{(t)}]$  from  $t_0$  to  $t_{\text{bleaching}}$

571 and  $(\text{NB})_{\text{pre-bleaching}} = \text{mean}[(\text{NB})_{(t)}]$  from  $t_0$  to  $t_{\text{bleaching}}$

572 We assessed that PML recovery was independent of the size of the bleached area by  
573 testing several sizes of photobleached areas, showing that interactions between PML proteins at  
574 the shell have a predominant role over free diffusion. Then every RFI curve was fitted to an  
575  $y=A*[1-\exp(-B/\tau)]$  model where  $y$  is the fluorescence intensity,  $A$  the plateau of the intensity  
576 (mobile fraction),  $B$  the time in seconds and  $\tau$  the half-recovery time ( $t_{1/2}$ ). Experimental data  
577 with a determination coefficient ( $R^2$ ) inferior to 0,6 upon fitting to this model were not conserved  
578 for further analysis.

579

## 580 **Evaluation of the effective viscosity of PML NBs**

581 The magnitude of the effective viscosity of the PML NBs was estimated by quantifying the  
582 time required for two NBs to relax in a spherical structure during a fusion event. The relaxation  
583 time during a fusion event was quantified by measuring the long axis of the two condensates from  
584 the beginning of the fusion and was plotted as a function of time for  $n=21$  NBs from three  
585 independent experiments. For each NB, the curve (size of the long axis/ $t$ ) was fitted to an  
586 exponential model, which allowed us to extract a characteristic fusion time (Fig. 1.C.). We  
587 repeated this process on several NBs with different sizes and determined the size of the NB after

588 fusion (L) and the relaxation time ( $\tau$ ) for each fusion event. The fusion time increases with the NB  
589 diameter and follows approximately a linear tendency as observed for simple liquids. The slope  
590 of this curve can be interpreted as the capillary velocity ( $\gamma/\eta$ ), where  $\gamma$  represents the surface  
591 tension and  $\eta$  the effective viscosity (which tends to oppose fusion). We can evaluate the  
592 magnitude of the surface tension of NB by calculating  $\gamma \sim kT/(a^2)$  where  $kT$  is the thermal energy  
593 and  $a$  is the typical size of a PML protein. Assuming  $\gamma \sim 10\mu\text{N/m}$  (Garcia-Jove Navarro et al., 2019),  
594 we can therefore estimate that PML NB has an effective viscosity of about  $10^3\text{Pa}\cdot\text{s}$ . This  
595 measurement is coherent with what has been described for other nuclear bodies such as the  
596 nucleolus ( $2 \cdot 10^3\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) (Brangwynne et al., 2011) or nuclear speckle ( $10^3\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) (Kim et al., 2019).

597

## 598 **Evolutionary conservation of PML B2**

599 Human PML B2 amino acid sequence was extracted from the NCBI databank  
600 (NP\_150241.2). We compared this sequence to the following sequences: *Macaca mulatta*  
601 (NP\_001035899.1), *Mus musculus* (NP\_835188.2), *Molossus molossus* (XP\_036113734.1), *Gallus*  
602 *gallus* (XP\_004943755.1), *Chrysemys picta bellii* (XP\_042707508.1). The study of amino acid  
603 conservation was performed using the ClustalW2 software (Madeira et al., 2022).

604

## 605 **Quantification of PML NB numbers**

606 PML NB quantification was performed on confocal images of *Pml* KO MEFs stably  
607 expressing GFP-PMLIII WT or the indicated B2 mutants. PML NB quantification was analyzed on  
608 the FIJI software on Z projections (sum of intensities). For each cell line, PML NBs were quantified  
609 from three independent experiments generated from three independent passages. For each  
610 experiment, every PML NBs were counted in 50-300 cells.

611

## 612 **Protein expression and purification**

613 The DNA sequence of human PML B2 domain was inserted into a modified pRSFDuet-1

614 vector (Novagen) with an N-terminal MBP tag using ClonExpress® II one-step Cloning Kit (Vazyme).  
615 Point mutations were generated with the Fast Mutagenesis System (TransGen Biotech).  
616 Recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) cells (Novagen) for  
617 protein expression. 0.2 mM IPTG was added into the culture to induce expression of the  
618 recombinant proteins at 18 °C for 16 hours. The cells were harvested by centrifugation (5000 rpm,  
619 8 min), resuspended in a buffer containing (20 mM Tris-HCl pH8.0, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 0.3  
620 mM TCEP, 1 mM PMSF), and lysed using a cell disruptor (JNBIO). Cell debris were removed by  
621 centrifugation and the lysate was loaded onto a pre-equilibrated amylose resin column (NEB). The  
622 column was first washed with 5 column volume lysis buffer and MBP-B2 protein was eluted with  
623 a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5% glycerol, 0.3 mM TCEP, 10 mM  
624 maltose. Eluted protein was concentrated to around 20 mg/mL and further purified on a Superdex  
625 200 increase gel filtration column (Cytiva) in a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM  
626 NaCl, 0.3 mM TCEP. Peak fractions corresponding to MBP-B2 were pooled and concentrated to 15  
627 mg/mL for crystallization.

628

### 629 **Crystallization and data collection**

630 Crystals of WT MBP-B2 were grown with 24-well plates using the hanging drop vapor  
631 diffusion method by mixing 1.2 µL protein (15 mg/mL) with 1.2 µL crystallization buffer containing  
632 100 mM MES pH 6.5, 250 mM potassium acetate, 22 % (w/v) PEG 3350. Crystals grew to full size  
633 after incubation at 16 °C for 1 week. MBP-B2 C213A and A216V mutant proteins were crystallized  
634 in the same condition. Before X-ray diffraction, crystals were cryo-protected with the reservoir  
635 solution supplemented with 25% glycerol and were flash-cooled into liquid nitrogen. Diffraction  
636 data were collected at Beamline station BL19U1 of Shanghai Synchrotron Radiation Facility (SSRF,  
637 Shanghai, China).

638

### 639 **Structure determination and refinement**

640 The diffraction data were integrated and scaled using XDS and the CCP4 program Pointless  
641 and Aimless (Evans and Murshudov, 2013; Kabsch, 2010; Winn et al., 2011). The structure of MBP-

642 B2 was determined by molecular replacement using the MBP structure from PDB 1ANF as an initial  
643 searching model with Phaser (McCoy et al., 2007). The structural model was built using Coot  
644 (Emsley and Cowtan, 2004) and refined using PHENIX (Liebschner et al., 2019). The structure of  
645 MBP-B2 C213A and A216V was determined using WT MBP-B2 structure as the initial search  
646 model. Figures were generated using PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0  
647 Schrödinger, LLC). The statistics of the data collection and refinement are shown in Table 4. The  
648 B2 trimer model was generated with Alphafold 2 (Jumper et al., 2021).

649

### 650 **SEC-MALS analysis**

651 SEC-MALS were performed using a Superdex 200 increase column (Cytiva) combined with  
652 multi-angle laser light scattering using a Wyatt HELEOS-II 18-angle photometer coupled to a  
653 Wyatt Optilab rEX differential refractometer (Wyatt Technology Corp). The experiments were  
654 carried out at room temperature with a protein concentration of 2.0 mg/mL and a flow rate of  
655 0.5 mL/min in 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.3 mM TCEP. The data were analyzed using  
656 the ASTRA 6.1 software (Wyatt). The molecular mass was determined across the protein elution  
657 peak.

658

### 659 **LC-ICP MS Analysis**

660 The purified recombinant proteins were diluted with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at a  
661 final concentration of 0.0175mM and then incubated with 5  $\mu$ M As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 10 min at 4 °C. A 20  $\mu$ L  
662 aliquot of a sample solution was applied to a gel filtration column (Shodex Asahipak GS-220 HQ),  
663 and eluted with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4 at 30 °C) at the flow rate of 0.8 mL/min. Arsenic  
664 (m/z 75) was monitored with an Agilent 8800 ICP MS (Agilent Technologies, Inc., Japan)  
665 (Naranmandura and Suzuki, 2008). Online ICP MS data were processed with software developed  
666 in-house.

667

668 **REFERENCES**

- 669 Ablain, J., Rice, K., Soilili, H., de Reynies, A., Minucci, S., de Thé, H., 2014. Activation of a promyelocytic  
670 leukemia–tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nature Medicine*  
671 20, 167–174. <https://doi.org/10.1038/nm.3441>
- 672 Ahn, J.H., Davis, E.S., Daugird, T.A., Zhao, S., Quiroga, I.Y., Uryu, H., Li, J., Storey, A.J., Tsai, Y.-H., Keeley,  
673 D.P., Mackintosh, S.G., Edmondson, R.D., Byrum, S.D., Cai, L., Tackett, A.J., Zheng, D., Legant,  
674 W.R., Phanstiel, D.H., Wang, G.G., 2021. Phase separation drives aberrant chromatin looping and  
675 cancer development. *Nature* 595, 591–595. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03662-5>
- 676 Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., Rosen, M.K., 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular  
677 biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- 678 Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., Rosen, M.K., 2016. Compositional  
679 Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* 166, 651–663.  
680 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- 681 Barroso-Gomila, O., Trulsson, F., Muratore, V., Canosa, I., Merino-Cacho, L., Cortazar, A.R., Pérez, C.,  
682 Azkargorta, M., Iloro, I., Carracedo, A., Aransay, A.M., Elortza, F., Mayor, U., Vertegaal, A.C.O.,  
683 Barrio, R., Sutherland, J.D., 2021. Identification of proximal SUMO-dependent interactors using  
684 SUMO-ID. *Nat Commun* 12, 6671. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26807-6>
- 685 Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F.,  
686 Hyman, A.A., 2009. Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled  
687 Dissolution/Condensation. *Science* 324, 1729–1732. <https://doi.org/10.1126/science.1172046>
- 688 Brangwynne, C.P., Mitchison, T.J., Hyman, A.A., 2011. Active liquid-like behavior of nucleoli determines  
689 their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 4334–4339.  
690 <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>
- 691 Chong, S., Graham, T.G.W., Dugast-Darzacq, C., Dailey, G.M., Darzacq, X., Tjian, R., 2022. Tuning levels of  
692 low-complexity domain interactions to modulate endogenous oncogenic transcription.  
693 *Molecular Cell* 82, 2084–2097.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.007>
- 694 de Thé, H., Pandolfi, P.P., Chen, Z., 2017. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-  
695 Targeted Cure. *Cancer Cell* 32, 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.002>
- 696 Echaniz-Laguna, A., Benoit, A., Vinzio, S., Fornecker, L.-M., Lannes, B., Goullé, J.-P., Broly, F., Mousson  
697 de Camaret, B., 2012. Mitochondrial myopathy caused by arsenic trioxide therapy. *Blood* 119,  
698 4272–4274. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-385138>
- 699 Emsley, P., Cowtan, K., 2004. *Coot* : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol*  
700 *Crystallogr* 60, 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- 701 Evans, P.R., Murshudov, G.N., 2013. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D*  
702 *Biol Crystallogr* 69, 1204–1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
- 703 Flora, S.J., 1999. ARSENIC-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND ITS REVERSIBILITY FOLLOWING COMBINED  
704 ADMINISTRATION OF N-ACETYLCYSTEINE AND MESO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINIC ACID IN RATS.  
705 *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 865–869. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03157.x>
- 706 Geoffroy, M.-C., Jaffray, E.G., Walker, K.J., Hay, R.T., 2010. Arsenic-Induced SUMO-Dependent  
707 Recruitment of RNF4 into PML Nuclear Bodies. *MBoC* 21, 4227–4239.  
708 <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-05-0449>
- 709 Goto, E., Tomita, A., Hayakawa, F., Atsumi, A., Kiyoi, H., Naoe, T., 2011. Missense mutations in PML-RARA  
710 are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood* 118, 1600–1609.  
711 <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329433>
- 712 Gurrieri, C., Capodiecì, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C.,  
713 Pandolfi, P.P., 2004. Loss of the Tumor Suppressor PML in Human Cancers of Multiple Histologic

714           Origins. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 96, 269–279.  
715           <https://doi.org/10.1093/jnci/djh043>

716 Han, Y.H., Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, W.H., 2007. Arsenic trioxide inhibits growth of As4.1 juxtaglomerular  
717 cells via cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis. *American Journal of Physiology-*  
718 *Renal Physiology* 293, F511–F520. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00385.2006>

719 Hoischen, C., Monajembashi, S., Weisshart, K., Hemmerich, P., 2018. Multimodal Light Microscopy  
720 Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear  
721 Bodies. *Front. Oncol.* 8, 125. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00125>

722 Hsu, K.-S., Kao, H.-Y., 2018. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell &*  
723 *Bioscience* 8. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8>

724 Iaccarino, L., Ottone, T., Divona, M., Cicconi, L., Cairoli, R., Voso, M.T., Lo-Coco, F., 2016. Mutations  
725 affecting both the rearranged and the unrearranged *PML* alleles in refractory acute  
726 promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 172, 909–913. <https://doi.org/10.1111/bjh.13910>

727 Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier,  
728 C., Soilihi, H., Raught, B., de Thé, H., 2010. PML/RARA Oxidation and Arsenic Binding Initiate the  
729 Antileukemia Response of As2O3. *Cancer Cell* 18, 88–98.  
730 <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.003>

731 Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R.,  
732 Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-  
733 Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski,  
734 M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior,  
735 A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction  
736 with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

737 Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125–132.  
738 <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>

739 Kim, J., Han, K.Y., Khanna, N., Ha, T., Belmont, A.S., 2019. Nuclear speckle fusion via long-range  
740 directional motion regulates speckle morphology after transcriptional inhibition. *Journal of Cell*  
741 *Science* jcs.226563. <https://doi.org/10.1242/jcs.226563>

742 Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thépot, J., Juhlin, L.,  
743 Degos, L., Calvo, F., de Thé, H., 1995. The PML growth-suppressor has an altered expression in  
744 human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315–1324.

745 Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., 2018. PML nuclear bodies: from architecture to function. *Current*  
746 *Opinion in Cell Biology* 52, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011>

747 Lallemand-Breitenbach, V., De Thé, H., 2010. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in*  
748 *Biology* 2, a000661–a000661. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000661>

749 Lallemand-Breitenbach, V., Guillemain, M.-C., Janin, A., Daniel, M.-T., Degos, L., Kogan, S.C., Michael  
750 Bishop, J., de Thé, H., 1999. Retinoic Acid and Arsenic Synergize to Eradicate Leukemic Cells in a  
751 Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia. *Journal of Experimental Medicine* 189, 1043–  
752 1052. <https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1043>

753 Lehmann-Che, J., Bally, C., de Thé, H., 2014. Resistance to Therapy in Acute Promyelocytic Leukemia. *N*  
754 *Engl J Med* 371, 1170–1172. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1409040>

755 Liebschner, D., Afonine, P.V., Baker, M.L., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Croll, T.I., Hintze, B., Hung, L.-W., Jain,  
756 S., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R.D., Poon, B.K., Prisant, M.G., Read, R.J., Richardson,  
757 J.S., Richardson, D.C., Sammito, M.D., Sobolev, O.V., Stockwell, D.H., Terwilliger, T.C.,  
758 Urzhumtsev, A.G., Videau, L.L., Williams, C.J., Adams, P.D., 2019. Macromolecular structure  
759 determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*. *Acta*  
760 *Crystallogr D Struct Biol* 75, 861–877. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>

761 Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S.M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi,  
762 L., Di Bona, E., Specchia, G., Sica, S., Divona, M., Levis, A., Fiedler, W., Cerqui, E., Breccia, M.,  
763 Fioritoni, G., Salih, H.R., Cazzola, M., Melillo, L., Carella, A.M., Brandts, C.H., Morra, E., von  
764 Lilienfeld-Toal, M., Hertenstein, B., Wattad, M., Lübbert, M., Hänel, M., Schmitz, N., Link, H.,  
765 Kropp, M.G., Rambaldi, A., La Nasa, G., Luppi, M., Ciceri, F., Finizio, O., Venditti, A., Fabbiano, F.,  
766 Döhner, K., Sauer, M., Ganser, A., Amadori, S., Mandelli, F., Döhner, H., Ehninger, G., Schlenk,  
767 R.F., Platzbecker, U., 2013. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia.  
768 *N Engl J Med* 369, 111–121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300874>

769 Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A.R.N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A.,  
770 Lopez, R., 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic*  
771 *Acids Research* 50, W276–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>

772 Mann, J.R., Donnelly, C.J., 2021. RNA modulates physiological and neuropathological protein phase  
773 transitions. *Neuron* 109, 2663–2681. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.023>

774 Mathews, V., George, B., Lakshmi, K.M., Viswabandya, A., Bajel, A., Balasubramanian, P., Shaji, R.V.,  
775 Srivastava, V.M., Srivastava, A., Chandy, M., 2006. Single-agent arsenic trioxide in the treatment  
776 of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity.  
777 *Blood* 107, 2627–2632. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3532>

778 McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. *Phaser*  
779 crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40, 658–674.  
780 <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>

781 Mehta, S., Zhang, J., 2022. Liquid–liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in  
782 cancer. *Nat Rev Cancer* 22, 239–252. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00444-7>

783 Naranmandura, H., Suzuki, K.T., 2008. Identification of the Major Arsenic-Binding Protein in Rat Plasma  
784 As the Ternary Dimethylarsinous–Hemoglobin–Haptoglobin Complex. *Chem. Res. Toxicol.* 21,  
785 678–685. <https://doi.org/10.1021/tx700383g>

786 Niwa-Kawakita, M., Ferhi, O., Soilihi, H., Le Bras, M., Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., 2017. PML is  
787 a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *The Journal of Experimental Medicine*  
788 *jem.20160301*. <https://doi.org/10.1084/jem.20160301>

789 Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoykov, S., Mahamid, J., Saha, S.,  
790 Franzmann, T.M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L.A., Weigert, M., Myers, E.W.,  
791 Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A.A., Alberti, S., 2015. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS  
792 Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077.  
793 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047>

794 Reymond, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *The EMBO Journal* 20, 2140–  
795 2151. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2140>

796 Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., Niwa-Kawakita, M., Faklaris, O.,  
797 Setterblad, N., de Thé, H., Lallemand-Breitenbach, V., 2014. Oxidative stress–induced assembly  
798 of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *The Journal of Cell Biology* 204,  
799 931–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305148>

800 Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.* 113,  
801 7769–7792. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>

802 Shin, Y., Brangwynne, C.P., 2017. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* 357,  
803 eaaf4382. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4382>

804 Sprague, B.L., Pego, R.L., Stavreva, D.A., McNally, J.G., 2004. Analysis of Binding Reactions by  
805 Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophysical Journal* 86, 3473–3495.  
806 <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.026765>



807 Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saïb, A., Quignon, F., Pelicano, L.,  
808 Guillemin, M.C., Schindler, C., 1995. Transcriptional induction of the PML growth suppressor  
809 gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 11, 2565–2573.  
810 Tessier, S., Ferhi, O., Geoffroy, M.-C., González-Prieto, R., Canat, A., Quentin, S., Pla, M., Niwa-Kawakita,  
811 M., Bercier, P., Rérolle, D., Therizols, P., Fabre, E., Vertegaal, A.C.O., de Thé, H., Lallemand-  
812 Breitenbach, V., 2022. Exploration of nuclear body-enhanced sumoylation reveals that PML  
813 represses 2-cell features of embryonic stem cells. *Nat Commun* 13, 5726.  
814 <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33147-6>  
815 Uggè, M., Simoni, M., Fracassi, C., Bernardi, R., 2022. PML isoforms: a molecular basis for PML pleiotropic  
816 functions. *Trends in Biochemical Sciences* 47, 609–619.  
817 <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.02.002>  
818 Wagner, J.M., Roganowicz, M.D., Skorupka, K., Alam, S.L., Christensen, D., Doss, G., Wan, Y., Frank, G.A.,  
819 Ganser-Pornillos, B.K., Sundquist, W.I., Pornillos, O., 2016. Mechanism of B-box 2 domain-  
820 mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5 $\alpha$ . *eLife* 5, e16309.  
821 <https://doi.org/10.7554/eLife.16309>  
822 Wang, Q.Q., Zhou, X.Y., Zhang, Y.F., Bu, N., Zhou, J., Cao, F.L., Naranmandura, H., 2015. Methylated  
823 arsenic metabolites bind to PML protein but do not induce cellular differentiation and PML-  
824 RAR $\beta$ ; protein degradation. *Oncotarget* 6. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4662>  
825 Weerapana, E., Wang, C., Simon, G.M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M.B.D., Bachovchin, D.A., Mowen, K.,  
826 Baker, D., Cravatt, B.F., 2010. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in  
827 proteomes. *Nature* 468, 790–795. <https://doi.org/10.1038/nature09472>  
828 Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, C.,  
829 Maul, G., Dittrich, P., Hemmerich, P., 2008. Dynamics of component exchange at PML nuclear  
830 bodies. *Journal of Cell Science* 121, 2731–2743. <https://doi.org/10.1242/jcs.031922>  
831 Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B.,  
832 Leslie, A.G.W., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A.,  
833 Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S., 2011. Overview of the CCP 4 suite and current  
834 developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235–242.  
835 <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>  
836 Wu, H.-C., Rérolle, D., Berthier, C., Hleihel, R., Sakamoto, T., Quentin, S., Benhenda, S., Morganti, C., Wu,  
837 C., Conte, L., Rimsky, S., Seibert, M., Clappier, E., Souquere, S., Gachet, S., Soulier, J., Durand, S.,  
838 Trowbridge, J.J., Bénit, P., Rustin, P., El Hajj, H., Raffoux, E., Ades, L., Itzykson, R., Dombret, H.,  
839 Fenaux, P., Espeli, O., Kroemer, G., Brunetti, L., Mak, T.W., Lallemand-Breitenbach, V.,  
840 Bazarbachi, A., Falini, B., Ito, K., Martelli, M.P., de Thé, H., 2021. Actinomycin D Targets NPM1c-  
841 Primed Mitochondria to Restore PML-Driven Senescence in AML Therapy. *Cancer Discovery* 11,  
842 3198–3213. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0177>  
843 Zhang, H., Yang, L., Ling, J., Czajkowsky, D.M., Wang, J.-F., Zhang, X.-W., Zhou, Y.-M., Ge, F., Yang, M.,  
844 Xiong, Q., Guo, S.-J., Le, H.-Y., Wu, S.-F., Yan, W., Liu, B., Zhu, H., Chen, Z., Tao, S., 2015.  
845 Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by  
846 arsenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 15084–15089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521316112>  
847 Zhang, X.W., Yan, X.J., Zhou, Z.R., Yang, F.F., Wu, Z.Y., Sun, H.B., Liang, W.X., Song, A.X., Lallemand-  
848 Breitenbach, V., Jeanne, M., Zhang, Q.Y., Yang, H.Y., Huang, Q.H., Zhou, G.B., Tong, J.H., Zhang,  
849 Y., Wu, J.H., Hu, H.Y., de Thé, H., Chen, S.J., Chen, Z., 2010. Arsenic Trioxide Controls the Fate of  
850 the PML-RAR Oncoprotein by Directly Binding PML. *Science* 328, 240–243.  
851 <https://doi.org/10.1126/science.1183424>  
852 Zhu, H.-H., Qin, Y.-Z., Huang, X.-J., 2014. Resistance to Arsenic Therapy in Acute Promyelocytic Leukemia.  
853 *N Engl J Med* 370, 1864–1866. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1316382>  
854

855 **Fig. 1. PML NBs display hallmarks of LLPS and switch from liquid-like to**  
856 **gel-like features upon ATO**

- 857 A. STED analysis of a spherical core-shell PML NB. PML assembles to form the shell of the NB. Scale  
858 bar : 1 $\mu$ m.
- 859 B. Representative time-lapse analysis of PML NB apparition in living MEF *Pml KO* right after stably  
860 expressing GFP-PML WT and showing that PML segregates in a dot with increased intensity from  
861 a diffuse fraction. The white circle indicates the nucleus. Time interval between two images : 2h30,  
862 scale bar : 5 $\mu$ m.
- 863 C. PML NBs undergo fusion with spherical relaxation, similar to liquid-like droplets (left).  
864 Representative time-lapse analysis of MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT, and  
865 quantification of PML NBs effective viscosity (right). Scale bar : 1 $\mu$ m. The results are expressed as  
866 the mean value of n=21 fusion events from N=21 cells from three independent experiments  $\pm$  SD.
- 867 D. Quantification of PML NBs nucleation, fusion and fission events over one hour. The results are  
868 expressed as the mean value of n=37 cells from five independent experiments  $\pm$  SD.
- 869 E. FRAP analyses of GFP-PML WT dynamics at NBs in control (black) or ATO-treated MEFs (1 $\mu$ M,  
870 30mn, dark blue), indicating liquid-to gel-like transition upon ATO. The results are expressed as  
871 the mean value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over five independent  
872 experiments  $\pm$  SD. The immobile fraction of GFP-PML WT at NBs, calculated by fitting experimental  
873 values to an exponential model, is indicated as a percentage of the total relative fluorescence  
874 intensity (R.F.I.) on the right. The half recovery time of GFP-PML WT in control conditions is also  
875 displayed.
- 876 F. Confocal microscopy analysis of PML NB formation in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT  
877 or GFP-PML-RARA WT treated with 1 $\mu$ M of ATO for 1h. Scale bar : 5 $\mu$ m.
- 878 G. STED analysis of incomplete PML NB fusion upon ATO, forming bead strings. Scale bar : 1 $\mu$ m.
- 879 H. Comparison between GFP-PML WT and GFP-PML-RARA WT dynamics at NBs by FRAP. PML-RARA  
880 oncoprotein displays an increased dynamic exchange at NBs (green) in comparison to the GFP-  
881 PML WT (black). ATO treatment (1 $\mu$ M, 30mn), induces a liquid-to gel-like transition of GFP-PML-  
882 RARA WT (purple), resembling GFP-PML WT dynamics. The results are expressed as the mean  
883 value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over five independent experiments  $\pm$   
884 SD.

885  
886 **Fig. 2. PML NB assembly depends on a reactive cysteine in B2 zinc finger**  
887 **domain, but not inter-molecular disulfide bonds**

- 888 A. Confocal microscopy analysis of PML NB formation upon cysteine alkylation with NEM (N-ethyl-  
889 maleimide 10 $\mu$ M, 1h) or ATO (1 $\mu$ M, 1h) used alone or in combination after a 30mn pre-treatment,  
890 in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT. Scale bar : 5 $\mu$ m.
- 891 B. Western blot analysis of PML disulfide bond formation in MEF *Pml KO* stably expressing wild-type  
892 or the indicated HA-PML mutants upon oxidative stress induced by ATO (10 $\mu$ M, 1h) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
893 (500 $\mu$ M, 1h), showing C213 and C389 are responsible for intermolecular disulfide bonds

894 formation. The brackets on the left side of the blot respectively indicate PML monomer, PML  
895 conjugated with SUMO and disulfide-bonded PML. The numbers on the right side represent the  
896 molecular weight ladder. Blue arrows point to the disulfide bonded PML.

897 C. Confocal microscopy analysis of PML NBs upon ATO (1 $\mu$ M, 1h) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 $\mu$ M, 1h) stress in MEF  
898 *Pml KO* stably expressing wild-type or the indicated HA-PML mutants, revealing that C213S but  
899 not C389S is required for proper NB assembly and ATO-induced PML NB formation. Scale bar :  
900 5 $\mu$ m.

901

### 902 **Fig. 3. Uncovering PML B2 structure**

903 A. Conservation of PML B2 box through evolution. The top part indicates the position of the two zinc  
904 fingers intertwined in a cross-brace. The highly conserved amino acids implicated in Zn  
905 coordination are highlighted in black bold font. The free cysteine in position 213, which is not  
906 involved in zinc coordination is highlighted in blue bold font. The secondary structures of PML B2-  
907 box are shown under the sequence. An arrow is used to highlight a beta-sheet while the loop  
908 indicates the  $\alpha$ -helix. A star highlights all the evolutionary conserved amino acids and the highly  
909 conserved sequence of PML B2 box is highlighted in the blue box. The bottom part is a summary  
910 of the published mutations in the B2 box of PML-RARA in therapy-resistant APL patients.

911 B. Crystal structure of PML B2 monomer shown in a cartoon representation. PML B2 folds around  
912 two zinc fingers organized in a cross-brace. The C3H1 zinc coordination leaves the C213 free to  
913 interact with the substrate. The  $\alpha$ -helix formed by amino-acids C213-L218 exposes C213 towards  
914 the outside of the structure. The Zn ions are shown in sphere representation and the C213 is  
915 highlighted in blue bold font.

916 C. (Left) Composite omit map contoured at 2  $\sigma$  of a segment from PML B2 near Zinc finger 1 at 2.1  
917  $\text{\AA}$ . C213 appears as a free cysteine (highlighted in blue bold font). (Right) Composite omit map  
918 contoured at 2  $\sigma$  of a segment from PML B2 near Zinc finger 2 at 2.1  $\text{\AA}$ . C227, not D219, is  
919 coordinating Zn<sup>2+</sup>. Zinc ions are shown as spheres.

920

### 921 **Fig. 4. PML B2 $\alpha$ -helix controls PML assembly and dynamics**

922 A. Defective NB assembly with PML B2 mutants revealed by confocal microscopy analysis of MEF *Pml*  
923 *KO* stably expressing wild-type or the indicated GFP-PML mutants. Scale bar : 5 $\mu$ m. Evolutionary  
924 conserved amino acids are underlined in blue. Amino acids involved in zinc coordination are  
925 highlighted in black bold font. The secondary structures of PML B2-box are shown above of the  
926 sequence. An arrow is used to highlight a beta-sheet while the loop indicates the  $\alpha$ -helix. The free  
927 cysteine in position 213, which is not involved in zinc coordination is highlighted in blue bold font.  
928 The black lines indicate the position of the mutated amino acids.

929 B. FRAP analysis of GFP-PML B2 mutants (blue) dynamics at NBs revealing differences between  
930 mutants harboring discrete mutations disrupting the zinc finger or mutations on the  $\alpha$ -helix, in  
931 comparison to GFP-PML WT (black). The results are expressed as the mean value of over n=20 NBs  
932 each from an individual cell, from over three independent experiments  $\pm$  SD. The immobile

933 fraction of GFP-PML at NBs, calculated by fitting experimental values to an exponential model, is  
934 indicated as a percentage of the total relative fluorescence intensity on the right.

935 C. Comparative plot of half maximal recovery time (left) and immobile fraction (right) of wild type  
936 and B2 mutants harboring discrete mutations on the  $\alpha$ -helix (blue) or mutations disrupting the  
937 zinc finger (green). The results are expressed as the mean value of over n=20 NBs each from an  
938 individual cell, from over three independent experiments  $\pm$  SD. On the graph, each grey dot  
939 represents an individual NB and statistical significance is calculated in comparison to the GFP-PML  
940 WT. n.s.: not statistically significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 Mann-Whitney test.

941 D. Superposition of WT PML B2 crystal structure (cyan) with C213A/A216V double mutant B2 crystal  
942 structure (orange) showing that these mutations on the B2  $\alpha$ -helix do not disrupt the 3D  
943 conformation. Residues around  $\alpha$ 1 are displayed.

944

## 945 **Fig. 5. PML B2 can mediate PML trimerization**

946 A. Modelling of PML B2 trimer. B2 monomers are colored in green, grey and pink. The colored  $\alpha$ 1,  
947  $\alpha$ 2 and  $\alpha$ 3 refer to the  $\alpha$ -helix of each B2 monomer. The letters indicated in exponent for each  
948 amino acid refer to their affiliation to a monomer : a amino acids correspond to the green  
949 monomer, b amino acids refer to the pink monomer, c amino acids refer to the grey monomer.

950 B. Close-up view of PML B2 trimer model showing hydrophobic interactions between the  $\alpha$ -helices.  
951 The amino acids involved in the hydrophobic interactions are highlighted in blue bold font. The  
952 hydrophobic interactions are represented as dash lines. The distance between the hydrophobic  
953 amino acids is indicated in Å.

954 C. SEC-MALS analysis showing that PML B2 exists as a mixture of monomeric, dimeric and trimeric  
955 forms (top). The mutation of C213 induces a shift towards monomeric and dimeric assembly  
956 (bottom) (0.3 mM TCEP MBP-B2 (MW 46.2 kDa, 2mg/ml)

957 D. Point mutations targeting the amino acids predicted to mediate trimerization of the B2 domain  
958 alter PML NB formation. Confocal microscopy analysis of PML NBs formation in MEF *Pml* KO stably  
959 expressing wild-type or the indicated GFP-PML mutants. Scale bar : 5 $\mu$ m.

960 E. Quantification of NB formation in the PML WT or B2 mutants. The results are expressed as the  
961 mean value of three independent experiments  $\pm$  SD. Each dot represents the quantification of the  
962 numbers of NBs in 50-300 cells in an independent experiment.

963 F. PML assembles in filaments upon reinforcement of the hydrophobicity of the amino acid in  
964 position 218 (GFP-PML L218F) (left). Scale bar : 5 $\mu$ m. FRAP analysis of the exchange rates at  
965 filaments of GFP-PML L218F mutant (blue) in comparison to GFP-PML WT (black) (right). The  
966 results are expressed as the mean value of over n=20 NBs each from an individual cell, from over  
967 three independent experiments  $\pm$  SD. The blue arrow points to the decreased mobility of the  
968 mutant GFP-PML L218F protein at filaments.

969

## 970 **Fig. 6. ATO binding to B2 trimer is responsible for ATO-induced phase** 971 **transition**

- 972 A. Modelling of PML B2 trimer assembled around an arsenic atom. The key C213 (highlighted in blue  
973 bold font) is organized in a triad in the very center of the PML B2 helix trimer. At a 180° angle from  
974 C213, L217 coordinates the trimer. ATO is shown as an orange sphere. The distance between the  
975 C213 residues of the B2 monomers (highlighted in bold blue font) is coherent with ATO binding.  
976 The predicted distance between the arsenic atom and C213 is 2.7 Å.
- 977 B. Trivalent metalloid oxides are responsible for the liquid-like to gel-like transition of PML NBs. FRAP  
978 analyses of PML dynamics at NBs in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT in untreated cells  
979 (black), or cells treated with the trivalent metalloid oxides ATO (1µM, 30mn, dark blue) and STO  
980 (1µM, 30mn, dark green) indicating liquid-like to gel-like transition upon treatment. In contrast,  
981 divalent arsenic (MMA, 1µM, 30mn, light blue) does not induce a phase transition. The results are  
982 expressed as the mean value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over three  
983 independent experiments ± SD.
- 984 C. Defective NB assembly upon ATO (1µM, 1h) with PML B2 mutants revealed by confocal microscopy  
985 analysis of MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT or the indicated mutants. Scale bar : 5µm.
- 986 D. FRAP analysis of GFP-PML B2 mutants dynamics at NBs in control (black) or ATO-treated MEFs  
987 (1µM, 30mn, blue) *Pml KO* stably expressing the various PML mutants, The results are expressed  
988 as the mean value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over three independent  
989 experiments ± SD. The immobile fraction of GFP-PML at NBs, calculated by fitting experimental  
990 values to an exponential model, is indicated as a percentage of the total relative fluorescence  
991 intensity on the right.
- 992 E. Western blot analysis of PML sumoylation defect in MEF *Pml KO* stably expressing mutant GFP-  
993 PML in basal conditions and upon ATO (1µM, 1h).
- 994 F. NBs generated by B2 α-helix mutants no longer bind red fluorescent arsenic (ReAsH).  
995 Representative airyscan image of ReAsH colocalization to NBs in MEF *Pml KO* stably expressing  
996 GFP-PML WT or the indicated mutants. Scale bar :1µm.
- 997 G. Confocal microscopy analysis of NB formation in MEF *Pml KO* stably expressing various PML C213  
998 mutants. Scale bar : 5µm.
- 999 H. C213V mutation does not impact PML dynamics at NBs but abrogates arsenic-induced liquid to  
1000 gel-like transition, as revealed by FRAP analysis of PML at NBs in MEF *Pml KO* stably expressing  
1001 GFP-PML C213V, upon ATO (1µM, 30mn, blue) when compared to untreated cells (black). The  
1002 results are expressed as the mean value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over  
1003 three independent experiments ± SD. The immobile fraction of GFP-PML at NBs, calculated by  
1004 fitting experimental values to an exponential model, is indicated as a percentage of the total  
1005 relative fluorescence intensity on the right.
- 1006 I. All C213 mutants are insensible to ATO-induced hypersumoylation. Western blot analysis of PML  
1007 sumoylation in MEF *Pml KO* stably expressing various GFP-PML C213 mutants treated or not with  
1008 ATO (1µM, 1h).
- 1009 J. PML NB formation upon cysteine alkylation with NEM (N-Ethyl-maleimide 10µM, 1h) in MEF *Pml*  
1010 *KO* stably expressing wild-type or the indicated GFP-PML mutants showing that C213 is the primary  
1011 cysteine regulating PML NB assembly.
- 1012 K. A model of PML NB liquid to gel-like transition upon ATO. PML NBs can transition from liquid to  
1013 gel like structure. The correct trimerization of PML B2, regroups three C213 in the center of the

1014 structure. This C213 triad is responsible for PML stereo-selectivity to arsenic and gel-like transition.  
1015 On the scheme the asterisk represents C213 modification.

1016

## 1017 **Fig. 7. PML B2 trimer is responsible for PML-RARA sensitivity to ATO.**

1018 A. Confocal microscopy analysis of PML (endogenous) and PML-RARA distribution in the nucleus  
1019 showing that PML-RARA needs C213 for the recruitment of endogenous PML to microdots and  
1020 arsenic-induced NB-reassembly from the oncogenic chimeric proteins. Experiments were  
1021 performed in Lin<sup>-</sup> hematopoietic progenitors stably expressing PML-RARA WT or the indicated  
1022 mutants. Scale bar : 5 $\mu$ m.

1023 B. FRAP analysis of GFP-PML-RARA dynamics at microdots in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML-  
1024 RARA WT (black) or GFP-PML-RARA C213V (light green) showing a reduction of mobility after  
1025 increasing B2  $\alpha$ -helix hydrophobic interactions.

1026 C. FRAP analysis of GFP-PML-RARA dynamics at microdots in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML-  
1027 RARA C213V in untreated (light green) or ATO-treated cells (1 $\mu$ M, 30mn, dark green), showing  
1028 insensitivity to ATO.

1029 D. Western blot analysis of PML-RARA sumoylation in Lin<sup>-</sup> hematopoietic progenitors stably  
1030 expressing PML-RARA WT, PML-RARA C213S or PML-RARA C213V in basal conditions and upon  
1031 ATO (1 $\mu$ M, 30mn). The blue arrow indicates ATO-induced hypersumoylation

1032 E. PML-RARA mutation on C213 blocks ATO-induced loss of clonogenic activity. Mouse  
1033 hematopoietic progenitors were transformed by PML-RARA WT or PML-RARA C213V  
1034 overexpression and propagated in methylcellulose cultures upon ATO treatment (0,3 $\mu$ M, 1week,  
1035 green bars). Treated cells were then regrown without further drug exposure (red bars).

1036

## 1037 **Supplementary Fig. S1. (Movie)**

1038 Representative fusion event between two NBs in living MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT. Time  
1039 between frames : 30 sec.

## 1040 **Supplementary Fig. S2. (Movie)**

1041 Representative incomplete fusion events between two NBs in response to ATO (1 $\mu$ M), forming bead  
1042 strings, in living MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT. Time between frames : 30 sec.

1043

## 1044 **Supplementary Fig. S3.**

1045 A. Quantification of the increase in PML nucleoplasmic fraction in living MEF *Pml KO* right after stably  
1046 expressing GFP-PML WT, expressed as the mean of absolute fluorescence intensity of n=19 cells  
1047 from two independent experiments  $\pm$  SEM. The black line corresponds to the fit of experimental  
1048 data to an exponential model.

1049 B. FRAP analysis of progressive liquid-to-gel like transition of PML NBs upon ATO treatment on MEF  
1050 *Pml KO* expressing GFP-PML WT. PML dynamics at NBs are not modified by a 10 minute (red) or  
1051 20 minute treatment (green) with ATO, in comparison to control (black). The liquid-like to gel-like  
1052 transition is reached after thirty minutes of treatment (dark blue). The results are expressed as  
1053 the mean value of over n=14 samples  $\pm$  SD each from an individual cell, from over three  
1054 independent experiments  $\pm$  SD.

1055

## 1056 **Supplementary Fig. S4.**

1057 A. Crystal structure of MBP PML-Box2 (B2) fusion protein. B2 (cyan) interacts with the MBP it fused  
1058 to by forming an anti-parallel beta sheet (B2  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 with MBP  $\beta$ 8,  $\beta$ 7). B2 also packs against a  
1059 neighboring MBP molecule in the crystal (MBP') through  $\alpha$ 1 residues L217, L218. MBP  $\beta$ 8,  $\beta$ 7 are  
1060 colored deep green, MBP regions interacting with B2  $\alpha$ 1 is colored light pink. Zinc atoms are  
1061 depicted as grey spheres.

1062 B. Close up view of the interface between MBP  $\beta$ 8 (deep green) and B2  $\beta$ 1 (cyan) which is mediated  
1063 by hydrogen bonding (dashed lines) between main chain atoms from MBP G176, Y178 and I180  
1064 with those from C-terminus.

1065 C. Detailed analysis of the interface between B2  $\alpha$ 1 with a neighboring MBP molecule. L217 and L218  
1066 of B2 insert into a hydrophobic pocket formed by a group of MBP residues shown as sticks.

1067 D. Ribbon representation of PML B2 from the residues coordinating Zinc atoms (Zn1, Zn2) are shown  
1068 as sticks. D219 side chain is also displayed. N: N-terminus; C: C-terminus. C227 is highlighted in  
1069 bold font.

1070 E. Ribbon diagram of PML B2 from Alpha fold 2 (AF2) prediction. Residues coordinating Zinc atoms  
1071 (Zn1, Zn2) are shown as sticks. C227 side chain is also displayed. Semi-transparent spheres are  
1072 modelled Zinc atoms as they are not presented in the predicted structure. D219, not C227, is  
1073 coordinating Zn2. D219 is highlighted in bold font. N: N-terminus; C: C-terminus.

1074 F. Ribbon schematic of Trim5 $\alpha$  B2 structure from PDB 5IEA. Zinc coordinating residues are displayed  
1075 as sticks. Trim5 $\alpha$  B2 protein structure resembles the AF2 predicted PML B2 structure. N: N-  
1076 terminus; C: C-terminus.

1077 G. Sequence alignment of the B2 domain of PML, TRIM5 $\alpha$  and TRIM28 showing that the conserved  
1078 sequence in PML B2 is not conserved among the TRIM family (blue box). The conserved amino  
1079 acids involved in zinc coordination are highlighted in yellow and those not conserved are highlighted  
1080 in green boxes.

1081 H. Composite omit map contoured at 2.0  $\sigma$  of a segment from PML B2 A216V-C213A double mutant  
1082 near Zinc finger 1 at 2.5  $\text{\AA}$ .

1083

## 1084 **Supplementary Fig. S5.**

1085 A. Quantification of NB formation in PML C212S and C213S mutants. The results are expressed as the  
1086 mean value of three independent experiments  $\pm$  SD. Each dot represents the quantification of the  
1087 numbers of NBs in 50-300 cells in an independent experiment.

- 1088 B. FRAP analysis of GFP-PML A216G (blue) at NBs revealing differences in PML dynamics at NBs in  
 1089 comparison to GFP-PML WT (black). The results are expressed as the mean value of over n=20 NBs  
 1090 each from an individual cell, from over three independent experiments  $\pm$  SD. The immobile  
 1091 fraction of GFP-PML at NBs, calculated by fitting experimental values to an exponential model, is  
 1092 indicated as a percentage of the total relative fluorescence intensity on the right.
- 1093 C. PML also assembles in filaments upon reinforcement of the hydrophobicity of the B2  $\alpha$ -helix by  
 1094 substituting L218 by a tyrosine. Confocal microscopy analysis of HeLa cells stably expressing FLAG-  
 1095 PML L218Y. Scale bar : 5 $\mu$ m.
- 1096 D. Confocal microscopy analysis of ATO effect in MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML L218F upon  
 1097 ATO treatment (1 $\mu$ M, 1h) reveals that PML filaments are ATO-insensitive. Scale bar : 5 $\mu$ m.
- 1098 E. Mutations next to amino-acids coordinating trimeric assembly of the B2 domain does not abrogate  
 1099 NB formation, as revealed by confocal microscopy analysis of MEF *Pml KO* stably expressing GFP-  
 1100 PML Y203A mutant. Scale bar : 5 $\mu$ m.

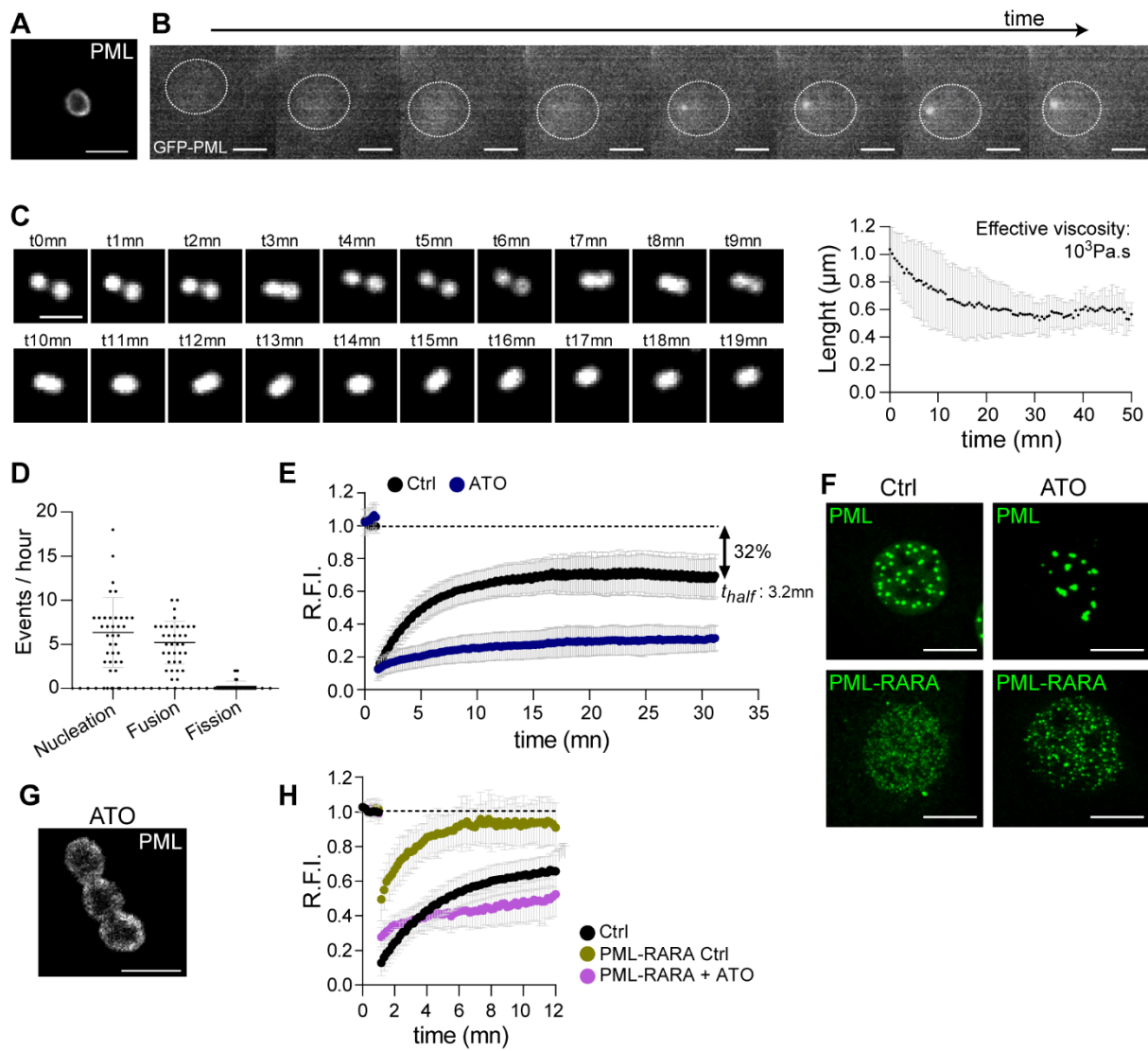
1101

## 1102 **Supplementary Fig. S6.**

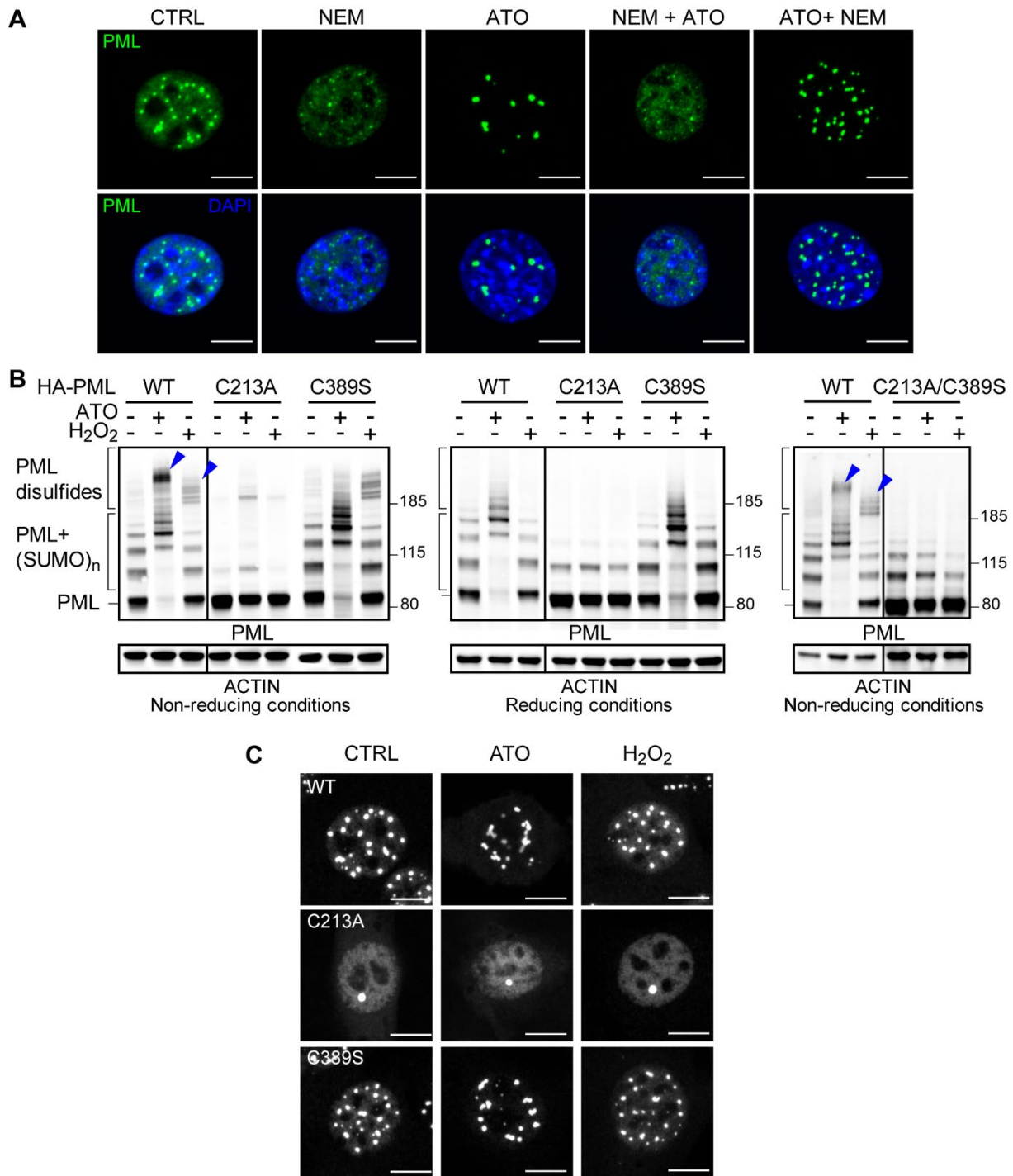
- 1103 A. Ribbon diagram of PML B2 from Alpha fold 2 (AF2) prediction modelled as a PML B2 trimer showing  
 1104 that L217 is located at a 180° angle from C213. Arsenic is shown as an orange sphere. The distance  
 1105 between the arsenic atom and C213 is 2.7 Å.
- 1106 B. Surface representation of modelled B2 trimer. B2 monomers are colored in green, grey, and pink.  
 1107 Arsenic is shown as an orange sphere in the center of the trimer.
- 1108 C. ATO-induced PML NB formation can be mimicked by other trivalent metalloid oxides like STO as  
 1109 revealed by confocal microscopy analysis of MEF *Pml KO* stably expressing HA-PML WT upon ATO  
 1110 or STO treatment (1 $\mu$ M, 1h). Scale bar : 5 $\mu$ m.
- 1111 D. ATO-induced PML hyper-sumoylation can be mimicked by other trivalent metalloid oxides like STO  
 1112 as revealed by Western blot analysis of PML sumoylation in MEF *Pml KO* stably expressing HA-PML  
 1113 WT upon ATO or STO treatment (1 $\mu$ M, 1h).
- 1114 E. FRAP analysis of the GFP-PML C189S mutant dynamics at NBs in control (black) or ATO-treated  
 1115 MEFs (1 $\mu$ M, 30mn, dark blue), The results are expressed as the mean value of over n=20 NBs, each  
 1116 from an individual cell, from over three independent experiments  $\pm$  SD. The immobile fraction of  
 1117 GFP-PML at NBs, calculated by fitting experimental values to an exponential model, is indicated as  
 1118 a percentage of the total relative fluorescence intensity on the right.
- 1119 F. FRAP analysis of the GFP-PML A216V mutant dynamics at NBs in control (black) or ATO-treated  
 1120 MEFs (1 $\mu$ M, 30mn, dark blue) showing partial sensitivity to the drug, The results are expressed as  
 1121 the mean value of over n=20 NBs, each from an individual cell, from over three independent  
 1122 experiments  $\pm$  SD. The immobile fraction of GFP-PML at NBs, calculated by fitting experimental  
 1123 values to an exponential model, is indicated as a percentage of the total relative fluorescence  
 1124 intensity on the right.
- 1125 G. Confocal microscopy analysis of MEF *Pml KO* stably expressing GFP-PML WT showing the  
 1126 irreversibility of ATO effect on NB formation. MEF cells were treated with ATO (1 $\mu$ M, 30mn). ATO  
 1127 was then removed for 1 or 4h. SUMO2/3 colocalisation to NBs is also displayed. Scale bar : 5 $\mu$ m.



**Figure 1:**




**Figure 2:**




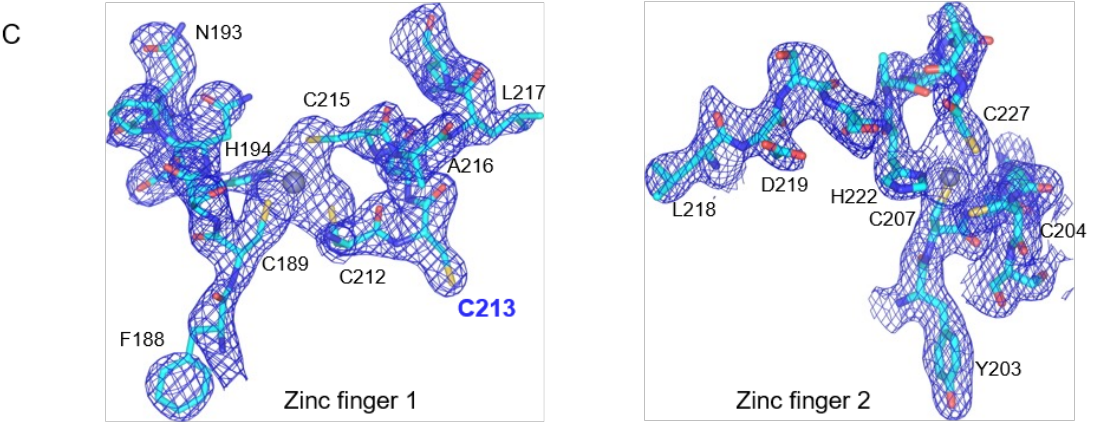
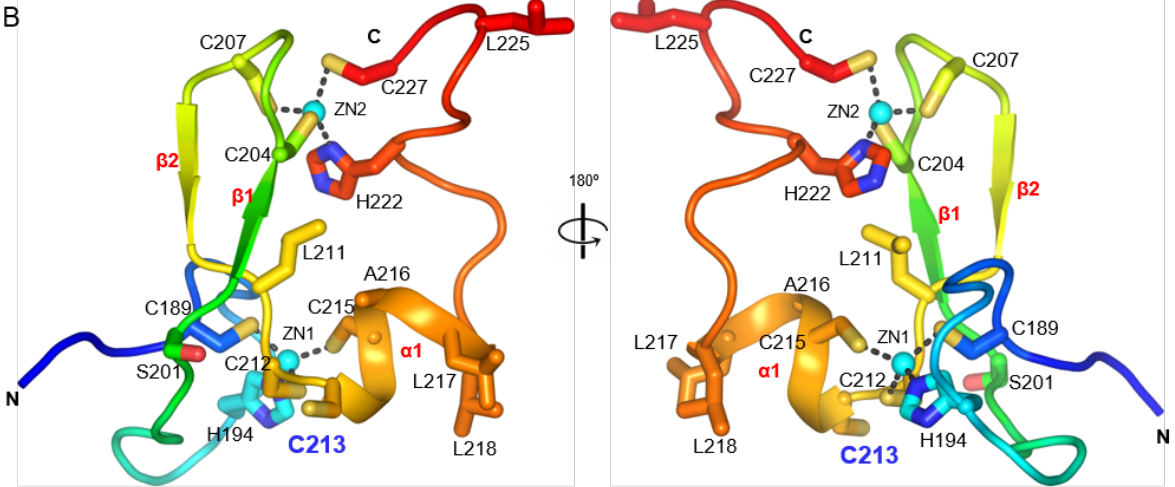
**Figure 3:**

**A**

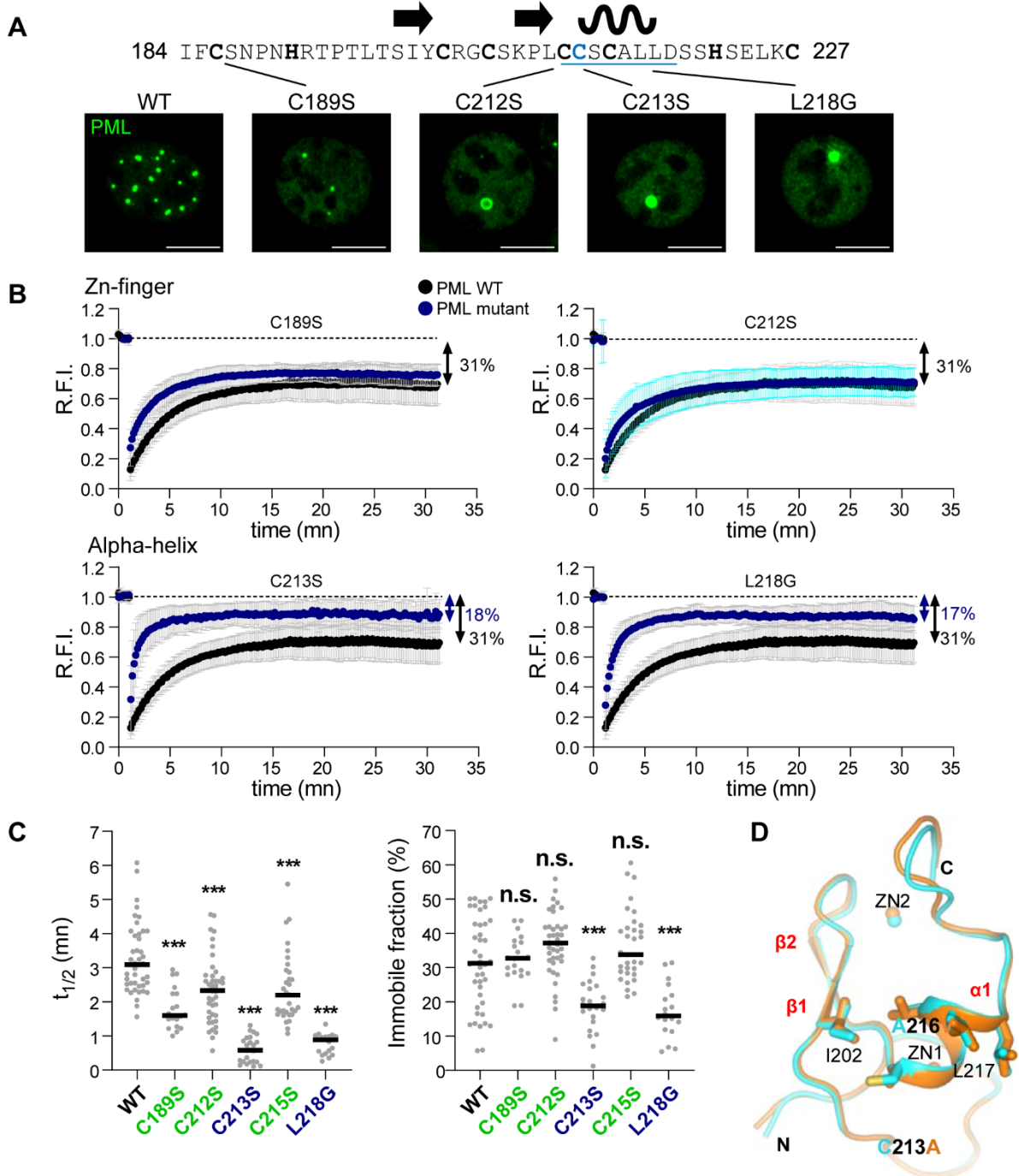
	187			Zn	212		Zn	219		227																																
Human	I	F	C	S	N	P	N	H	R	T	P	T	L	--	T	S	I	Y	C	R	G	C	S	K	P	L	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>C</b>
Macaca	I	F	C	S	N	P	N	H	R	T	P	T	L	--	T	S	I	Y	C	R	G	C	S	K	P	L	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>C</b>
Mouse	I	F	C	S	N	T	N	H	R	N	P	A	L	--	T	D	I	Y	C	R	G	C	A	K	P	L	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>C</b>
Bat	I	F	C	A	N	S	N	H	R	N	P	T	L	--	T	S	I	Y	C	R	G	C	S	K	P	L	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>C</b>
Chicken	S	S	C	P	I	P	T	H	Q	N	Q	T	--	--	L	S	I	Y	C	K	Q	C	C	R	A	V	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>I</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>C</b>
Turtle	L	F	C	S	N	P	T	H	N	N	Q	Y	I	T	S	S	I	Y	C	R	G	C	L	K	P	L	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>C</b>
		*		*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*																


  
**PML/RAR $\alpha$**   
**(ATO-resistant)**

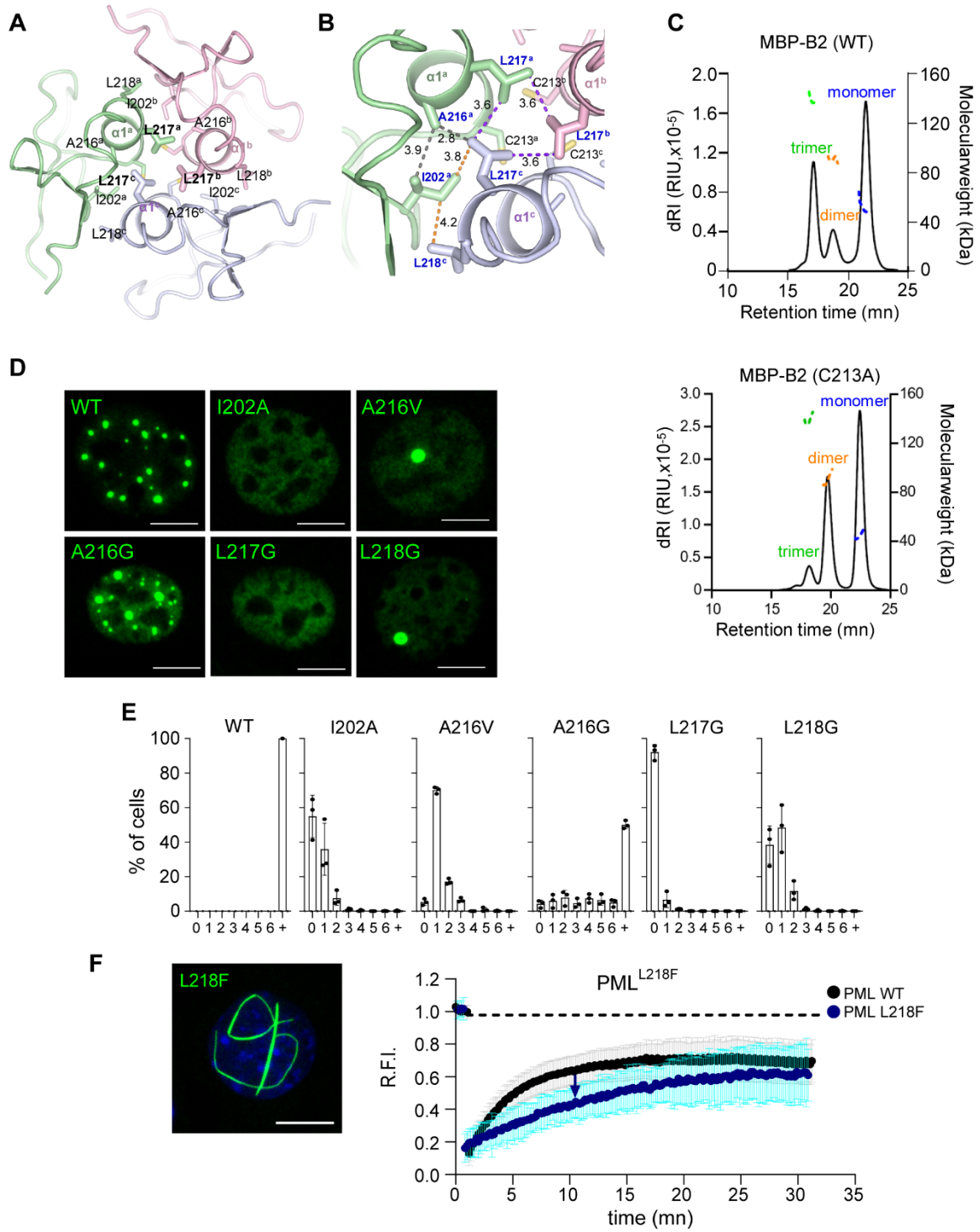

  
**P R L V F P H G G**  
**S T E C**  
**F**



**Figure 4:**

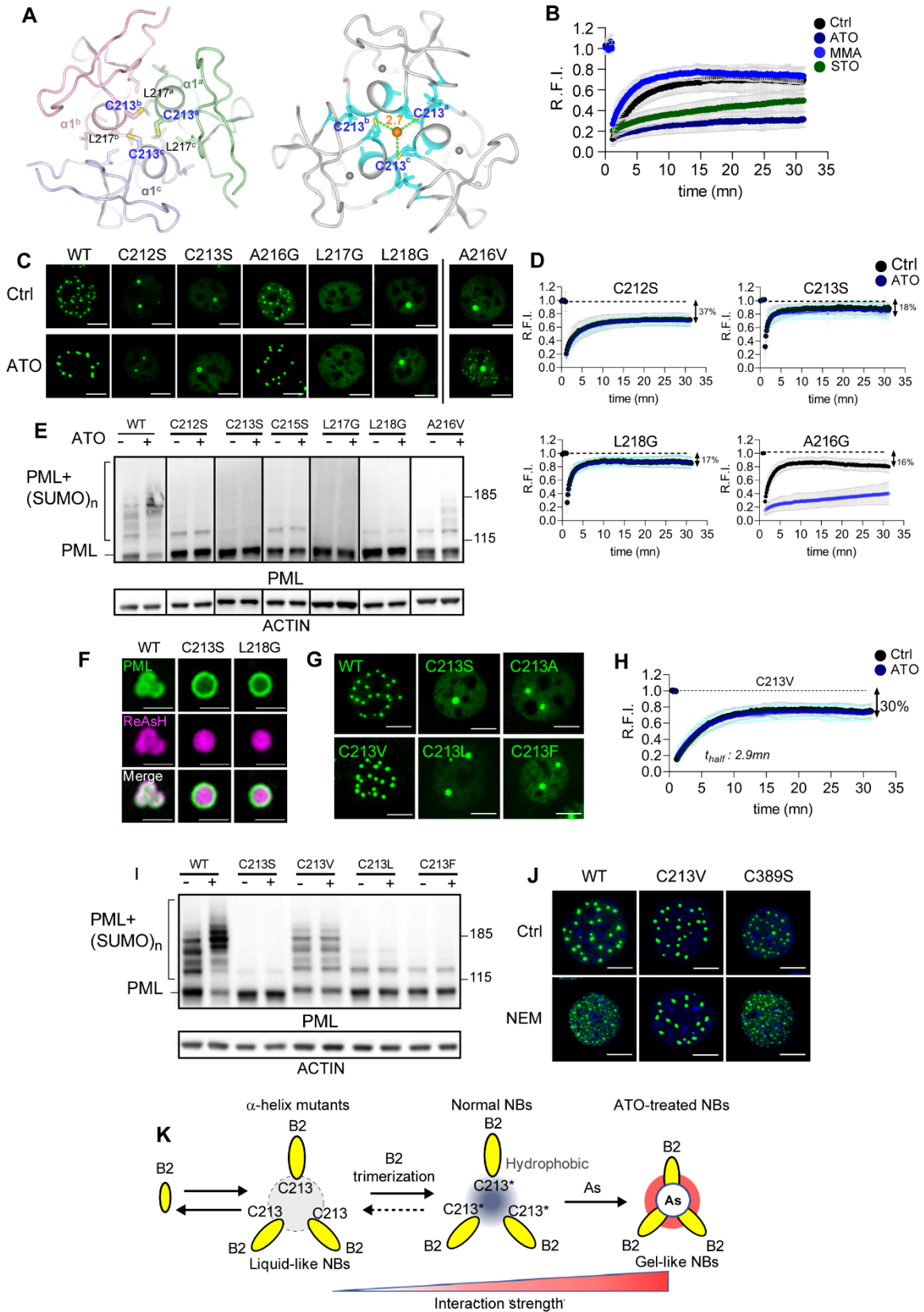


**Figure 5:**

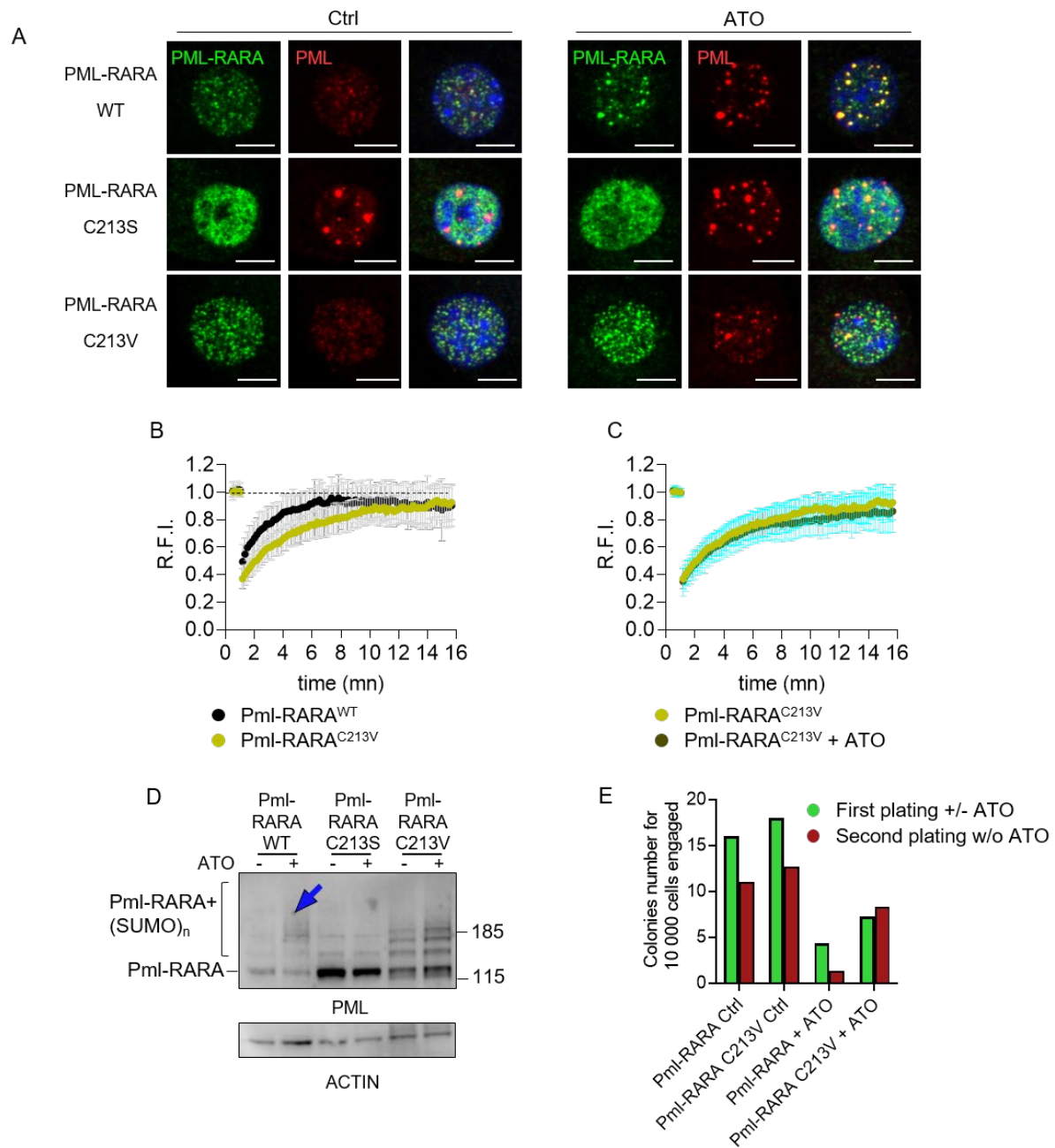




**Figure 6:**



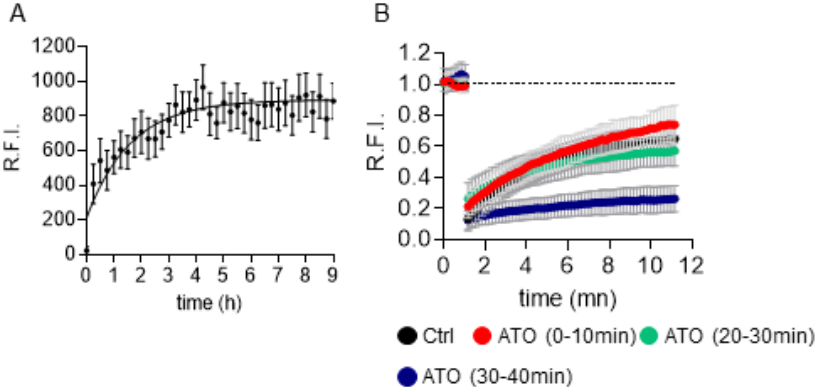
**Figure 7:**



**Supplementary Figure S1: Movie**

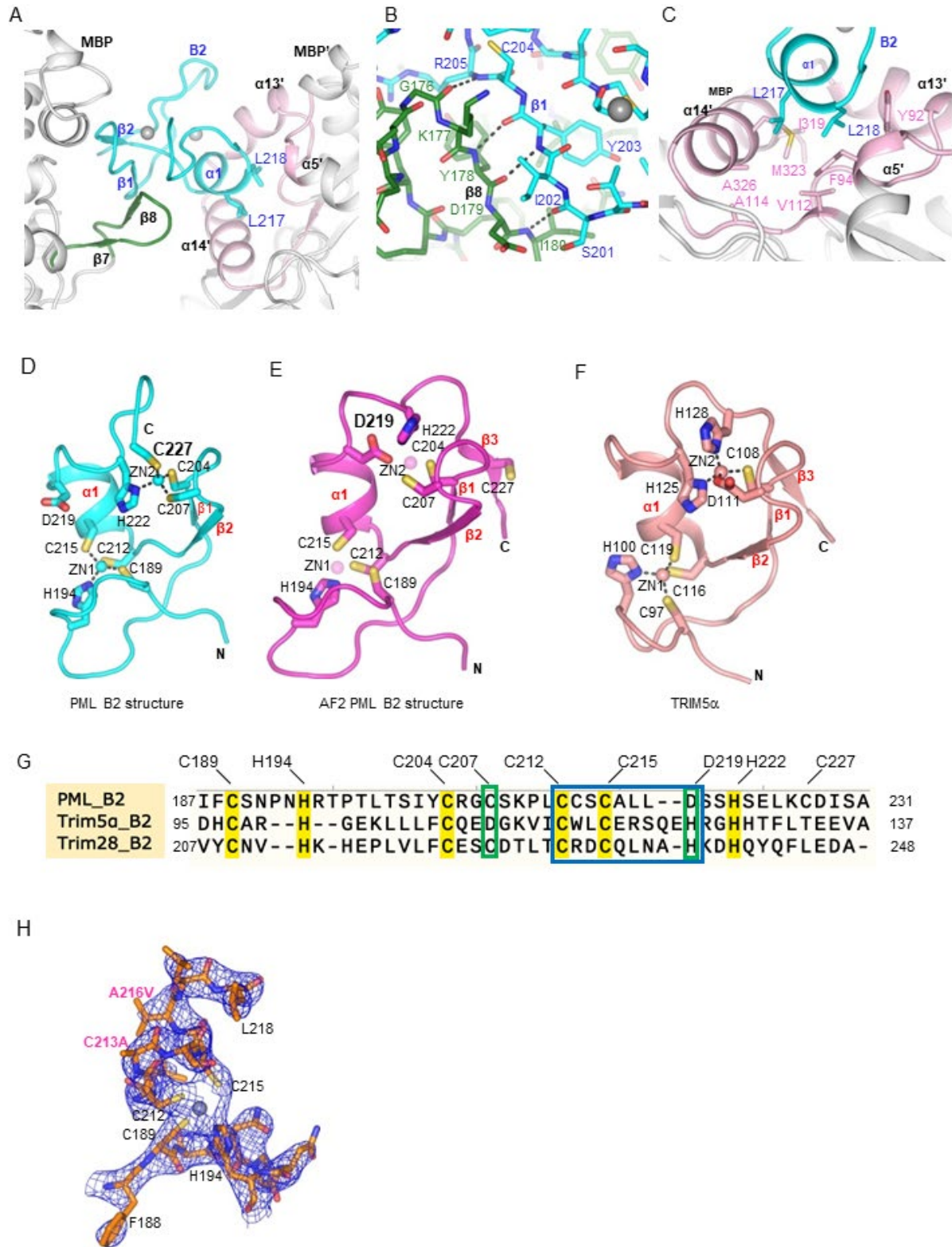
**Supplementary Figure S2: Movie**

**Supplementary Figure S3:**

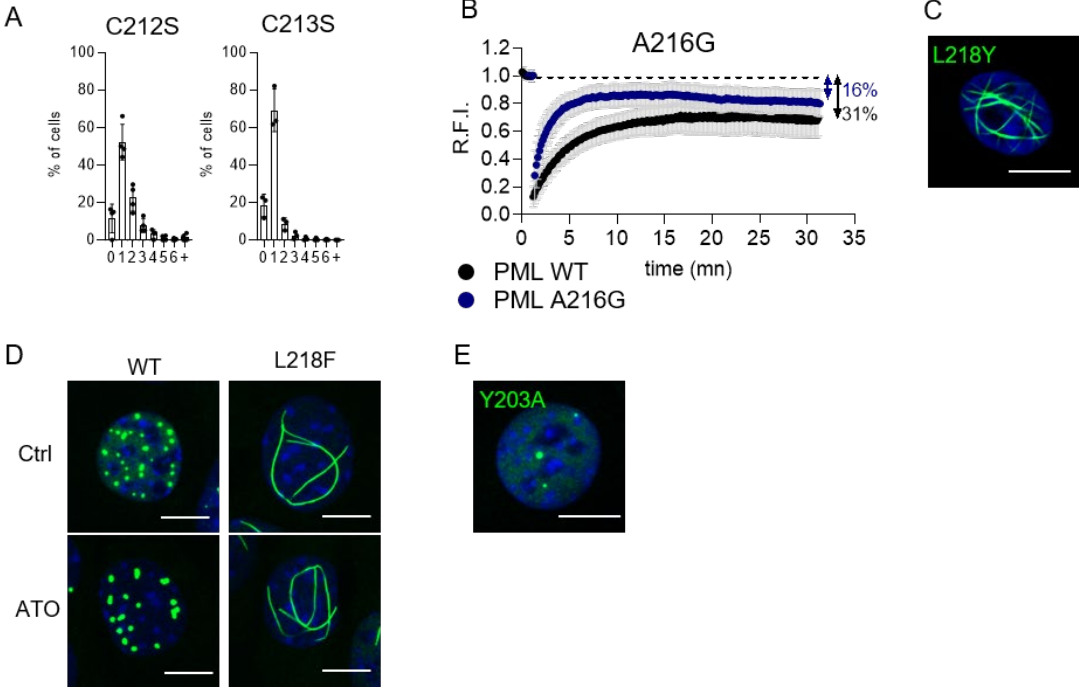




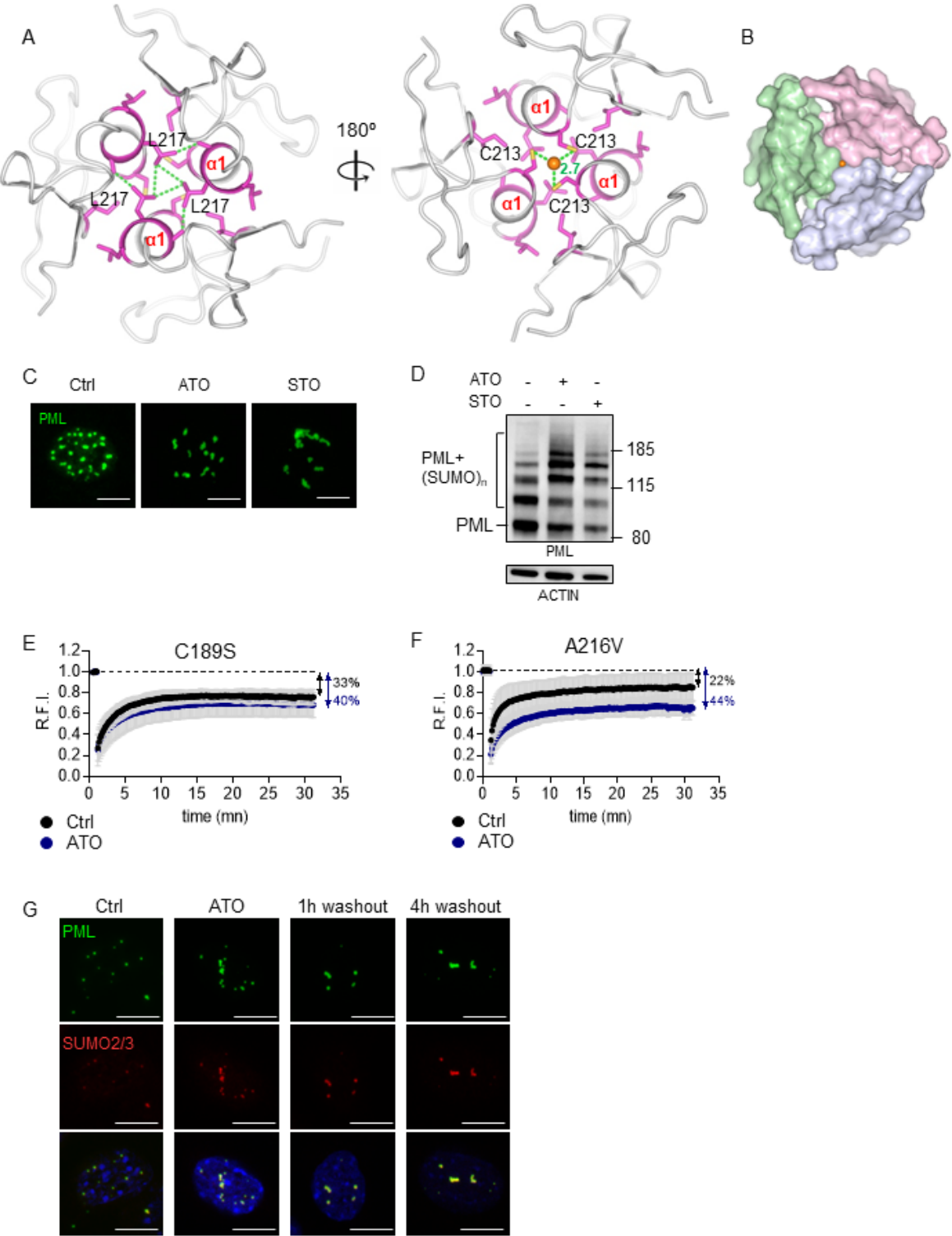
### Supplementary Figure S4:



**Supplementary Figure S5:**



**Supplementary Figure S6:**



# **Résultats supplémentaires**

*Bio-ingénierie des corps PML artificiels*

# INTRODUCTION

Les corps nucléaires PML sont des structures complexes dont la dynamique et la composition sont difficiles à manipuler *in cellulo*. Dans l'étude d'autres organelles sans membranes comme le nucléole ou les paraspeckles, des approches ascendantes ont été développées afin de contourner cette problématique. Elles visent à recréer un modèle d'étude simplifié permettant d'étudier les différentes propriétés des condensats biomoléculaires.

Des approches *in vitro* utilisant des protéines chimériques ont permis d'identifier le rôle des domaines structurés et des domaines intrinsèquement désordonnés ou de faible complexité dans l'assemblage de condensats biomoléculaires par LLPS (Banani et al., 2016; Li et al., 2012; Lin et al., 2017; Uversky, 2017). Cependant l'impossibilité d'étudier des protéines PML purifiées du fait de la complexité de leur domaine RBCC et l'échec de la purification des CNP en raison de leur insolubilité ont empêché le développement de ces approches. De plus, ces approches ne récapitulent pas l'environnement complexe de la cellule. Le développement de nouveaux outils permettant de créer des CNP artificiels constitue un axe de recherche prometteur, complémentaire aux études traditionnelles de biologie cellulaire.

Récemment différentes stratégies visant à recréer des condensats biomoléculaires artificiels qui s'assemblent selon un processus de LLPS ont été développées en utilisant des protéines connues pour multimériser. Le laboratoire de Zoher Gueroui (département de chimie de l'Ecole Normale Supérieure, Paris) a mis au point un système permettant la formation de granules artificielles (arti-granules). La stratégie a consisté à construire un échafaudage protéique multivalent interagissant avec une faible affinité par homo-dimérisation (constante de dissociation ( $K_D$ ) de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ). Un premier choix d'échafaudage consiste à fusionner l'apoferritine à la protéine FKBP<sup>F36M</sup>. L'apoferritine a la capacité de former une nano-cage protéique constituée de 24 monomères. La protéine FKBP<sup>F36M</sup> est un mutant de la protéine de FKBP (FK506 binding protein). La substitution de la phénylalanine en position 36 par une méthionine conduit à la formation de dimères de FKBP<sup>F36M</sup> qui peuvent être dissociés par la liaison de son ligand : le FK506. La protéine d'échafaudage apoferritine-FKBP<sup>F36M</sup> est nommée Fm. L'expression de cet échafaudage au sein de cellules de mammifères conduit à leur assemblage en

condensats qui récapitulent les propriétés de séparations de phase liquide-liquide (Garcia-Jove Navarro et al., 2019). Ce modèle a déjà été utilisé dans le cadre de l'étude de granules ribonucléoprotéiques artificielles pour quantifier l'effet de l'ARN sur la régulation de leur formation, de leur composition et de leur morphologie (Cochard et al., 2022; Garcia-Jove Navarro et al., 2019).

Un intérêt de ce système réside dans la possibilité d'ajouter aux cellules la molécule FK506, qui se lie aux domaines Fm. Une fois ajouté au milieu de culture, le FK506 entre en compétition avec l'interaction Fm-Fm induisant la dissolution des granules (Garcia-Jove Navarro et al., 2019). Ce système permet donc la formation programmable de condensats artificiels à partir de l'assemblage par LLPS du domaine Fm.

Le but de ce projet est d'adapter ce système à l'étude des corps nucléaires PML afin d'étudier le rôle du LLPS dans leur assemblage, la modulation de leur composition et leur fonction de SUMOylation des protéines partenaires. Les propriétés initialement recherchées pour les corps artificiels devront idéalement répondre aux critères suivants :

1. Les corps PML artificiels (corps arti-PML) que nous génèrerons devront récapituler les propriétés biochimiques connues des CNP naturels (formation de corps micrométriques, structure cœur-coque avec une épaisseur constante, capacité à recruter la machinerie de SUMOylation, capacité à SUMOyler PML et les protéines partenaires). Nous pourrons contrôler leur assemblage et leur désassemblage en réponse à un stimulus chimique (FK506). Ce contrôle temporel permettra ainsi d'étudier des situations où nous pourrons suivre les conséquences de la présence ou de l'absence de phases condensées de PML PML.
2. La modification de la valence des échafaudages protéiques (augmentation de 5 répétitions Fm à 10 par exemple) pourra permettre de moduler la dynamique d'échange entre la phase assemblée en corps et la phase diluée, et ainsi d'obtenir des arti-PML de type liquide (dynamique d'échange rapide, comme le GFP-PML<sup>WT</sup> décrit dans les résultats principaux) ou gel (dynamique d'échange faible, comme en réponse à l'ATO).

3. La modification des propriétés biophysiques des arti-PML permettra potentiellement d'examiner deux aspects difficiles à étudier à partir de CNP naturels. 1) Établir un lien causal entre propriétés biophysiques des CNP et leurs fonctions biochimiques (SUMOylation), 2) Générer des corps PML artificiels présentant des caractéristiques de type gel en absence d'arsenic pour éviter les effets multiples du stress oxydant.

## RESULTATS

La première partie de ce projet a consisté à produire une preuve de concept avec le système anti-PML dans une lignée cellulaire HeLa sauvages. Cette partie a été réalisée par le laboratoire du Dr. Zoher Gueroui. Je suis intervenu sur l'étude de la distribution des corps anti-PML par microscopie confocale et l'analyse de la SUMOylation des protéines PML<sup>C57-60A</sup> et 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> par Western blot.

L'ADN codant pour une protéine PML (isoforme III) mutée sur le domaine RING (C57-60A) qui est incapable de former des CNP et d'être SUMOylée (Wang et al., 2018) a été fusionnée au niveau de la partie C-terminale de cinq répétitions du domaine Fm (Nter-5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> – Cter) (Figure 24.A.). Cet ADN code pour une protéine de fusion 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>. La protéine Fm a la capacité de former des homo-multimères par l'établissement de liaisons faibles, avec un  $K_D$  de l'ordre du micro-molaire. La transfection de ce plasmide en lignées cellulaires permet de former des corps artificiels, sur une échelle de temps de 6 à 12h post-transfection, dont l'assemblage est permis par la répétition du domaine Fm selon un processus de LLPS (Figure 24.B.). Le désassemblage des corps anti-PML peut être induit en quelques secondes par l'ajout de l'inhibiteur compétitif du domaine Fm, le FK506 (Figure 24.B-C.) démontrant la réversibilité de l'assemblage des corps anti-PML. Les corps anti-PML se reforment rapidement à partir de l'interaction Fm-Fm après avoir lavé les cellules pour diluer le FK506 présent dans le milieu de culture (Figure 24.D.).

Cependant, la participation du PML endogène exprimé dans cette lignée cellulaire pourrait favoriser l'assemblage des corps anti-PML, ce qui a motivé l'étude des anti-PML au sein de MEF *Pml*<sup>KO</sup>. Cette partie m'a été confiée. Pour cela, nous avons sous-cloné l'ADN codant pour la protéine de fusion 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> dans un vecteur rétroviral sous le contrôle d'un promoteur faible, nous permettant de construire des lignées de MEF *Pml*<sup>KO</sup> l'exprimant de manière stable. Nos résultats indiquent que l'expression du 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> dans ces lignées induit la formation des corps anti-PML (Figure 24.E.). L'analyse de ces corps artificiels par microscopie à super-résolution (STED) révèle qu'ils sont composés d'une coque de 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> creuse et dont l'épaisseur de 110-120nm est identique à celle des corps formés par du PML<sup>WT</sup> (Figure 24.F). Tout



comme dans les corps formés par du PML<sup>WT</sup>, l'épaisseur de la coque est indépendante de la taille du corps nucléaire (non montré).

Comme observé pour les corps nucléaires PML, l'ubiquitine E2 ligase (UBC9) co-localise au sein de ces corps anti-PML dans des lignées cellulaires HeLa sauvages (Figure 25.A.) ou des MEF *Pml*<sup>KO</sup> (Figure 25.B.) exprimant la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>. La dissolution des corps anti-PML par l'ajout de FK506 dans le milieu de culture induit également la perte de l'association de l'enzyme UBC9 en condensats (Figure 25.C.). L'analyse par microscopie confocale de la localisation subcellulaire de SUMO2/3 révèle que cette protéine est accumulée aux corps anti-PML (Figure 25.D.).

Le mutant PML<sup>C57-60A</sup> dépourvu du domaine 5xFm, incapable de former des CNP, est retrouvé sous forme diffuse dans le noyau (Wang et al., 2018) et n'est pas SUMOylé (Figure 25.E.). La reformation d'un état condensé par la fusion de ce mutant au domaine 5xFm permet de restaurer la SUMOylation de PML. L'ajout de l'inhibiteur FK506 au milieu de culture dès la transfection des cellules HeLa empêche l'assemblage des corps anti-PML. La distribution diffuse de cette protéine, par opposition à l'état condensé (corps anti-PML), conduit à une absence de la SUMOylation de la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>. Ces résultats démontrent le lien causal entre la formation de condensats (corps anti-PML) de la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> initiée par un mécanisme de LLPS au niveau du domaine 5xFm et l'activité de SUMOylation de PML.

Nous fournissons ici la preuve de concept que notre système 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> permet la formation de corps nucléaires artificiels, dont la formation est initiée par le domaine Fm dans des lignées cellulaires dépourvues de PML et qui récapitulent certaines caractéristiques biochimiques des CNP.

Des expériences préliminaires de FRAP (non montrées) menées par l'équipe du Dr. Zoher Gueroui sur le domaine synthétique 5xFm révèlent que cette protéine forme des condensats dynamiques avec une vitesse d'échange de la protéine au sein de la structure comparable à celles

des CNP. Le temps de demi-recouvrement de la fluorescence ( $t_{1/2}$ ) est de l'ordre de la minute. Le retour de la fluorescence dans ces condensats n'est pas total après le photoblanchiment, démontrant qu'une fraction de la protéine est immobile au sein de la structure. Cette fraction immobile représente environ 40% des protéines présentes dans le condensat, évoquant celle des CNP (cf. résultats principaux). L'augmentation du nombre de répétitions du domaine Fm (10xFm) augmente la valence de l'interaction et induit la formation de condensats présentant des caractéristiques de type gel, semblables à ceux formés par la protéine PML associée aux CNP sous arsenic.

La poursuite de ce projet cherchera à étudier l'effet de la transition de phase d'un condensat de type liquide vers un condensat de type gel sur la formation des corps artificiels et leur fonction de SUMOylation des protéines partenaires.

FIGURE 24

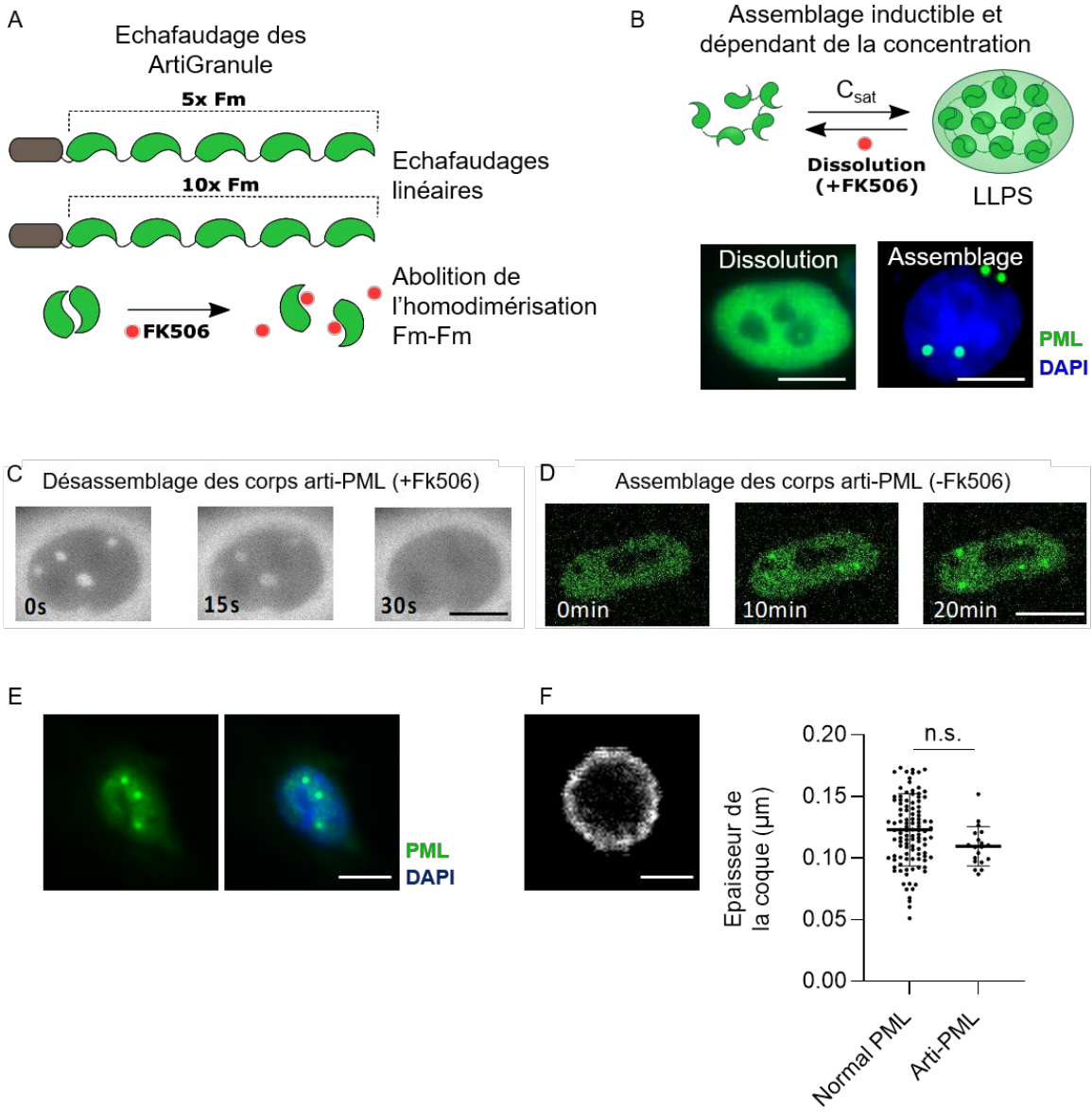


FIGURE 25

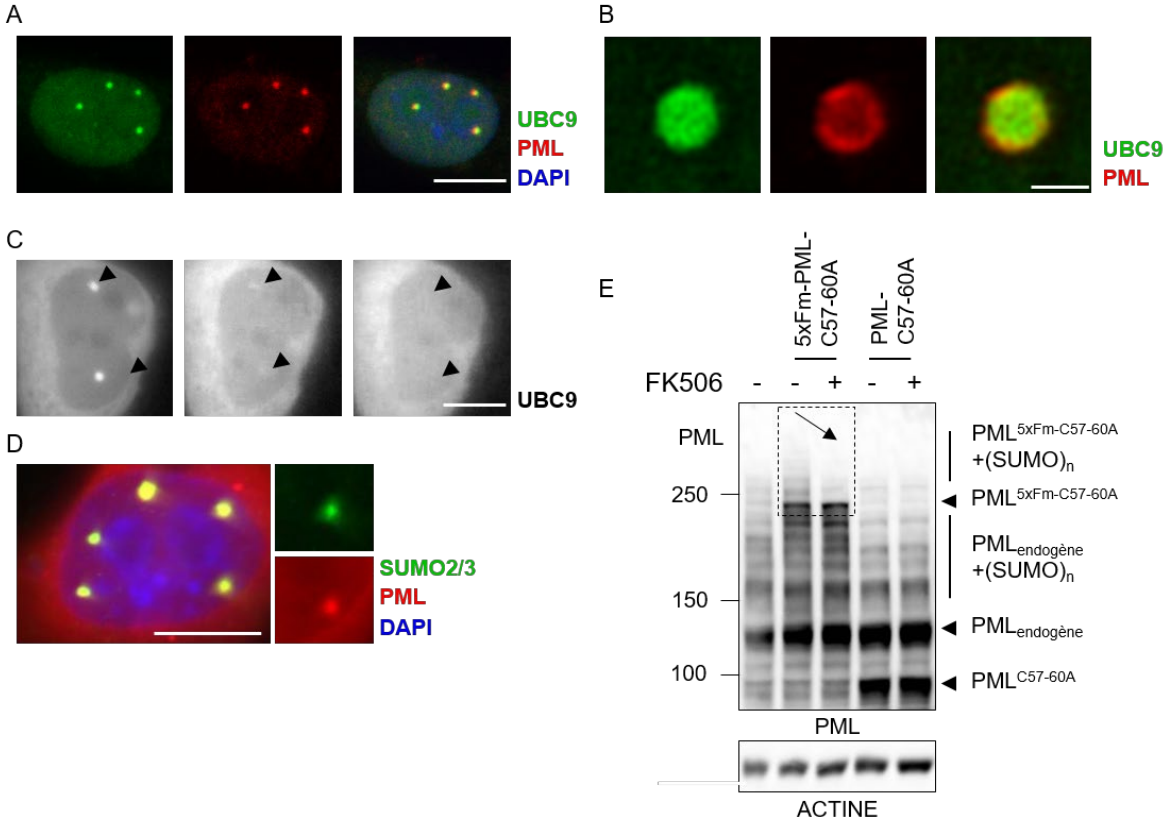


Figure 24 : La protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> s'assemble pour former la coque des corps arti-PML, dont l'assemblage est contrôlable

- A. Représentation schématique des échafaudages arti-PML.
- B. Formation de corps arti-PML illustrée sous forme schématique (haut) et par analyse de cellules HeLa exprimant la construction 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> (bas). Le désassemblage des corps arti-PML a été induit par l'ajout de FK506 au milieu de culture. Barre d'échelle : 5µm.
- C. Le FK 506 induit un désassemblage rapide des corps arti-PML. Images réalisées par microscopie à épifluorescence sur des cellules HeLa vivantes exprimant une protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> et une protéine 5xFm-mCherry, permettant de suivre le désassemblage des corps arti-PML par la protéine 5xFm-mCherry associée aux corps. Barre d'échelle : 5µm.
- D. Assemblage rapide des corps arti-PML après le retrait du FK506. Images réalisées par microscopie confocale sur des cellules HeLa vivantes exprimant une protéine 5xFm-GFP-PML<sup>C57-60A</sup>. Barre d'échelle : 5µm.
- E. Formation des corps arti-PML dans les MEF *Pml*<sup>KO</sup>. Barre d'échelle : 5µm.
- F. La protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> forme des corps arti-PML creux dans les MEF *Pml*<sup>KO</sup>. Analyse par microscopie à super résolution (STED) d'un corps arti-PML (gauche). Barre d'échelle : 1µm. Mesure de l'épaisseur de la coque des corps PML normaux et des corps arti-PML réalisée sur des images acquises au STED dans des MEF exprimant de manière stable une protéine GFP-PML<sup>WT</sup> ou 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> (droite). Sur le graphique, chaque point correspond à un corps nucléaire. Les résultats du test de Student sont indiqués (n.s. : non significatif). Barre d'erreur : déviation standard.

Figure 25 : Formation des corps arti-PML dans une lignée de MEF *Pml*<sup>KO</sup>

- A. Immuno-colocalisation de l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO, UBC9, avec les corps arti-PML dans des cellules HeLa. Barre d'échelle : 5µm.
- B. Immuno-colocalisation de l'enzyme E2 de conjugaison à SUMO, UBC9, avec les corps arti-PML. Barre d'échelle : 1µm
- C. Désassemblage des condensats de la protéine UBC9-GFP localisée aux corps arti-PML en réponse au FK506. Barre d'échelle : 5µm.
- D. Immuno-colocalisation de SUMO2/3 avec les corps arti-PML dans des cellules HeLa. Barre d'échelle : 5µm.
- E. L'assemblage de PML<sup>C57-60A</sup> aux corps arti-PML induit sa SUMOylation. Analyse par Western blot de lysats totaux de cellules HeLa transfectées avec un plasmide exprimant la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> et traitées avec les molécules indiquées.

# MATERIEL ET METHODES

## Drogues et molécules utilisées

Nom	Fournisseur	Référence	Dose utilisée	Concentration de la solution
Trioxyde d'arsenic	Sigma-Aldrich	01969	1 $\mu$ M	X
FK506 monohydrate	Merck	F4679	2,5 $\mu$ M	X

Tableau 1: Liste des drogues utilisées dans cette étude

## Culture des lignées cellulaires

Les cellules humaines de carcinome HeLa (ATCC, ccl-2) ont été cultivées par le laboratoire du Dr. Zohar Gueroui, à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide dans un milieu DMEM (avec 4.5 g/L D-glucose, HyClone) supplémenté de 10% v/v de sérum de veau fœtal (Thermo Fisher).

Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) ont été isolés à partir d'embryons (E13,5) de souris BALB/cByJ *Pml*<sup>KO</sup> générées par CRISPR-Cas9 et présentant une délétion de l'exon 3 de *Pml*. Ces cellules ont été transformées par transduction de l'antigène grand-T du virus SV40. La culture des MEF a été réalisée à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide dans un milieu DMEM High Glucose (4,5g/L) avec pyruvate (Gibco) et supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio Scientific), 100U/ml pénicilline-streptomycine (Gibco) et 2mM glutamine (Gibco).

## Transfection des cellules HeLa

La transfection des cellules HeLa a été effectuée par le laboratoire du Dr. Zohar Gueroui. Toutes les constructions introduites dans les cellules HeLa ont été exprimées par transfection transitoire en utilisant de la lipofectamine 2000 (Invitrogen), en respectant le protocole du fournisseur. Les cellules ont été imagées 24h après transfection. Dans le cas de co-transfections, les cellules ont été transfectées avec une quantité similaire de chaque plasmide, en respectant le protocole du fournisseur. Les plasmides suivants ont été utilisés dans le cadre de cette étude : pcDNA3.1 5xFm, pcDNA3.1 10xFm, pcDNA3.1 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>, pcDNA 5xFm-mCherry, pcDNA3.1 5xFm emGFP PML<sup>C57-60A</sup>, pcDNA3.1 UBC9-GFP et pcDNA3.1 PML<sup>C57-60A</sup>.

## Création des lignées de MEF exprimant de manière stable la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>

Dans un premier temps, des cellules Platinum-E de production de particules virales ont été transfectées avec un plasmide rétroviral pMSCV<sub>puro</sub>5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>, en utilisant de l'effectene (Qiagen). Ces cellules sont des HEK293T qui ont été modifiées génétiquement pour exprimer de manière stable les protéines de structure des rétrovirus (gag, pol et env). Le milieu de culture des MEF *Pml*<sup>KO</sup> est remplacé par le surnageant de culture de ces cellules, contenant les plasmides rétroviraux encapsulés dans des particules virales, et supplémenté de 1µg/ml de polybrene (Sigma-Aldrich). Le surnageant de culture de 600 000 cellules Platinum-E est utilisé pour transduire 100 000 MEF *Pml*<sup>KO</sup>. Le surnageant de culture des MEF est remplacé quatre fois par du surnageant de culture des cellules Platinum-E entre 24h et 72h post transfection. Deux jours après la dernière infection, les MEF exprimant la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> sont sélectionnées avec de la puromycine (1µg/ml) durant une semaine.

## Analyses par microscopie à fluorescence

### Anticorps utilisés

Protéine Cible	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
PML	Produit au laboratoire	N.D.	Souris	1/1000 <sup>e</sup>
SUMO2/3	Cell Signaling Technologies	4971P	Lapin	1/1000 <sup>e</sup>

Tableau 2: Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences

### Imagerie sur cellules vivantes

L'imagerie sur cellules vivantes HeLa a été réalisée par le laboratoire du Dr. Zoher Gueroui. Les cellules HeLa ont été cultivées dans des boîtes de culture à haute qualité optique (IBIDI). La vidéo-microscopie sur cellules vivantes a été réalisé sur un microscope confocal LSM 710 META (Carl Zeiss Micro-Imaging) équipé d'une chambre thermostatée (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), en utilisant un objectif x63 à immersion à huile. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Fiji.

## Immunomarquage et analyse de la distribution des CNP par microscopie confocale et de la structure des CNP par microscopie à déplétion par émission stimulée (STED)

Les cellules HeLa ont étéensemencées sur des lamelles de verre et traitées avec les différentes drogues. Les cellules ont alors été fixées avec 2% de formaldéhyde 37% (ThermoFisher) durant 20 minutes et perméabilisées dans une solution de DPBS 0,3% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) pendant 20 minutes. Les anticorps primaires ont été dilués dans du DPBS 0,3% Triton-X100 + 1% BSA et incubés à température ambiante pendant 1 heure. Les anticorps secondaires ont également été dilués dans la solution de perméabilisation + 1% BSA et incubés durant 1 heure à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés pour la microscopie confocale ont été fournis par Jackson ImmunoResearch et sont couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor). Les lamelles ont été montées en utilisant du Vectashield + DAPI (H-1200, Eurobio).

Les cellules MEF ont étéensemencées sur des lamelles de verre et traitées avec les différentes drogues. Les cellules ont alors été fixées à la formaline 10% (Sigma-Aldrich) durant 15 minutes et perméabilisées dans une solution de PBS 0,5% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes. Les anticorps primaires ont été dilués dans du PBS 0,5% Triton-X100 et incubés à température ambiante pendant 1 heure. Les anticorps secondaires supplémentés en DAPI (1µg/ml) ont également été dilués dans la solution de perméabilisation et incubés durant 1 heure à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés pour la microscopie confocale ont été fournis par Jackson ImmunoResearch et sont couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor). Des anticorps secondaires STAR RED (Abberior) ont été utilisés exclusivement pour les analyses de STED. Les lamelles ont été montées en utilisant du Mowiol.

L'analyse par microscopie confocale a été réalisée sur un microscope à balayage laser LSM 980 (Carl Zeiss Micro-Imaging) équipé d'un détecteur spectral et d'un module Airyscan 2. Les acquisitions ont été réalisées en utilisant un objectif x60 à immersion à huile. L'analyse des images de super-résolution a été réalisée sur le logiciel Zen (Carl Zeiss Micro-Imaging)

L'analyse en microscopie à super-résolution par STED a été réalisée sur un vidéo-microscope Axio Observer 7 (Carl Zeiss Micro-Imaging) équipé d'un module STEDYCON (Abberior) permettant d'obtenir une résolution de 20nm par pixel. Les acquisitions ont été réalisées en utilisant un objectif x100 à immersion à huile.



L'épaisseur de la coque des corps anti-PML a été mesurée sur des images de STED réalisées sur des MEF exprimant de manière stable la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup>. Pour chaque corps anti-PML, le diamètre de la coque a été mesuré sur le logiciel FIJI en 5 endroits, éloignés les uns des autres. L'épaisseur d'un corps anti-PML a été évaluée en réalisant la moyenne de ces 5 mesures. Un nombre de n=19 corps anti-PML ont été analysés dans N=19 cellules. Un nombre de n=109 CNP ont été analysés dans n=25 MEF exprimant de manière stable la protéine GFP-PML.

### Western blot

Dans le cas de l'étude du profil de SUMOylation de la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> en réponse au FK506, les cellules ont été traitées 2h post-transfection avec 2,5µM de FK506 pour empêcher la formation des corps anti-PML. Pour toutes les conditions, les cellules ont été lysées dans un tampon Laemmli (ThermoFisher).

Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines ont été séparées sur des gels gradients 4-12% NuPage (Invitrogen) dans un tampon MOPS. Les protéines ont alors été transférées sur des membranes de nitrocellulose (BioTrace Pall Laboratory). Après le transfert, les membranes ont été bloquées dans un tampon contenant du TBS-0,1%Tween20 supplémenté de 10% de lait. L'incubation avec l'anticorps primaire a été effectuée sur la nuit à 4°C dans le tampon de blocage. Après lavage au TBS-0,1%Tween20, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la HRP (Horseradish Peroxidase) dilué dans le tampon de lavage (Jackson ImmunoResearch). Le signal a été visualisé après incubation des membranes avec un substrat chemoluminescent SuperSignal Dura, Femto ou Atto (ThermoFisher) sur un Fusion FX7 (Vilbert Lourmat).

Protéine Cible	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
PML	Produit au laboratoire	N.D.	Souris	1/1000 <sup>e</sup>
PML	Produit au laboratoire	N.D.	Poule	1/1000 <sup>e</sup>
Actine	Sigma-Aldrich	A2066	Lapin	1/1000 <sup>e</sup>

Tableau 3: Liste des anticorps utilisés pour le Western blot

# Discussion

# L'assemblage dynamique des CNP est-il régulé par LLPS?

## Assemblage de PML à la coque des CNP

Les CNP sont des structures complexes dont l'assemblage dynamique repose uniquement sur la protéine PML et dans lesquels plus de 350 protéines ont été identifiées. La biogenèse des organelles sans membranes a récemment été revisitée à travers le prisme de la séparation de phase liquide-liquide. Ce modèle s'oppose au « modèle de liaison » classique et propose qu'au-dessus d'une concentration critique, une multitude d'interactions faibles et réversibles entre les protéines ou entre les protéines et l'ARN permette l'assemblage de ces structures. Cependant, la contribution du LLPS dans l'assemblage des CNP reste flou.

Les approches *in vitro* ont permis l'étude de la contribution de la séparation de phase liquide-liquide dans la formation de plusieurs organelles sans membranes, mais ce type d'expériences s'est montré infructueux dans le cadre de l'étude des CNP du fait de leur insolubilité et de la complexité structurale du domaine RBCC de PML. Dans les résultats principaux, nous avons étudié des MEF *Pml<sup>KO</sup>* exprimant une protéine GFP-PML, permettant l'étude de l'assemblage de PML aux CNP dans des cellules vivantes. Nous démontrons que les CNP présentent les caractéristiques d'organelles sans membranes qui s'assemblent par LLPS : sphéricité, assemblage dépendant de la concentration, capacité à fusionner et mobilité de PML au sein de la structure. L'estimation de la viscosité effective des CNP est proche de ce qui a été décrit pour d'autres corps nucléaires dont le nucléole (Brangwynne et al., 2011) et les nuclear speckles (Kim et al., 2019). La dynamique d'assemblage de PML en CNP est contrôlée, au moins en partie, par la formation de trimères de PML coordonnés par des interactions hydrophobes au niveau de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2.

Cependant, les CNP ont une structure cœur-coque d'une épaisseur constante de 110nm qui ne varie pas en fonction de la taille des corps (Lang et al., 2010), suggérant des mécanismes de régulation différents du LLPS classique. Plusieurs théories ont été émises pour expliquer la formation des structures cœur-coque. D'une part, pour le nucléole, une séparation de phase multiple, avec des protéines ayant des caractéristiques viscoélastiques différentes a été proposée pour expliquer son assemblage (Feric et al., 2016). *In vitro* et *in vivo* la nucléophosmine

(composante granulaire) et la fibrillarine (composante fibrillaire dense) s'assemblent en condensats biomoléculaires mutuellement exclusifs par une multitude d'interactions de faibles énergies entre leurs domaines non structurés (Feric et al., 2016; Mitrea et al., 2016; Weber and Brangwynne, 2015). La nucléophosmine, plus dynamique entoure alors la fibrillarine présentant des caractéristiques plus proches d'un gel (Feric et al., 2016). Des caractéristiques similaires de cœur dense et coque dynamique sont retrouvées dans l'assemblage des granules de stress cytoplasmiques (Jain et al., 2016). D'autre part, les paraspeckles s'assemblent à partir du long ARN non codant NEAT1 qui sert d'architecture. La partie centrale de NEAT1 recrute différentes protéines pour former le cœur et se replie ensuite pour former un U, exposant ses extrémités 5' et 3' vers l'extérieur. Les extrémités de NEAT1 vont alors permettre le recrutement de nouvelles protéines partenaires. Cependant, ces mécanismes d'assemblage ne peuvent expliquer la formation de la coque des CNP.

En effet, PML est l'unique organisatrice de la coque des CNP et peut s'assembler en corps nucléaires creux indépendamment de la présence de partenaires (Sahin et al., 2014). De plus, les CNP ne contiennent pas d'acides nucléiques (Boisvert et al., 2000). Cela exclut un mécanisme de formation des CNP par une co-condensation de leurs différents composants résultant en une structure avec une gouttelette flottant dans une autre ou un assemblage de PML sur une molécule d'architecture. La formation de la coque des CNP diverge donc des théories d'assemblage des organelles sans membranes par un mécanisme de LLPS classique.

Au-delà de la singularité de l'épaisseur de la coque du CNP, l'étude de la dynamique de PML aux CNP a révélé que 30% de la protéine  $\gamma$  est immobile. Cela suggère que PML existe *a minima* sous deux formes à la coque : une forme de type liquide, dynamique et une forme de type gel ou solide qui n'échange pas. Des structures cœur-coque présentant une fraction immobile du même ordre de grandeur ont été décrites pour un mutant de la protéine TDP-43. Cette étude propose que les corps nucléaires de TDP-43 mutés s'assemblent par LLPS puis subissent une transition de phase [évolution de condensats liquides vers des structures plus stables et moins dynamiques (Figure 26)] durant laquelle l'organisation des protéines évolue pour former un cristal liquide. De la même manière, PML pourrait s'assembler en CNP puis effectuer

une transition de phase au cours de la croissance du corps, où PML s'organise au sein de la structure et devient immobile.

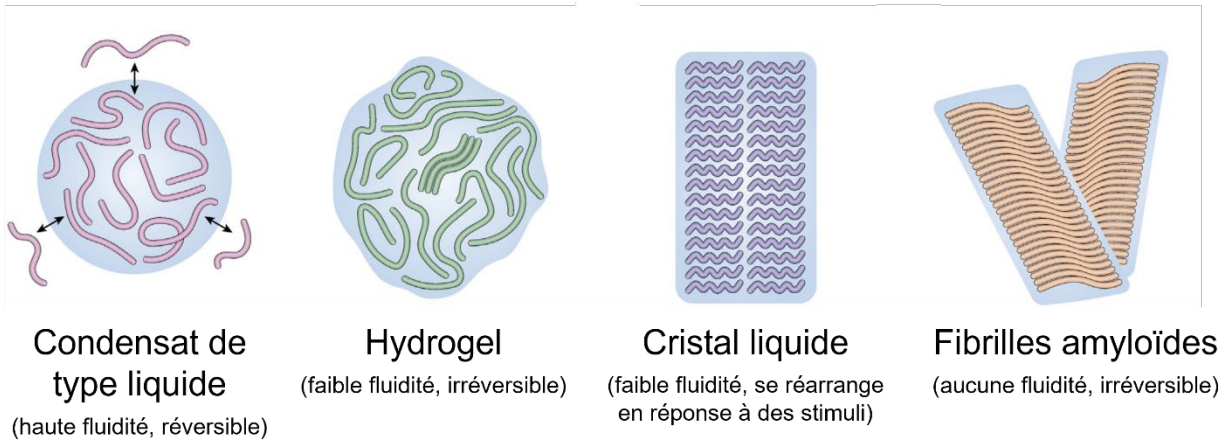


Figure 26 : Caractéristiques matérielles des condensats biologiques (adapté de Wang et al., 2022)

Les composants des différents condensats biomoléculaires ont la capacité de s'organiser et d'effectuer une transition de phase vers des structures plus organisées et moins mobiles de type hydrogel, cristal liquide ou fibres amyloïdes.

Des mutations des acides aminés composant l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML (rapportées dans les résultats principaux) induisent une diminution de la fraction immobile de la protéine aux CNP, suggérant son implication dans ce mécanisme. La structure tridimensionnelle de la boîte B2 de PML présente une forte homologie de séquence avec celle de la protéine TRIM5 $\alpha$  qui a été particulièrement étudiée car elle a la capacité de s'assembler autour de la capsid du VIH, induisant son désassemblage et inhibant la réplication du virus (Nisole et al., 2019). TRIM5 $\alpha$  a la capacité de former des trimères associés par son domaine B2 *via* des interactions hydrophobes au niveau de l'hélice  $\alpha$  (Wagner et al., 2016). Le domaine coiled-coil de chaque monomère est dans le prolongement du domaine B2, formant une structure avec trois rayons séparés par un angle de 60° (Figure 27). Le domaine coiled-coil de TRIM5 $\alpha$ , comme celui d'autres TRIM a la capacité de former des homo-dimères antiparallèles (Sanchez et al., 2014; Thomas et al., 2020; Wagner et al., 2016). En solution, chaque trimère de TRIM5 $\alpha$  formé par les interactions entre les boîtes B2 a la capacité de s'assembler avec d'autres trimères par une dimérisation antiparallèle du domaine coiled-coil, formant une maille composée d'hexamères évoquant une structure cristalline (Thomas et al., 2020; Wagner et al., 2016). Dans cette conformation, le domaine RING

est exposé sur une face du trimère et le domaine d'interaction avec le VIH sur l'autre face, permettant l'interaction de la maille hexamérique avec la capsid du virus.

Conformément à ce modèle, la formation de trimères coordonnés par des interactions hydrophobes au niveau de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 et des interactions entre les autres domaines du RBCC pourraient permettre une organisation de la protéine PML en une structure qui n'échange plus avec le nucléoplasme. Une étude publiée récemment utilisant un système de surexpression de PML dans des lignées cellulaires suggère d'ailleurs que les CNP volumineux (taille  $>1\mu\text{m}$ ) présentent une fraction immobile plus importante que les petits CNP, confortant cette hypothèse (Fonin et al., 2022). De futures études utilisant des approches de microscopie comme l'anisotropie de fluorescence permettant l'étude de l'arrangement de PML dans la coque du CNP, la microscopie à expansion permettant d'élargir les structures cellulaires pour en faciliter l'étude microscopique ou des études de microscopie électronique sur les corps formés par nos différents mutants de PML permettront d'apporter des nouveaux éléments de réponse concernant l'organisation de PML dans la coque des CNP. Des approches complémentaires de modélisation *in silico* permettront de déterminer les modalités d'assemblage de PML pour former la coque du CNP.

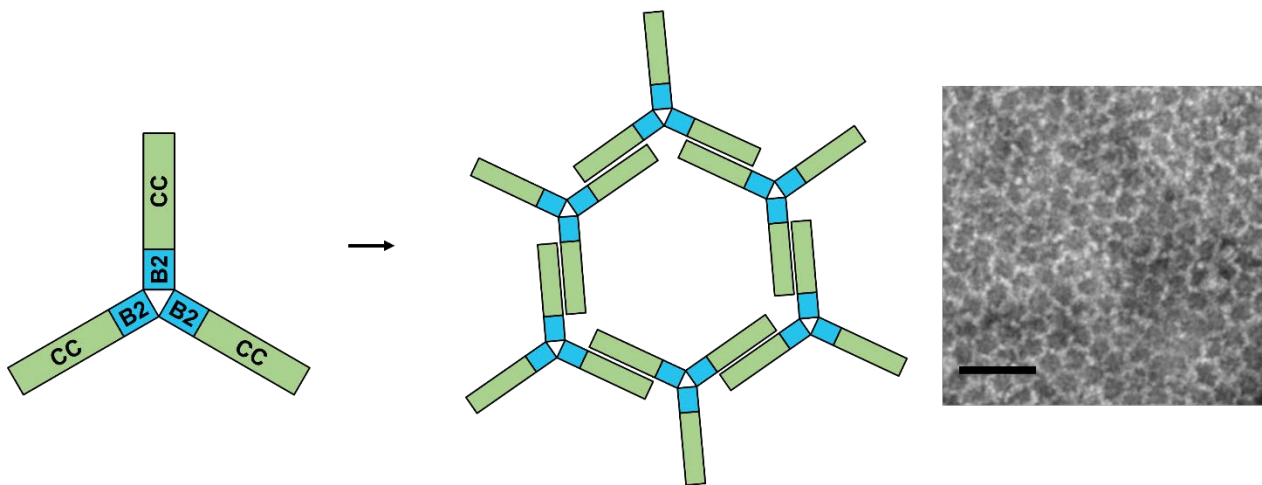


Figure 277 : Assemblage des trimères de TRIM $\alpha$  en maille hexamérique (adapté de Wagner et al., 2016)

TRIM5 $\alpha$  forme un trimère à partir d'interactions hydrophobes entre les boîtes B2 (gauche). Ces structures trimériques peuvent s'associer en une maille hexamérique (centre). Ces structures se forment naturellement à une concentration de 1mg/ml dans 25 mM Tris, pH 8, 25 mM NaCl, 1 mM TCEP (droite). La maille hexamérique est ici marquée en négatif. Barre d'échelle : 100nm.

## *Développement de nouveaux outils pour étudier le rôle du LLPS dans l'assemblage des CNP*

L'impossibilité d'utiliser des approches *in vitro* dans le cadre de l'étude du rôle du LLPS dans l'assemblage des CNP et les limitations techniques inhérentes à nos modèles cellulaires nécessitent le développement de nouveaux outils. L'équipe du Dr. Zoher Gueroui (département de chimie de l'ENS) a développé un système de corps PML artificiels (arti-PML) basé sur la fusion d'un mutant de PML incapable de former des CNP (PML<sup>C57-60A</sup>) à des répétitions d'un domaine synthétique (Fm) qui s'assemble en condensats par LLPS. Cette protéine de fusion permet la formation de corps arti-PML dont l'assemblage est initié par LLPS à partir du domaine Fm et récapitulant certaines caractéristiques des CNP (assemblage de PML pour former la coque du corps arti-PML, recrutement d'UBC9, SUMOylation de PML). Nous pouvons également contrôler l'assemblage des corps arti-PML par l'utilisation de l'inhibiteur compétitif FK506 qui induit leur dissolution en quelques dizaines de secondes. L'utilisation de ce système et l'étude de la dynamique d'assemblage des corps arti-PML par divers mutants de PML combiné à une approche de modélisation de l'assemblage des CNP *in silico* nous permettra de questionner la participation du LLPS dans la formation des CNP. Nous travaillons actuellement à mettre au point ce système dans nos lignées de MEF *Pml*<sup>KO</sup>.

## *Autres régulateurs de la dynamique d'assemblage des CNP*

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont également impliquées dans la régulation de leur assemblage par LLPS (Luo et al., 2021; Owen and Shewmaker, 2019). Par exemple, dans le cas des condensats de TDP-43 cités précédemment, l'acétylation de la protéine favorise son assemblage en corps nucléaires. PML peut être sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles (Cheng and Kao, 2013), en particulier la SUMOylation. Cette dernière a été impliquée dans la régulation de l'interaction protéine-protéine par l'interaction faible entre le SUMO conjugué aux protéines et le domaine d'interaction avec SUMO (SIM) de leurs partenaires. De plus, il a récemment été proposé *in vitro* que des protéines chimériques contenant des répétitions poly-SUMO condensent avec des protéines contenant des répétitions de SIM selon un processus de LLPS (Banani et al., 2016).

Pour PML, il a déjà été rapporté que la substitution des trois sites majoritaires de SUMOylation par des arginines induit un assemblage de la protéine en CNP avec une dynamique très faible (Weidtkamp-Peters et al., 2008). Des expériences préliminaires menées sur nos modèles de MEF exprimant une protéine GFP-PML<sup>K160R</sup>, abolissant la formation de chaînes poly-SUMO sur PML, indiquent que les CNP formés par ce mutant présentent des caractéristiques de type gel avec une dynamique semblable aux CNP formés en réponse à l'arsenic. Un effet similaire est observé dans des cellules exprimant une protéine GFP-PML<sup>WT</sup> en réponse à un traitement court (une heure) avec un inhibiteur de l'enzyme d'activation de SUMO (ML-792) induisant une dé-SUMOylation totale de PML. Aucune augmentation de la quantité de PML, qui pourrait être induite par un défaut de protéolyse, n'est observé en Western blot à ce temps de traitement. Ces résultats préliminaires font écho à plusieurs études de FRAP qui décrivent une réduction de la mobilité de plusieurs protéines après avoir muté leurs lysines SUMOylables (Kaminsky et al., 2009; Maurel et al., 2022; Ryan et al., 2010) et semblent indiquer que la conjugaison de SUMO sur PML contrôle la liquidité des CNP en s'opposant à l'interaction PML-PML. Il semble cependant que les interactions SUMO-SIM sur PML jouent un rôle mineur dans l'interaction PML-PML car l'abolition de la SUMOylation résiduelle dans des cellules portant des mutations de la boîte B2 (PML<sup>C213S</sup>) par un traitement au ML-792 induit une disparition du dernier CNP. Enfin, un traitement de plusieurs heures avec un inhibiteur du protéasome (MG-132) induit une redistribution de PML en plusieurs centaines de CNP de petite taille (50-200nm) sans affecter la dynamique de PML aux CNP. Ces résultats suggèrent une participation de la formation de chaînes SUMO-ubiquitine sur PML et/ou de sa protéolyse par le protéasome dans la régulation de la dynamique d'assemblage des CNP.

Enfin, plusieurs études ont proposé que les différentes isoformes de PML, qui varient au niveau de leur domaine C-terminaux, présentent un assemblage en CNP qui leur est propre. Chacune des isoformes aurait une dynamique d'échange de PML aux CNP spécifique, en particulier PML V qui formerait une coque plus épaisse et aurait une dynamique d'échange de PML aux CNP proche d'une structure de type gel (Condemine et al., 2006; Cuchet et al., 2011; Hands et al., 2014; Weidtkamp-Peters et al., 2008). Cela suggère une participation de la partie C-terminale non structurée de PML dans la régulation de l'assemblage des CNP.



Nous proposons dans les résultats principaux que la boîte B2 de PML joue un rôle central dans la régulation de la dynamique d'assemblage de PML aux CNP. Cependant, les modifications post-traductionnelles de PML et son domaine C-terminal pourraient participer à la régulation de cet assemblage. De futures études comparant l'assemblage dynamique des CNP dans des cellules exprimant des mutants de PML (sites de modifications post-traductionnels / isoformes) et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la SUMOylation (ML-792), de la dé-SUMOylation (composé NSC 632839), de l'activation de l'ubiquitine (TAK-243), de la dé-ubiquitination (PR-619) et de la protéolyse (MG-132) permettront de déterminer le rôle des modifications post-traductionnelles et de la partie C-terminale de PML dans ce processus.

### *Recrutement des protéines partenaires*

Bien que l'assemblage de PML aux CNP semble être plus complexe qu'un mécanisme de LLPS classique, le recrutement des partenaires au sein de la structure pourrait s'y conformer. Les partenaires de PML sont recrutés au cœur du CNP au moyen d'interactions faibles entre leur motif d'interaction avec SUMO et le SUMO conjugué à PML et la délétion de ce motif ou de la SUMOylation de PML est suffisante pour abolir leur recrutement (Sahin et al., 2014). Les partenaires qui ont été étudiés en FRAP comme HIPK2, DAXX, BLM ou des partenaires artificiels GFP-SIM s'associent rapidement aux CNP et ne présentent aucune fraction immobile, suggérant des caractéristiques de type liquide (Sahin et al., 2014; Weidtkamp-Peters et al., 2008). La SUMOylation des protéines partenaires de PML augmente leur temps de rétention aux CNP (Sahin et al., 2014). Comme exposé précédemment, il a récemment été proposé *in vitro*, que des interactions SUMO-SIM permettent de former des condensats selon un mécanisme de LLPS (Banani et al., 2016). Des interactions SUMO-SIM entre les protéines partenaires et PML ainsi qu'entre les partenaires eux-mêmes pourraient réguler leur association aux CNP par un mécanisme de LLPS. Des futures expériences étudiant les modalités d'assemblage de protéines PML<sup>ΔSIM</sup> ainsi que de partenaires synthétiques composés d'une protéine fluorescente et de répétitions d'un site de SUMOylation et/ou d'un motif SIM permettront d'étudier ce mécanisme.

## *La fixation de l'arsenic au sein du trimère de la boîte B2 induit une transition des CNP vers une structure de type gel*

La liaison de l'arsenic sur les protéines est souvent réalisée au sein de domaines liant le zinc (Zhang et al., 2015). De précédentes études avaient proposé deux sites putatifs de liaison de l'arsenic sur PML : l'un dans le domaine RING où l'arsenic viendrait remplacer le zinc, et l'autre, proposé par l'équipe, dans la boîte B2 où il se fixerait autour des C212-C213 (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2010). Il a été proposé que la fixation de l'arsenic sur ces sites soit à l'origine de l'induction de la formation des CNP en réponse à cette drogue.

Le traitement avec du NEM, qui se lie aux cystéines libres, abolit l'effet de l'arsenic sur la formation des CNP, réfutant l'hypothèse de la fixation de l'arsenic sur le RING de PML. Le domaine RING de PML a la capacité de former des dimères et des tétramères, mais pas de trimères (Wang et al., 2018). La structure cristallographique du tétramère du RING démontre que l'assemblage de ce domaine rapproche les cystéines en position C66, permettant la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre ces résidus. L'arsenic pourrait réagir avec ces résidus cystéines libres. Cependant, l'arsenic a besoin d'être *a minima* trivalent pour induire la formation des CNP. Un arsenic divalent (comme le mono-méthyl-arsenic) venant se lier aux cystéines C66 au sein du tétramère, ou reliant deux domaines RING associés en tétramères par ces mêmes acides aminés devrait permettre l'induction de la formation des CNP si ce domaine était responsable de ces effets. De plus, les expériences réalisées avec l'agent alkylant NEM, démontrent que la seule cystéine libre impliquée dans la formation des CNP est la C213. Enfin, le mutant PML<sup>C213V</sup> qui forme des CNP normaux, avec un domaine RING intact, est complètement résistant aux effets de l'arsenic sur la formation des CNP, excluant définitivement ce modèle.

Basé sur des approches *in silico* et l'étude comparative de l'effet de l'arsenic sur les différents mutants de la boîte B2 de PML, nous proposons ici que la trimérisation de la boîte B2 de PML, initiée par des interactions hydrophobes au sein de son hélice  $\alpha$ , rapproche trois cystéines en position C213 au cœur de la structure, créant un site canonique de liaison à l'arsenic (Figure 28). L'identification du site de liaison de l'arsenic sur PML, permettant l'induction de la

formation des CNP ouvre de nouvelles possibilités de développement thérapeutiques de petites molécules mimant l'effet de l'arsenic sur PML mais présentant une toxicité moindre. Ces molécules pourraient être utilisées dans le traitement de la LAP ou d'autres cancers dans lesquels PML est impliqué.

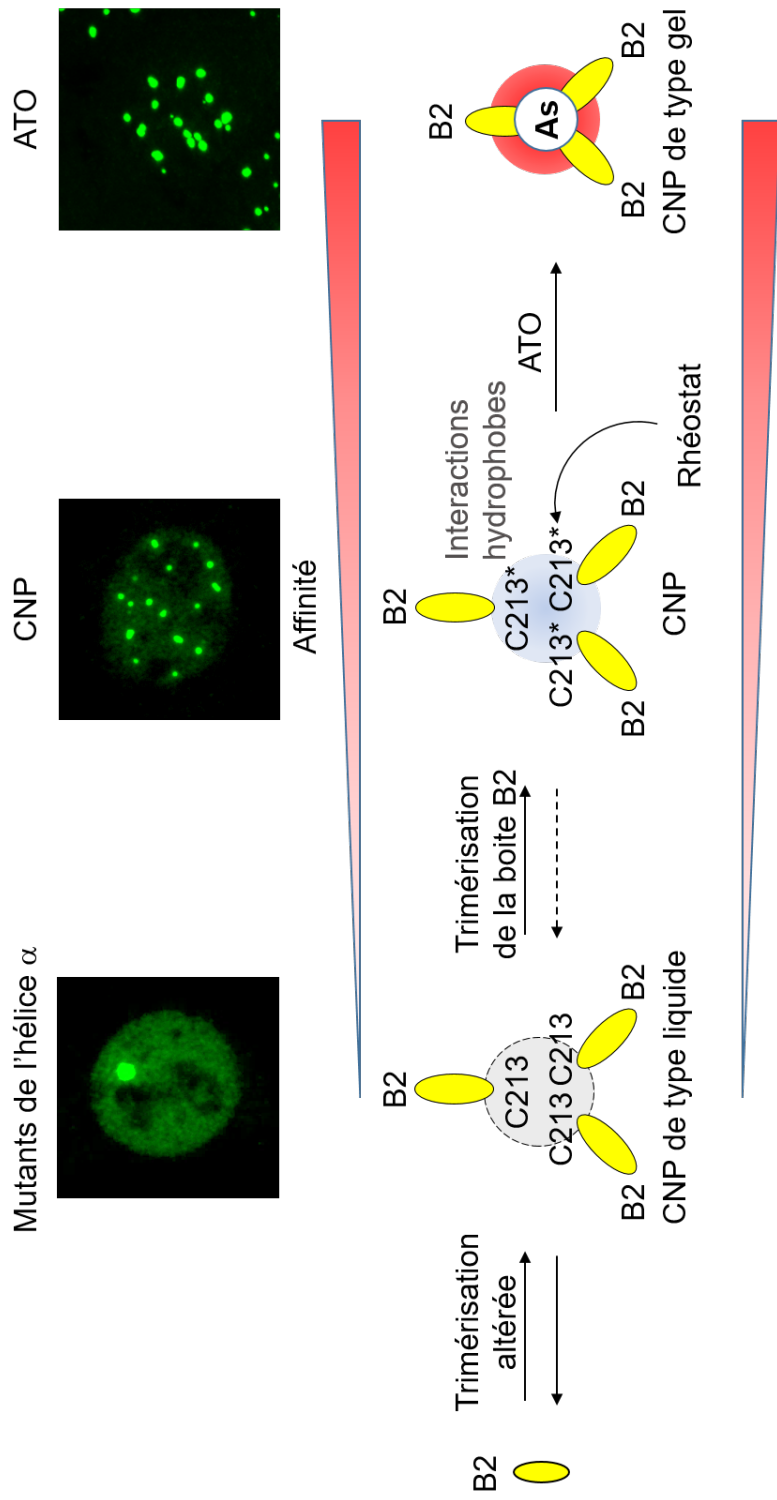


Figure 288 : Schéma récapitulatif des résultats principaux

L'assemblage de PML en CNP est modulé par la formation d'un trimère à partir de sa boîte B2, coordonné par des interactions hydrophobes au niveau de l'hélice  $\alpha$ . La modulation de l'affinité PML-PML au sein du trimère permet de contrôler la dynamique d'assemblage de PML de structures de type liquides jusqu'à des structures de type gel. Au sein de ce trimère, la cystéine libre en position C213 agit comme un rhéostat, permettant de moduler l'affinité PML-PML et l'activité de conjugaison de SUMO sur PML. L'arsenic cible la C213 au cœur du trimère et vient s'y fixer, transformant des interactions faibles en interactions covalentes et fixant la structure dans sa conformation trimérique. Ce mécanisme est à l'origine de la formation des CNP en réponse à cette drogue et de son effet thérapeutique dans la LAP.

## *Lien entre dynamique d'assemblage et fonction des CNP*

La fixation de l'arsenic au cœur du trimère formé par la boîte B2 de PML induit une transition de phase des CNP d'une structure présentant des caractéristiques de type liquide vers des caractéristiques de type gel. Classiquement, la transition de phase se caractérise par une diminution drastique de la mobilité des biomolécules au sein de la structure et une incapacité à fusionner lors d'un contact. Dans le cas des CNP, le traitement avec un oxyde d'arsenic trivalent, induit une diminution de la mobilité de PML aux CNP, confortant de précédentes observations (Geoffroy et al., 2010; Jeanne et al., 2010), associée à une incapacité des corps à fusionner et formant des structures en chapelet.

La mise en évidence d'un lien entre des changements de la dynamique d'assemblage des organelles sans membranes et la modulation de leur activité biochimique demeure un véritable défi. Les études réalisées jusqu'ici ont majoritairement été menées avec des systèmes artificiels sur des protéines purifiées. Afin de contourner cette problématique, différentes stratégies visant à recréer des condensats biomoléculaires artificiels qui s'assemblent selon un processus de LLPS ont été développées en utilisant des protéines connues pour multimériser. Une étude utilisant un système optogénétique (fusion de la protéine d'intérêt à un domaine qui multimérise en réponse à la lumière) a proposé qu'une transition du nucléole vers une structure moins dynamique induise une altération de la maturation des ARN ribosomiques (L. Zhu et al., 2019).

Dans le cas des CNP, la fraction immobile de PML aux corps pourrait être responsable de l'augmentation des niveaux de SUMOylation de PML et des protéines partenaires. En effet, le recrutement d'UBC9 aux CNP n'est pas contrôlé par des interactions SUMO-SIM et il a été proposé que ce-dernier soit permis par son interaction avec des multimères du RING de PML (Wang et al., 2018). En chimie, l'immobilisation d'une enzyme ou d'un substrat sur une surface permet de la stabiliser, de conserver son activité et d'augmenter la cinétique de la réaction. L'immobilisation de PML aux CNP pourrait servir de plateforme pour un recrutement accru de l'UBC9, augmentant sa SUMOylation, le recrutement des protéines partenaires et leurs modifications post-traductionnelles. La SUMOylation de PML pourrait également permettre d'immobiliser les

protéines partenaires par leur domaine SIM au niveau de la coque du CNP et de favoriser leurs modifications.

Si la fraction immobile de PML aux CNP sert de plateforme pour promouvoir son activité biochimique la liaison de l'arsenic sur PML devrait exacerber ce mécanisme. Ainsi, l'immobilisation de PML aux CNP induite par l'arsenic augmenterait séquentiellement le recrutement d'UBC9, la SUMOylation de PML et des protéines partenaires suivie de sa dégradation par SUMO-ubiquitination.

Dans le but de questionner le lien entre la structure, la dynamique et la fonction des CNP, en particulier la fonction de SUMOylation des protéines partenaires, nous souhaitons utiliser notre système de corps arti-PML. Ce système permet de contrôler l'assemblage et le désassemblage de corps artificiels par le domaine Fm. Nous pouvons également contrôler l'assemblage de ces structures en corps nucléaires présentant des caractéristiques de type liquide ou gel en modifiant le nombre de répétitions du domaine Fm.

Nous travaillons actuellement à exprimer de manière stable la protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> dans nos modèles de cellules souches de souris *Pml*<sup>KO</sup> qui expriment de manière stable une protéine SUMO2/3 fusionnée à une étiquette 10 x histidine, permettant la purification des protéines conjuguées à SUMO2/3 (Tessier et al., 2022). Cela nous permettra de déterminer si la formation de corps arti-PML est suffisante pour restaurer une activité biochimique semblable aux CNP. Nous étudierons ensuite si l'induction de l'assemblage de ces corps par l'arsenic, ou leur désassemblage en réponse au FK506 modifie cette activité. Enfin, la comparaison des niveaux de SUMOylation dans des cellules souches de souris *Pml*<sup>KO</sup> qui expriment une protéine 5xFm-PML<sup>C57-60A</sup> - formant des corps arti-PML et présentant des caractéristiques de type liquide - et des cellules exprimant une protéine 10xFm-PML<sup>C57-60A</sup> - formant des corps ayant des caractéristiques de type gel semblables à ceux formés en réponse à l'arsenic - nous permettra d'étudier le lien entre la transition de phase de PML aux CNP et leur activité biochimique.

## Effets de l'oxydation sur PML

PML est une protéine riche en cystéines et sensible à l'oxydation. Des études réalisées au laboratoire ont proposé que l'oxydation de PML induite par divers oxydants ou de l'ATO permettrait la formation de ponts disulfures intermoléculaires qui seraient responsables de la formation des CNP, ainsi que de l'induction de leur assemblage en réponse aux oxydants *in vivo* (Jeanne et al., 2010; Sahin et al., 2014). En retour, PML régule les niveaux de ROS intracellulaires en modulant notamment l'activité de p53 (Niwa-Kawakita et al., 2017).

Ce projet de thèse a permis d'identifier une cystéine C-terminale en position C389 - précédemment identifiée comme réactive dans un oxy-protéome total (Weerapana et al., 2010) - et la cystéine C213 - portée par la boîte B2 et site de liaison de l'arsenic - comme seules responsables de la formation de ponts disulfures intermoléculaires sur PML. Cependant, la substitution de la C389 par une sérine ne modifie pas l'assemblage de PML en CNP. En effet, les CNP formés par le mutant C389S sont normaux en termes de nombre, de taille, de morphologie de dynamique d'assemblage et de SUMOylation de PML et s'assemblent en CNP en réponse à l'arsenic. De plus, la substitution de la C213 par une valine est suffisante pour abolir l'effet de l'agent alkylant NEM sur la formation des CNP contrairement à la mutation C389S. Enfin, l'induction de ce pont disulfure intermoléculaire par le traitement des cellules avec différents oxydants comme l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou des dérivés méthylés de l'arsenic (Wang et al., 2015) ne permettent pas d'augmenter la formation des CNP *in cellulo* contrairement à l'ATO. Contrairement à ce qui a été précédemment proposé, la formation des CNP ne serait donc pas contrôlée par l'établissement de ponts disulfures intermoléculaires entre les différents monomères de PML.

L'utilisation d'un senseur de ROS nous a récemment permis de démontrer que l'intérieur du CNP est moins oxydé que le reste du nucléoplasme (Tessier et al., 2022). Cela suggère que les CNP créent un environnement protecteur, par exemple pour les enzymes impliquées dans la SUMOylation dont les sites actifs à thiols sont particulièrement sensibles à l'oxydation (Bossis and Melchior, 2006). Des résultats non publiés, obtenus avec ce senseur, indiquent que des cellules exprimant une protéine PML<sup>C213S</sup> ou PML<sup>C389S</sup> présentent des niveaux de ROS intracellulaires plus élevés que les cellules exprimant PML<sup>WT</sup>. La perte de la formation d'un pont disulfure

intermoléculaire au sein des CNP aurait donc un effet dans la réponse basale aux ROS. Cela suggère son rôle de tampon, indépendant de la formation des CNP, permettant de réguler les niveaux de ROS par un mécanisme qui reste à identifier. De futures expériences, utilisant des méthodes complémentaires de quantification des niveaux d'oxydation (sondes CellROX) et l'analyse d'autres mutants de PML (PML<sup>C213V</sup>, PML<sup>L218G</sup>...) permettront de confirmer ces résultats et d'identifier le rôle de ce pont disulfure.

*In vivo*, de nombreux oxydants induisent la formation des CNP (Annexe 1 et Niwa-Kawakita et al., 2017; Sahin et al., 2014). Cependant, le traitement de lignées cellulaires cultivées en hyperoxie, ou de lignées primaires cultivées en normoxie (non montré), avec divers oxydants qui induisent la formation de ponts disulfures ne permet pas d'obtenir le même effet. Cela suggère différents mécanismes d'action des oxydants sur PML *in vivo* et *in cellulo* qui ne reposeraient pas sur la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. La réaction des cystéines avec des oxydants est complexe et conduit à divers niveaux d'oxydation des protéines en fonction du type et de la dose d'oxydants utilisée ainsi que du contexte cellulaire (Figure 29).

Les molécules pro-oxydantes utilisées *in vivo* (telles que le paracétamol) doivent être en premier lieu métabolisées avant de pouvoir exercer leur action oxydante *a contrario* des lignées cellulaires qui sont directement placées au contact d'oxydants purs dans leur milieu de culture.

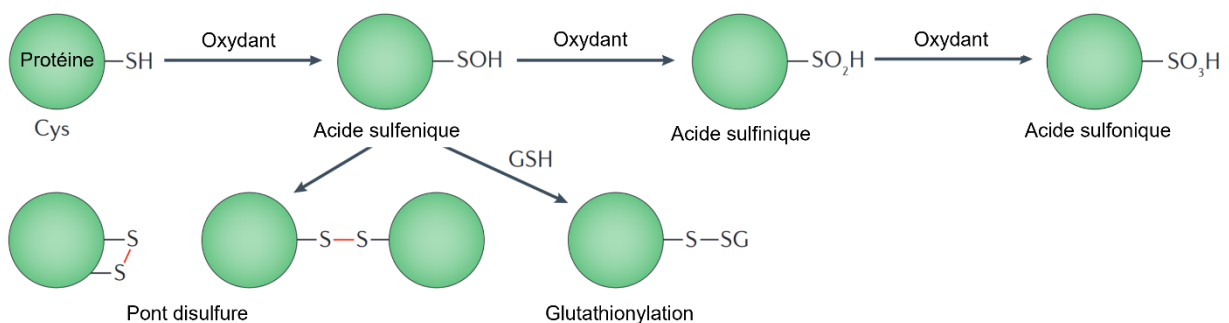


Figure 29 : Oxydation des résidus cystéines des protéines par des oxydants (adapté de Ezraty et al., 2017)

Les résidus cystéines peuvent être oxydés en acide sulfénique qui lui-même être oxydé de façon irréversible en acide sulfinique puis sulfonique. L'acide sulfénique peut également réagir avec un autre résidu cystéine pour former un pont disulfure intra ou intermoléculaire ou avec du glutathion pour former une protéine glutathionylée.



Cela pourrait induire des différences dans la dose de ROS produite et/ou dans le mécanisme d'action des ROS sur PML à l'origine de ces différences.

Des résultats préliminaires obtenus chez des souris présentant une mutation sur l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML (*Pml*<sup>A220V</sup>, équivalent murin de l'A216V) suggèrent que l'assemblage des CNP médié par la boîte B2 pourrait contribuer à la régulation de l'oxydation basale *in vivo* et à la sensibilité de PML pour les oxydants (Annexe 1). L'étude de nouveaux modèles de souris présentant des mutations sur la cystéine C217 (site de liaison de l'arsenic, équivalent murin de la C213 humaine), sur la leucine 222 (impliquée dans le repliement de l'hélice  $\alpha$ , équivalent murin de la L218 humaine) et sur la cystéine 393 (impliquée dans la formation du pont disulfure intermoléculaire, équivalent murin de la C389 humaine) permettra d'élucider le rôle de la formation du pont disulfure intermoléculaire sur PML et de la trimérisation de la boîte B2 dans la formation des CNP et la réponse à des stress oxydants *in vivo*.

## *Régulation de l'assemblage des CNP par la boîte B2 et nouvelles stratégies thérapeutiques*

### *Rôle de la boîte B2 dans la LAP*

Au-delà de son rôle dans l'assemblage des CNP, le trimère formé par la boîte B2 de PML pourrait réguler la formation des CNP anormaux retrouvés chez les patients LAP exprimant PML-RAR $\alpha$ . Des résultats préliminaires obtenus dans des progéniteurs hématopoïétiques *Pml*<sup>WT</sup> transformés avec plusieurs mutants de la boîte B2 de PML au sein de PML-RAR $\alpha$  [exprimant PML-RAR $\alpha$ <sup>C213S</sup>, PML-RAR $\alpha$ <sup>C213V</sup>, PML-RAR $\alpha$ <sup>L218G</sup> (non montré)] révèlent que l'hélice  $\alpha$  contrôle l'interaction entre la protéine oncogénique et la protéine PML non réarrangée pour la délocaliser en micro-ponctuations. De plus, l'analyse de la dynamique de la protéine PML-RAR $\alpha$  mutée dans des MEF *Pml*<sup>KO</sup> indique que la C213 est nécessaire pour induire une transition de phase des CNP anormaux vers une dynamique d'échange de l'oncoprotéine proche de la dynamique basale du PML normal aux CNP en réponse à l'arsenic. Enfin, l'étude des progéniteurs hématopoïétiques

*Pml*<sup>WT</sup> transformés avec ces différents mutants de la boîte B2 de PML-RAR $\alpha$  suggèrent un rôle central de la liaison de l'arsenic sur la C213 présentée par l'hélice  $\alpha$  pour permettre à l'arsenic de bloquer leur auto-renouvellement. Ces résultats sont confortés par une étude réalisée par nos collaborateurs qui suggère que les arsenics monovalents et divalents ne permettent pas d'induire la dégradation de PML-RAR $\alpha$  (Wang et al., 2015). Le développement de nouvelles molécules mimant l'effet de l'arsenic en stabilisant le trimère formé par la boîte B2 de PML évoqué précédemment pourrait permettre de traiter les patients LAP par une thérapeutique ciblée sur PML en s'affranchissant de la toxicité intrinsèque de l'arsenic.

Dans nos modèles de MEF *Pml*<sup>KO</sup>, PML-RAR $\alpha$  s'assemble en CNP anormaux avec une dynamique d'échange de l'ordre de la minute, très largement supérieure à celle de RAR $\alpha$  ou d'autres facteurs de transcription qui sont de l'ordre de la seconde (Dong et al., 2004). Il a récemment été proposé dans la leucémie que des facteurs de transcription oncogéniques chimériques (NUP98–HOXA9 or EWS-FLI1) puissent s'assembler en condensats biomoléculaires, induisant la formation de structures tridimensionnelles aberrantes sur la chromatine, contribuant à leur activité transcriptionnelle et favorisant la transformation oncogénique (Ahn et al., 2021; Chong et al., 2022; Tong et al., 2022). Dans la LAP, PML-RAR $\alpha$  agit comme un répresseur transcriptionnel insensible à des doses physiologiques d'acide rétinoïque en recrutant différents partenaires comme des corépresseurs transcriptionnels, des histones désacétylases, des protéines du complexe Polycomb ou RXR alpha. PML-RAR $\alpha$  interfère avec les voies de différenciation terminales des cellules myéloïdes et promeut l'auto-renouvellement des cellules progénitrices (Ablain and de Thé, 2014; de Thé and Chen, 2010). Cette oncoprotéine affecte également l'expression de gènes qui ne sont pas des cibles canoniques de RAR $\alpha$  (Martens et al., 2010). Une étude rapporte que l'induction de la dimérisation de RAR $\alpha$  par sa fusion avec des domaines synthétiques mime l'activité transcriptionnelle de PML-RAR $\alpha$  (Sternsdorf et al., 2006). Enfin, dans les formes de LAP qui n'impliquent pas PML, une caractéristique commune de toutes les protéines fusionnant avec RAR $\alpha$  est la présence d'un domaine de dimérisation et/ou de liaison

à l'ADN facilitant la multimérisation, suggérant un rôle de la multimérisation de RAR $\alpha$  dans le développement de la maladie (Geoffroy and de Thé, 2020).

La faible dynamique de PML-RAR $\alpha$  dans les CNP anormaux des cellules LAP, médié par la boîte B2 de PML, pourrait être impliquée dans le processus de transformation oncogénique en augmentant le temps de fixation de ce complexe répresseur sur l'ADN et/ou en augmentant le temps de rétention de facteurs de transcription essentiels à la différenciation au sein des corps. De futures expériences permettront de tester cette hypothèse. Pour cela, nous proposons d'étudier le développement de cellules progénitrices hématopoïétiques exprimant une protéine PML-RAR $\alpha^{C213S}$  (diffus), PML-RAR $\alpha^{C213V}$  (dynamique aux CNP anormaux plus faible que du PML-RAR $\alpha^{WT}$ ), PML-RAR $\alpha^{L218G}$  (mutant de l'hélice  $\alpha$  qui devrait être équivalent au mutant PML-RAR $\alpha^{C213S}$ ) et leur réponse à l'arsenic dans des souris *Pml<sup>WT</sup>* et *Pml<sup>KO</sup>*. Après la dégradation de PML-RAR $\alpha$ , la reformation des CNP à partir du PML non-réarrangé est également essentielle dans le traitement de la LAP. Réciproquement, nous proposons donc d'étudier le développement de cellules LAP issues d'animaux *Pml<sup>WT</sup>* et leur réponse au traitement dans des souris *Pml<sup>C213V</sup>* (dynamique de PML aux CNP normale) et *Pml<sup>L218G</sup>* (dynamique de PML aux CNP plus rapide) générées par CRISPR-Cas9. En parallèle, nous étudierons la dynamique d'assemblage de la protéine GFP-PML-RAR $\alpha$  présentant ces mutations sur PML dans des MEF *Pml<sup>KO</sup>* pour confirmer le rôle de la trimérisation de la boîte B2 dans la formation des CNP anormaux et tester le lien entre la dynamique d'assemblage de PML aux CNP anormaux et le développement de la LAP.

### *Rôle de la boîte B2 dans la régulation des voies de sénescence*

PML est impliqué dans le contrôle de la sénescence en régulant les voies p53/p21 ainsi que p16/Rb (Childs et al., 2015; Nardella et al., 2011). Au-delà de la LAP, l'induction des voies de sénescence médiées par PML présente un intérêt thérapeutique dans plusieurs pathologies (cf. partie 4.2 de l'introduction). Nos résultats préliminaires obtenus sur le mutant *Pml<sup>A220V</sup>* en réponse à un traitement au tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) indiquent que ces souris présentent une fibrose hépatique plus importante que les souris *Pml<sup>WT</sup>* et équivalente aux animaux *Pml<sup>KO</sup>* (Annexe 1). Dans le modèle de fibrose hépatique induit par le CCl<sub>4</sub>, cette dernière est limitée par

l'entrée en sénescence des cellules stellaires hépatiques médiée par p53 (Humpton et al., 2022; Krizhanovsky et al., 2008; Zhang et al., 2021).

Une précédente publication de l'équipe a proposé que PML agisse comme un senseur de ROS, activant p53 en réponse au stress oxydant (Niwa-Kawakita et al., 2017). L'effet observé dans nos modèles murins pourrait refléter un défaut d'entrée en sénescence des cellules stellaires hépatiques causé par une perte de l'activité de senseur de ROS de PML du fait de la mutation de la boîte B2, qui ne jouerait plus son rôle de relai et n'activerait pas efficacement la voie p53. De futures expériences permettront de déterminer si les mutations de la boîte B2 de PML pourraient entraîner des défauts d'entrée en sénescence. Pour cela, nous proposons d'étudier différents marqueurs de l'entrée en sénescence (test  $\beta$ -galactosidase, activation des voies p16 et p53...) en réponse à différents stress induisant la sénescence (irradiation, CCl<sub>4</sub>...) dans des souris sauvages ou exprimant les mutants *Pml*<sup>C213V</sup>, *Pml*<sup>A220V</sup> et *Pml*<sup>L218G</sup> générées par CRISPR-Cas9. Nous proposons aussi de dériver des MEF primaires à partir de ces animaux et d'étudier si les différentes mutations de la boîte B2 de PML protègent les cellules de l'entrée en sénescence répllicative ou induite par l'oncogène *KRAS*<sup>G12V</sup>. Ces expériences permettront de déterminer l'impact de la trimérisation de la boîte B2 de PML dans la régulation de la sénescence *in vivo*.

### *Rôle de PML dans les maladies neurodégénératives*

Les maladies neurodégénératives à expansion de poly-glutamines sont causées par une expansion d'un triplet CAG sur l'ADN codant pour des chaînes de poly-glutamines (polyQ) qui forment des feuilletés  $\beta$  et s'associent en structures fibrillaires (Buchanan et al., 2014), responsables de la neurodégénérescence. Les mécanismes d'assemblage des protéines à polyQ en agrégats sont similaires et il a été proposé qu'un mutant de l'ataxine1 présentant une expansion de polyQ s'assemble en condensats par LLPS (Zhang et al., 2020).

Les CNP recrutent certaines protéines à expansion de polyQ et contrôlent leur SUMO-ubiquitination suivie de leur dégradation par le protéasome (Guo et al., 2014; Janer et al., 2006; Marinello et al., 2019). Dans ce contexte, une délétion de *Pml* chez les souris exprimant une protéine SCA1 mutée exacerbe la déficience motrice (Guo et al., 2014). A l'inverse un traitement

à l'interféron  $\beta$  des animaux exprimant une protéine SCA7 mutée induit l'expression de PML et la formation des CNP, augmentant la dégradation de l'ataxine mutante et améliorant les tests comportementaux en prévenant la mort des cellules neurales (Chort et al., 2013). PML pourrait également contrôler la dégradation d'autres protéines à expansion de polyQ selon le même mécanisme (Guo et al., 2014).

Dans nos modèles cellulaires exprimant différents mutants de la protéine PML fusionnée à la GFP, il pourrait être intéressant d'étudier les modalités de recrutement de l'ataxine à expansion de polyQ aux CNP et le rôle du LLPS dans ce processus. Une étude portant sur le nucléole a proposé que le recrutement de protéines mal conformées en réponse au stress au sein de la composante granulaire modifie la dynamique d'assemblage de la nucléophosmine (Frottin et al., 2019). Il serait donc intéressant de questionner le lien entre la dynamique de PML aux CNP et l'accumulation de protéines à polyQ, et inversement.

La cystéine C389 de PML a récemment été identifiée comme responsable du recrutement de la protéine oncogénique NPM1<sub>cytoplasmique</sub> aux CNP *via* la formation d'un pont disulfure intermoléculaire avec la cystéine C288 de la nucléophosmine (Wu et al., 2021). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ce résidu ainsi que de la C213 de PML dans le recrutement de l'ataxine à expansion de polyQ aux CNP et dans l'induction de sa dégradation par SUMO-ubiquitination dans nos modèles de cellules et de souris exprimant les protéines mutantes PML<sup>C213V</sup> et PML<sup>C389S</sup>.

# Conclusion

Ce projet de thèse a permis d'affiner les connaissances sur les mécanismes d'assemblage des CNP. En utilisant différentes techniques et expertises, nous avons pu déterminer que les CNP présentent certaines caractéristiques d'organelles sans membranes s'assemblant par LLPS mais que ce mécanisme ne peut pas à lui seul expliquer leur formation complexe.

Les résultats obtenus au cours de cette étude indiquent que l'assemblage des CNP ne repose pas sur la formation de ponts disulfures intermoléculaires mais sur des interactions au niveau de son RBCC. Nous nous sommes focalisés sur l'étude du domaine B2 de PML - retrouvé muté chez les patients LAP résistants à la thérapie par l'arsenic - et avons démontré le rôle central de son hélice  $\alpha$  dans la régulation de la dynamique de la protéine PML aux CNP. Nous avons proposé que la boîte B2 de PML contrôle la dynamique d'assemblage des CNP en s'assemblant en un homo-trimère au moyen d'interactions hydrophobes au niveau de l'hélice  $\alpha$ .

De futures études menées au laboratoire s'intéresseront au rôle des modifications post-traductionnelles de PML et de ses autres domaines dans la régulation de sa dynamique d'assemblage aux CNP. De nouvelles approches alliant biologie cellulaire et modélisation *in silico* viseront à élucider les modalités d'assemblage des CNP.

Dans une seconde partie, cette étude a permis d'élucider le mécanisme d'action thérapeutique de l'arsenic sur PML. Nous réfutons l'hypothèse stipulant que l'arsenic se fixe sur le RING de PML et proposons que l'assemblage en homo-trimère de la boîte B2 de PML rapproche trois résidus cystéine C213 qui ne coordonnent pas le zinc pour former le site de liaison de l'arsenic sur la protéine. La fixation de l'arsenic sur PML induit une transition de phase des CNP d'une structure de type liquide vers une structure de type gel responsable de l'induction de leur formation. De futures études s'intéresseront au rôle de la boîte B2 de PML dans le développement de la LAP et dans l'effet thérapeutique de l'arsenic sur PML-RAR $\alpha$ . Les résultats obtenus durant ce projet ouvrent également la voie au développement de nouvelles molécules thérapeutiques mimant l'arsenic et pouvant être utilisées dans le traitement de la LAP et d'autres cancers où PML est impliqué.

Le développement en cours de corps nucléaires PML artificiels dont nous pouvons contrôler l'assemblage par LLPS permettra de questionner le lien structure/dynamique/fonction

des CNP. L'utilisation de cet outil et des approches *in silico* nous permettront de déterminer la participation du LLPS dans la formation des CNP. Enfin, en augmentant le nombre de répétitions de la protéine d'architecture des corps anti-PML - qui devrait permettre la formation de corps présentant des caractéristiques de type gel en absence d'arsenic - nous souhaitons mettre en évidence un lien entre des changements de la dynamique d'assemblage des CNP et la modulation de leur activité biochimique.



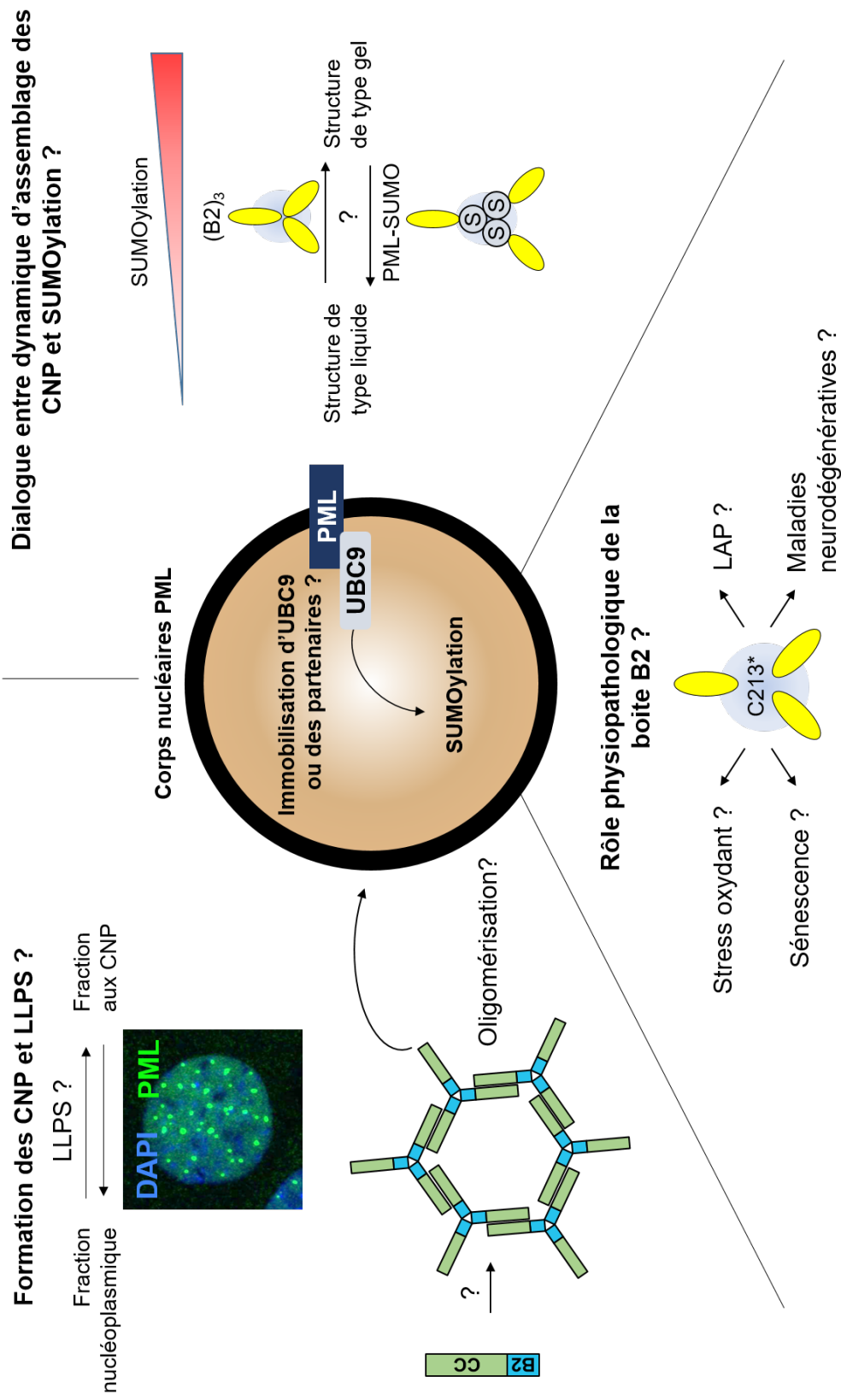


Figure 30 : Régulation de l'assemblage des CNP par la boîte B2 et son implication en physiopathologie

La mise en évidence de la formation d'un trimère de la boîte B2 qui module la dynamique de formation des CNP et la SUMOylation de PML soulève plusieurs questions biologiques. De futures études s'intéresseront à comprendre la formation des CNP en structures core-shell, à interroger le dialogue entre la dynamique de PML aux CNP et l'activité de SUMOylation aux corps nucléaires ainsi qu'à identifier le rôle physiopathologique de ce domaine.

# Bibliographie

- Ablain, J., de Thé, H., 2014. Retinoic acid signaling in cancer: The parable of acute promyelocytic leukemia: Retinoic Acid Signaling in Cancer. *Int. J. Cancer* 135, 2262–2272. <https://doi.org/10.1002/ijc.29081>
- Ablain, J., Leiva, M., Peres, L., Fonsart, J., Anthony, E., de Thé, H., 2013. Uncoupling RARA transcriptional activation and degradation clarifies the bases for APL response to therapies. *J. Exp. Med.* 210, 647–653. <https://doi.org/10.1084/jem.20122337>
- Ablain, J., Rice, K., Soilihi, H., de Reynies, A., Minucci, S., de Thé, H., 2014. Activation of a promyelocytic leukemia–tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nat. Med.* 20, 167–174. <https://doi.org/10.1038/nm.3441>
- Ahmad, Y., Boisvert, F.-M., Gregor, P., Copley, A., Lamond, A.I., 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res.* 37, D181–D184. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn804>
- Ahn, J.H., Davis, E.S., Daugird, T.A., Zhao, S., Quiroga, I.Y., Uryu, H., Li, J., Storey, A.J., Tsai, Y.-H., Keeley, D.P., Mackintosh, S.G., Edmondson, R.D., Byrum, S.D., Cai, L., Tackett, A.J., Zheng, D., Legant, W.R., Phanstiel, D.H., Wang, G.G., 2021. Phase separation drives aberrant chromatin looping and cancer development. *Nature* 595, 591–595. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03662-5>
- Alcalay, M., Tomassoni, L., Colombo, E., Stoldt, S., Grignani, F., Fagioli, M., Szekely, L., Helin, K., Pelicci, P.G., 1998. The Promyelocytic Leukemia Gene Product (PML) Forms Stable Complexes with the Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1084–1093. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.2.1084>
- Antolini, F., Bello, M.L., Sette, M., 2003. Purified promyelocytic leukemia coiled-coil aggregates as a tetramer displaying low  $\alpha$ -helical content. *Protein Expr. Purif.* 29, 94–102. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00004-4)
- Arreal, L., Piva, M., Fernández, S., Revandkar, A., Schaub- Clerigué, A., Villanueva, J., Zabala-Letona, A., Pujana, M., Astobiza, I., Cortazar, A.R., Hermanova, I., Bozal-Basterra, L., Arruabarrena-Aristorena, A., Crespo, J.R., Valcarcel-Jimenez, L., Zúñiga-García, P., Canals, F., Torrano, V., Barrio, R., Sutherland, J.D., Alimonti, A., Martin-Martin, N., Carracedo, A., 2020. Targeting PML in triple negative breast cancer elicits growth suppression and senescence. *Cell Death Differ.* 27, 1186–1199. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0407-5>
- Attwood, K.M., Salsman, J., Chung, D., Mathavarajah, S., Van Iderstine, C., Delleire, G., 2020. PML isoform expression and DNA break location relative to PML nuclear bodies impacts the efficiency of homologous recombination. *Biochem. Cell Biol.* 98, 314–326. <https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0115>
- Badilla, C., Osborne, T.H., Cole, A., Watson, C., Djordjevic, S., Santini, J.M., 2018. A new family of periplasmic-binding proteins that sense arsenic oxyanions. *Sci. Rep.* 8, 6282. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24591-w>
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., Rosen, M.K., 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., Rosen, M.K., 2016. Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* 166, 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010>
- Barra, J., Gaidosh, G.S., Blumenthal, E., Beckedorff, F., Tayari, M.M., Kirstein, N., Karakach, T.K., Jensen, T.H., Impens, F., Gevaert, K., Leucci, E., Shiekhatar, R., Marine, J.-C., 2020. Integrator restrains paraspeckles assembly by promoting isoform switching of the lncRNA *NEAT1*. *Sci. Adv.* 6, eaaz9072. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz9072>
- Barroso-Gomila, O., Trulsson, F., Muratore, V., Canosa, I., Merino-Cacho, L., Cortazar, A.R., Pérez, C., Azkargorta, M., Iloro, I., Carracedo, A., Aransay, A.M., Elortza, F., Mayor, U., Vertegaal, A.C.O., Barrio, R., Sutherland, J.D., 2021. Identification of proximal SUMO-dependent interactors using SUMO-ID. *Nat. Commun.* 12, 6671. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26807-6>

- Bernardi, R., Pandolfi, P.P., 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 1006–1016. <https://doi.org/10.1038/nrm2277>
- Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Bergmann, S., Horn, H.F., Vousden, K.H., Pandolfi, P.P., 2004. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 6, 665–672. <https://doi.org/10.1038/ncb1147>
- Berry, J., Weber, S.C., Vaidya, N., Haataja, M., Brangwynne, C.P., 2015. RNA transcription modulates phase transition-driven nuclear body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509317112>
- Bischof, O., 2002. Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J.* 21, 3358–3369. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf341>
- Bloomer, W.A.C., VanDongen, H.M.A., VanDongen, A.M.J., 2007. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Res.* 1153, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.079>
- Boddy, M.N., Howe, K., Etkin, L.D., Solomon, E., Freemont, P.S., 1996. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene* 13, 971–982.
- Boisvert, F.-M., Hendzel, M.J., Bazett-Jones, D.P., 2000. Promyelocytic Leukemia (Pml) Nuclear Bodies Are Protein Structures That Do Not Accumulate RNA. *J. Cell Biol.* 148, 283–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.283>
- Bossis, G., Melchior, F., 2006. Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes. *Mol. Cell* 21, 349–357. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.019>
- Brand, P., Lenser, T., Hemmerich, P., 2010. Assembly dynamics of PML nuclear bodies in living cells. *PMC Biophys.* 3, 3. <https://doi.org/10.1186/1757-5036-3-3>
- Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoegel, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., Hyman, A.A., 2009. Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science* 324, 1729–1732. <https://doi.org/10.1126/science.1172046>
- Brangwynne, C.P., Mitchison, T.J., Hyman, A.A., 2011. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4334–4339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>
- Breitman, T.R., Collins, S.J., Keene, B.R., 1981. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood* 57, 1000–1004.
- Buchanan, L.E., Carr, J.K., Fluit, A.M., Hoganson, A.J., Moran, S.D., de Pablo, J.J., Skinner, J.L., Zanni, M.T., 2014. Structural motif of polyglutamine amyloid fibrils discerned with mixed-isotope infrared spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 5796–5801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401587111>
- Butler, K., Martinez, L.A., Tejada-Simon, M.V., 2013. Impaired cognitive function and reduced anxiety-related behavior in a promyelocytic leukemia (PML) tumor suppressor protein-deficient mouse: Impaired cognitive function and reduced anxiety-related behavior in a PML knockout mouse. *Genes Brain Behav.* 12, 189–202. <https://doi.org/10.1111/gbb.12014>
- Campagna, M., Herranz, D., Garcia, M.A., Marcos-Villar, L., González-Santamaría, J., Gallego, P., Gutierrez, S., Collado, M., Serrano, M., Esteban, M., Rivas, C., 2011. SIRT1 stabilizes PML promoting its sumoylation. *Cell Death Differ.* 18, 72–79. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.77>
- Cappadocia, L., Mascle, X.H., Bourdeau, V., Tremblay-Belzile, S., Chaker-Margot, M., Lussier-Price, M., Wada, J., Sakaguchi, K., Aubry, M., Ferbeyre, G., Omichinski, J.G., 2015. Structural and Functional Characterization of the Phosphorylation-Dependent Interaction between PML and SUMO1. *Structure* 23, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.10.015>
- Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S., Pelicci, P.G., 2002. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene* 21, 1633–1640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205227>

- Carracedo, A., Rousseau, D., Douris, N., Fernández-Ruiz, S., Martín-Martín, N., Weiss, D., Webster, K., Adams, A.C., Vazquez-Chantada, M., Martínez-Chantar, M.L., Anty, R., Tran, A., Maratos-Flier, E., Gual, P., Pandolfi, P.P., 2015. The Promyelocytic Leukemia Protein Is Upregulated in Conditions of Obesity and Liver Steatosis. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 629–632. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11615>
- Carracedo, A., Weiss, D., Leliaert, A.K., Bhasin, M., de Boer, V.C.J., Laurent, G., Adams, A.C., Sundvall, M., Song, S.J., Ito, K., Finley, L.S., Egja, A., Libermann, T., Gerhart-Hines, Z., Puigserver, P., Haigis, M.C., Maratos-Flier, E., Richardson, A.L., Schafer, Z.T., Pandolfi, P.P., 2012. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 122, 3088–3100. <https://doi.org/10.1172/JCI62129>
- Carthagen, L., Bergamaschi, A., Luna, J.M., David, A., Uchil, P.D., Margottin-Goguet, F., Mothes, W., Hazan, U., Transy, C., Pancino, G., Nisole, S., 2009. Human TRIM Gene Expression in Response to Interferons. *PLoS ONE* 4, e4894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004894>
- Catez, F., Picard, C., Held, K., Gross, S., Rousseau, A., Theil, D., Sawtell, N., Labetoulle, M., Lomonte, P., 2012. HSV-1 Genome Subnuclear Positioning and Associations with Host-Cell PML-NBs and Centromeres Regulate LAT Locus Transcription during Latency in Neurons. *PLoS Pathog.* 8, e1002852. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002852>
- Cesare, A.J., Reddel, R.R., 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* 11, 319–330. <https://doi.org/10.1038/nrg2763>
- Chambon, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 10, 940–954.
- Chang, H.Y., 1998. Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx. *Science* 281, 1860–1863. <https://doi.org/10.1126/science.281.5384.1860>
- Chelbi-Alix, M.K., Pelicano, L., Quignon, F., Koken, M.H., Venturini, L., Stadler, M., Pavlovic, J., Degos, L., de Thé, H., 1995. Induction of the PML protein by interferons in normal and APL cells. *Leukemia* 9, 2027–2033.
- Chen, G., Zhu, J., Shi, X., Ni, J., Zhong, H., Si, G., Jin, X., Tang, W., Li, X., Xong, S., Shen, Z., Sun, G., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T., Gazin, C., Naoe, T., Chen, S., Wang, Z., Chen, Z., 1996. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood* 88, 1052–1061. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.3.1052.1052>
- Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W., Xiong, S.M., Zhu, J., Cai, X., Han, Z.G., Ni, J.H., Shi, G.Y., Jia, P.M., Liu, M.M., He, K.L., Niu, C., Ma, J., Zhang, P., Zhang, T.D., Paul, P., Naoe, T., Kitamura, K., Miller, W., Waxman, S., Wang, Z.Y., de Thé, H., Chen, S.J., Chen, Z., 1997. Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89, 3345–3353.
- Chen, S.J., Chen, Z., Chen, A., Tong, J.H., Dong, S., Wang, Z.Y., Waxman, S., Zelent, A., 1992. Occurrence of distinct PML-RAR-alpha fusion gene isoforms in patients with acute promyelocytic leukemia detected by reverse transcriptase/polymerase chain reaction. *Oncogene* 7, 1223–1232.
- Cheng, X., Kao, H.-Y., 2013. Post-translational modifications of PML: consequences and implications. *Front. Oncol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00210>
- Childs, B.G., Durik, M., Baker, D.J., van Deursen, J.M., 2015. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 21, 1424–1435. <https://doi.org/10.1038/nm.4000>
- Chillón, M.C., González, M., García-Sanz, R., Balanzategui, A., González, D., López-Pérez, R., Mateos, M.V., Alaejos, I., Rayón, C., Arbeteta, J., Hernández, J.M., Orfao, A., San Miguel, J., 2000. Two new 3' PML breakpoints in t(15;17)(q22;q21)-positive acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 35–43.

- Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, N., Daniel, M., Fenaux, P., Castaigne, S., Degos, L., 1990. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood* 76, 1710–1717. <https://doi.org/10.1182/blood.V76.9.1710.1710>
- Chong, S., Graham, T.G.W., Dugast-Darzacq, C., Dailey, G.M., Darzacq, X., Tjian, R., 2022. Tuning levels of low-complexity domain interactions to modulate endogenous oncogenic transcription. *Mol. Cell* 82, 2084–2097.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.007>
- Chort, A., Alves, S., Marinello, M., Dufresnois, B., Dornbierer, J.-G., Tesson, C., Latouche, M., Baker, D.P., Barkats, M., El Hachimi, K.H., Ruberg, M., Janer, A., Stevanin, G., Brice, A., Sittler, A., 2013. Interferon beta induces clearance of mutant ataxin 7 and improves locomotion in SCA7 knock-in mice. *Brain* 136, 1732–1745. <https://doi.org/10.1093/brain/awt061>
- Cochard, A., Safieddine, A., Combe, P., Benassy, M.-N., Weil, D., Gueroui, Z., 2022. Condensate functionalization with motors directs their nucleation in space and allows manipulating RNA localization (preprint). *Cell Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.07.10.499452>
- Cohen, C., Corpet, A., Roubille, S., Maroui, M.A., Poccardi, N., Rousseau, A., Kleijwegt, C., Binda, O., Texier, P., Sawtell, N., Labetoulle, M., Lomonte, P., 2018. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBs) induce latent/quiescent HSV-1 genomes chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis. *PLOS Pathog.* 14, e1007313. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007313>
- Condemine, W., Takahashi, Y., Le Bras, M., de Thé, H., 2007. A nucleolar targeting signal in PML-I addresses PML to nucleolar caps in stressed or senescent cells. *J. Cell Sci.* 120, 3219–3227. <https://doi.org/10.1242/jcs.007492>
- Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., de Thé, H., 2006. Characterization of Endogenous Human Promyelocytic Leukemia Isoforms. *Cancer Res.* 66, 6192–6198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3792>
- Conlan, L.A., McNeese, C.J., Heierhorst, J., 2004. Proteasome-dependent dispersal of PML nuclear bodies in response to alkylating DNA damage. *Oncogene* 23, 307–310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207119>
- Conrad, E., Polonio-Vallon, T., Meister, M., Matt, S., Bitomsky, N., Herbel, C., Liebl, M., Greiner, V., Kriznik, B., Schumacher, S., Kriehoff-Henning, E., Hofmann, T.G., 2016. HIPK2 restricts SIRT1 activity upon severe DNA damage by a phosphorylation-controlled mechanism. *Cell Death Differ.* 23, 110–122. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.75>
- Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., Lomonte, P., 2020. PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can! *Nucleic Acids Res.* 48, 11890–11912. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828>
- Correll, C.C., Bartek, J., Dundr, M., 2019. The Nucleolus: A Multiphase Condensate Balancing Ribosome Synthesis and Translational Capacity in Health, Aging and Ribosomopathies. *Cells* 8, 869. <https://doi.org/10.3390/cells8080869>
- Crowder, C., Dahle, Ø., Davis, R.E., Gabrielsen, O.S., Rudikoff, S., 2005. PML mediates IFN-alpha-induced apoptosis in myeloma by regulating TRAIL induction. *Blood* 105, 1280–1287. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1614>
- Cuchet, D., Sykes, A., Nicolas, A., Orr, A., Murray, J., Sirma, H., Heeren, J., Bartelt, A., Everett, R.D., 2011. PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication. *J. Cell Sci.* 124, 280–291. <https://doi.org/10.1242/jcs.075390>
- Dagher, T., Maslah, N., Edmond, V., Cassinat, B., Vainchenker, W., Giraudier, S., Pasquier, F., Verger, E., Niwa-Kawakita, M., Lallemand-Breitenbach, V., Plo, I., Kiladjian, J.-J., Villeval, J.-L., de Thé, H., 2021. JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML. *J. Exp. Med.* 218, e20201268. <https://doi.org/10.1084/jem.20201268>

- Dassouki, Z., Sahin, U., El Hajj, H., Jollivet, F., Kfoury, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Hermine, O., Bazarbachi, A., 2015. ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. *Blood* 125, 474–482.
- de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G., Lowe, S.W., 2004. PML Is a Direct p53 Target that Modulates p53 Effector Functions. *Mol. Cell* 13, 523–535. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00062-0)
- de Thé, H., 2018. Differentiation therapy revisited. *Nat. Rev. Cancer* 18, 117–127. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.103>
- de Thé, H., Chen, Z., 2010. Acute promyelocytic leukaemia: novel insights into the mechanisms of cure. *Nat. Rev. Cancer* 10, 775–783. <https://doi.org/10.1038/nrc2943>
- de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L., Dejean, A., 1990. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor  $\alpha$  gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347, 558–561. <https://doi.org/10.1038/347558a0>
- de Thé, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., Dejean, A., 1991. The PML-RAR $\alpha$  fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675–684. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90113-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90113-D)
- de Thé, H., Pandolfi, P.P., Chen, Z., 2017. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell* 32, 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.002>
- Degos, L., Dombret, H., Chomienne, C., Daniel, M., Miclea, J., Chastang, C., Castaigne, S., Fenaux, P., 1995. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia [see comments]. *Blood* 85, 2643–2653. <https://doi.org/10.1182/blood.V85.10.2643.bloodjournal85102643>
- Dellaire, G., 2006. The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J. Cell Sci.* 119, 1026–1033. <https://doi.org/10.1242/jcs.02816>
- Dellaire, G., Bazett-Jones, D.P., 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 26, 963–977. <https://doi.org/10.1002/bies.20089>
- Dellaire, G., Ching, R.W., Ahmed, K., Jalali, F., Tse, K.C.K., Bristow, R.G., Bazett-Jones, D.P., 2006. Promyelocytic leukemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J. Cell Biol.* 175, 55–66. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604009>
- di Masi, A., Cilli, D., Berardinelli, F., Talarico, A., Pallavicini, I., Pennisi, R., Leone, S., Antoccia, A., Noguera, N.I., Lo-Coco, F., Ascenzi, P., Minucci, S., Nervi, C., 2016. PML nuclear body disruption impairs DNA double-strand break sensing and repair in APL. *Cell Death Dis.* 7, e2308–e2308. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.115>
- Dinmohamed, A.G., Visser, O., 2019. Incidence of acute promyelocytic leukemia across Europe: results of RARECAREnet—a population-based study. *Stem Cell Investig.* 6, 37–37. <https://doi.org/10.21037/sci.2019.10.03>
- Dong, S., Stenoién, D.L., Qiu, J., Mancini, M.A., Twardy, D.J., 2004. Reduced Intranuclear Mobility of APL Fusion Proteins Accompanies Their Mislocalization and Results in Sequestration and Decreased Mobility of Retinoid X Receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.* 24, 4465–4475. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4465-4475.2004>
- Dopie, J., Sweredoski, M.J., Moradian, A., Belmont, A.S., 2020. Tyramide signal amplification mass spectrometry (TSA-MS) ratio identifies nuclear speckle proteins. *J. Cell Biol.* 219, e201910207. <https://doi.org/10.1083/jcb.201910207>
- Duprez, E., Saurin, A.J., Desterro, J.M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M.N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R.T., Freemont, P.S., 1999. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 3), 381–393.

- Dutrieux, J., Maarifi, G., Portilho, D.M., Arhel, N.J., Chelbi-Alix, M.K., Nisole, S., 2015. PML/TRIM19-Dependent Inhibition of Retroviral Reverse-Transcription by Daxx. *PLOS Pathog.* 11, e1005280. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005280>
- Echaniz-Laguna, A., Benoit, A., Vinzio, S., Fornecker, L.-M., Lannes, B., Goullé, J.-P., Broly, F., Mousson de Camaret, B., 2012. Mitochondrial myopathy caused by arsenic trioxide therapy. *Blood* 119, 4272–4274. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-385138>
- El Asmi, F., Maroui, M.A., Dutrieux, J., Blondel, D., Nisole, S., Chelbi-Alix, M.K., 2014. Implication of PMLIV in Both Intrinsic and Innate Immunity. *PLoS Pathog.* 10, e1003975. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003975>
- El Mchichi, B., Regad, T., Maroui, M.-A., Rodriguez, M.S., Aminev, A., Gerbaud, S., Escriou, N., Dianoux, L., Chelbi-Alix, M.K., 2010. SUMOylation Promotes PML Degradation during Encephalomyocarditis Virus Infection. *J. Virol.* 84, 11634–11645. <https://doi.org/10.1128/JVI.01321-10>
- Emsley, P., Cowtan, K., 2004. *Coot* : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., Bazett-Jones, D.P., 2004. Chromatin Contributes to Structural Integrity of Promyelocytic Leukemia Bodies through a SUMO-1-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 279, 9577–9585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312580200>
- Eskiw, C.H., Dellaire, G., Mymryk, J.S., Bazett-Jones, D.P., 2003. Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *J. Cell Sci.* 116, 4455–4466. <https://doi.org/10.1242/jcs.00758>
- Estey, E.H., Giles, F.J., Kantarjian, H., O'Brien, S., Cortes, J., Freireich, E.J., Lopez-Berestein, G., Keating, M., 1999. Molecular remissions induced by liposomal-encapsulated all-trans retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94, 2230–2235.
- Evans, P.R., Murshudov, G.N., 2013. How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 69, 1204–1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
- Everett, R.D., 2006. Interactions between DNA viruses, ND10 and the DNA damage response. *Cell. Microbiol.* 8, 365–374. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00677.x>
- Everett, R.D., Chelbi-Alix, M.K., 2007. PML and PML nuclear bodies: Implications in antiviral defence. *Biochimie* 89, 819–830. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.01.004>
- Fagioli, M., Alcalay, M., Tomassoni, L., Ferrucci, P.F., Mencarelli, A., Riganelli, D., Grignani, Francesco, Pozzan, T., Nicoletti, I., Grignani, Fausto, Pelicci, P.G., 1998. Cooperation between the RING+B1-B2 and coiled-coil domains of PML is necessary for its effects on cell survival 9.
- Falahati, H., Pelham-Webb, B., Blythe, S., Wieschaus, E., 2016. Nucleation by rRNA Dictates the Precision of Nucleolus Assembly. *Curr. Biol.* 26, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.065>
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., Lowe, S.W., 2000. PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* 14, 2015–2027.
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T.S., Mitrea, D.M., Zhu, L., Richardson, T.M., Kriwacki, R.W., Pappu, R.V., Brangwynne, C.P., 2016. Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* 165, 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047>
- Flora, S.J., 1999. ARSENIC-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND ITS REVERSIBILITY FOLLOWING COMBINED ADMINISTRATION OF N-ACETYLCYSTEINE AND MESO 2,3-DIMERCAPTOSUCCINIC ACID IN RATS. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26, 865–869. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.1999.03157.x>
- Fogal, V., 2000. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19, 6185–6195. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6185>
- Fonin, A.V., Silonov, S.A., Fefilova, A.S., Stepanenko, O.V., Gavrilova, A.A., Petukhov, A.V., Romanovich, A.E., Modina, A.L., Zueva, T.S., Nedelyaev, E.M., Pleskach, N.M., Kuranova, M.L., Kuznetsova, I.M., Uversky, V.N., Turoverov, K.K., 2022. New Evidence of the Importance of Weak Interactions in the Formation of PML-Bodies. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1613. <https://doi.org/10.3390/ijms23031613>



- Fox, A.H., Nakagawa, S., Hirose, T., Bond, C.S., 2018. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem. Sci.* 43, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.12.001>
- Freitas, R.A., Silva dos Santos, G.A., Gimenes Teixeira, H.L., Scheucher, P.S., Lucena-Araujo, A.R., Lima, A.S.G., Abreu e Lima, R.S., Garcia, A.B., Jordão, A.A., Falcão, R.P., Vannucchi, H., Rego, E.M., 2009. Apoptosis induction by (+)α-tocopheryl succinate in the absence or presence of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in NB4, NB4-R2 and primary APL cells. *Leuk. Res.* 33, 958–963. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.09.035>
- Frey, M.R., Matera, A.G., 1995. Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5915–5919. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5915>
- Frottin, F., Schueder, F., Tiwary, S., Gupta, R., Körner, R., Schlichthaerle, T., Cox, J., Jungmann, R., Hartl, F.U., Hipp, M.S., 2019. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science* 365, 342–347. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9157>
- G. De Thé, M. Riviere, W. Bernhard, 1960. Examen au microscope électronique de la tumeur VX2 du lapin domestique dérivée du papillome de Shope. *Bull Cancer* 570–584.
- Galisson, F., Mahrouche, L., Courcelles, M., Bonneil, E., Meloche, S., Chelbi-Alix, M.K., Thibault, P., 2011. A Novel Proteomics Approach to Identify SUMOylated Proteins and Their Modification Sites in Human Cells. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.004796. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.004796>
- Garcia, P.B., Attardi, L.D., 2014. Illuminating p53 function in cancer with genetically engineered mouse models. *Semin. Cell Dev. Biol.* 27, 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.12.014>
- Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., Gueroui, Z., 2019. RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA–protein condensates. *Nat. Commun.* 10, 3230. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11241-6>
- Gareau, J.R., Lima, C.D., 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 861–871. <https://doi.org/10.1038/nrm3011>
- Gentric, G., Kieffer, Y., Mieulet, V., Goundiam, O., Bonneau, C., Nemati, F., Hurbain, I., Raposo, G., Popova, T., Stern, M.-H., Lallemand-Breitenbach, V., Müller, S., Cañeque, T., Rodriguez, R., Vincent-Salomon, A., de Thé, H., Rossignol, R., Mechta-Grigoriou, F., 2019. PML-Regulated Mitochondrial Metabolism Enhances Chemosensitivity in Human Ovarian Cancers. *Cell Metab.* 29, 156–173.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.002>
- Geoffroy, M.-C., Chelbi-Alix, M.K., 2011. Role of Promyelocytic Leukemia Protein in Host Antiviral Defense. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 145–158. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0111>
- Geoffroy, M.-C., de Thé, H., 2020. Classic and Variants APLs, as Viewed from a Therapy Response. *Cancers* 12, 967. <https://doi.org/10.3390/cancers12040967>
- Geoffroy, M.-C., Jaffray, E.G., Walker, K.J., Hay, R.T., 2010. Arsenic-Induced SUMO-Dependent Recruitment of RNF4 into PML Nuclear Bodies. *Mol. Biol. Cell* 21, 4227–4239. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-05-0449>
- Giorgi, C., Ito, K., Lin, H.-K., Santangelo, C., Wieckowski, M.R., Lebiezinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., Rizzuto, R., Tacchetti, C., Pinton, P., Pandolfi, P.P., 2010. PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release. *Science* 330, 1247–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1189157>
- Giovannoni, F., Ladelfa, M.F., Monte, M., Jans, D.A., Hemmerich, P., García, C., 2019. Dengue Non-structural Protein 5 Polymerase Complexes With Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Isoforms III and IV to Disrupt PML-Nuclear Bodies in Infected Cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 284. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00284>

- Goto, E., Tomita, A., Hayakawa, F., Atsumi, A., Kiyoi, H., Naoe, T., 2011. Missense mutations in PML-RARA are critical for the lack of responsiveness to arsenic trioxide treatment. *Blood* 118, 1600–1609. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-329433>
- Granger, M.P., Wright, W.E., Shay, J.W., 2002. Telomerase in cancer and aging. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 41, 29–40. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00188-3)
- Greider, C.W., Blackburn, E.H., 1989. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331–337. <https://doi.org/10.1038/337331a0>
- Grignani, Francesco, Gelmetti, V., Fanelli, M., Rogai, D., De Matteis, S., Ferrara, F.F., Bonci, D., Grignani, Fausto, Nervi, C., Pelicci, P.G., 1999. Formation of PML/RAR $\alpha$  high molecular weight nuclear complexes through the PML coiled-coil region is essential for the PML/RAR $\alpha$ -mediated retinoic acid response. *Oncogene* 18, 6313–6321. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203029>
- Grigoryan, G., Keating, A., 2008. Structural specificity in coiled-coil interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.04.008>
- Grimwade, D., Howe, K., Langabeer, S., Davies, L., Oliver, F., Walker, H., Swirsky, D., Wheatley, K., Goldstone, A., Burnett, A., Solomon, E., 1996. Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. M.R.C. Adult Leukaemia Working Party. *Br. J. Haematol.* 94, 557–573.
- Guo, L., Giasson, B.I., Glavis-Bloom, A., Brewer, M.D., Shorter, J., Gitler, A.D., Yang, X., 2014. A Cellular System that Degrades Misfolded Proteins and Protects against Neurodegeneration. *Mol. Cell* 55, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.030>
- Gurrieri, C., Capodiecì, P., Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Nafa, K., Rush, L.J., Verbel, D.A., Cordon-Cardo, C., Pandolfi, P.P., 2004. Loss of the Tumor Suppressor PML in Human Cancers of Multiple Histologic Origins. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 96, 269–279. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh043>
- Han, Y.H., Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, W.H., 2007. Arsenic trioxide inhibits growth of As4.1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 293, F511–F520. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00385.2006>
- Hancock, R., 2004. A role for macromolecular crowding effects in the assembly and function of compartments in the nucleus. *J. Struct. Biol.* 146, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.12.008>
- Hands, K.J., Cuchet-Lourenco, D., Everett, R.D., Hay, R.T., 2014. PML isoforms in response to arsenic: high-resolution analysis of PML body structure and degradation. *J. Cell Sci.* 127, 365–375. <https://doi.org/10.1242/jcs.132290>
- Hashimoto, M., Takemoto, T., 2015. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci. Rep.* 5, 11315. <https://doi.org/10.1038/srep11315>
- Hayakawa, F., Abe, A., Kitabayashi, I., Pandolfi, P.P., Naoe, T., 2008. Acetylation of PML Is Involved in Histone Deacetylase Inhibitor-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 24420–24425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802217200>
- Hayakawa, F., Privalsky, M.L., 2004. Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* 5, 389–401. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00082-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00082-0)
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Heaphy, C.M., Subhawong, A.P., Hong, S.-M., Goggins, M.G., Montgomery, E.A., Gabrielson, E., Netto, G.J., Epstein, J.I., Lotan, T.L., Westra, W.H., Shih, I.-M., Iacobuzio-Donahue, C.A., Maitra, A., Li, Q.K., Eberhart, C.G., Taube, J.M., Rakheja, D., Kurman, R.J., Wu, T.C., Roden, R.B., Argani, P., De Marzo, A.M., Terracciano, L., Torbenson, M., Meeker, A.K., 2011. Prevalence of the Alternative

- Lengthening of Telomeres Telomere Maintenance Mechanism in Human Cancer Subtypes. *Am. J. Pathol.* 179, 1608–1615. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.06.018>
- Henson, J.D., Neumann, A.A., Yeager, T.R., Reddel, R.R., 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21, 598–610. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205058>
- Hernandez-Verdun, D., Louvet, É., 2004. Le nucléole : structure, fonctions et maladies associées. *médecine/sciences* 20, 37–44. <https://doi.org/10.1051/medsci/200420137>
- Hillestad, L.K., 1957. Acute promyelocytic leukemia. *Acta Med. Scand.* 159, 189–194.
- Hleihel, R., El Hajj, H., Wu, H.-C., Berthier, C., Zhu, H.-H., Massoud, R., Chakhachiro, Z., El Sabban, M., De The, H., Bazarbachi, A., 2021. A Pin1/PML/P53 axis activated by retinoic acid in *NPM-1c* acute myeloid leukemia. *Haematologica* 106, 3090–3099. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.274878>
- Hoischen, C., Monajembashi, S., Weisshart, K., Hemmerich, P., 2018. Multimodal Light Microscopy Approaches to Reveal Structural and Functional Properties of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. *Front. Oncol.* 8, 125. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00125>
- Hsu, K.-S., Kao, H.-Y., 2018. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci.* 8. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8>
- Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., Wang, Z.Y., 1988. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72, 567–572.
- Huang, P., Chandra, V., Rastinejad, F., 2014. Retinoic Acid Actions through Mammalian Nuclear Receptors. *Chem. Rev.* 114, 233–254. <https://doi.org/10.1021/cr400161b>
- Huang, S.-Y., Naik, M.T., Chang, C.-F., Fang, P.-J., Wang, Y.-H., Shih, H.-M., Huang, T., 2014. The B-box 1 dimer of human promyelocytic leukemia protein. *J. Biomol. NMR* 60, 275–281. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9869-4>
- Huang, Y., Qiu, J., Chen, G., Dong, S., 2008. Coiled-coil domain of PML is essential for the aberrant dynamics of PML-RAR $\alpha$ , resulting in sequestration and decreased mobility of SMRT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.184>
- Humpton, T.J., Hall, H., Kiourtis, C., Nixon, C., Clark, W., Hedley, A., Shaw, R., Bird, T.G., Blyth, K., Vousden, K.H., 2022. p53-mediated redox control promotes liver regeneration and maintains liver function in response to CCl<sub>4</sub>. *Cell Death Differ.* 29, 514–526. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00871-3>
- Iaccarino, L., Ottone, T., Divona, M., Cicconi, L., Cairoli, R., Voso, M.T., Lo-Coco, F., 2016. Mutations affecting both the rearranged and the unrearranged *PML* alleles in refractory acute promyelocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 172, 909–913. <https://doi.org/10.1111/bjh.13910>
- Ilik, İ.A., Malszycki, M., Lübke, A.K., Schade, C., Meierhofer, D., Aktaş, T., 2020. SON and SRRM2 are essential for nuclear speckle formation. *eLife* 9, e60579. <https://doi.org/10.7554/eLife.60579>
- Ishov, A.M., Sotnikov, A.G., Negorev, D., Vladimirova, O.V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E.T.H., Strauss, J.F., Maul, G.G., 1999. Pml Is Critical for Nd10 Formation and Recruits the Pml-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by Sumo-1. *J. Cell Biol.* 147, 221–234. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221>
- Islam, K., Wang, Q.Q., Naranmandura, H., 2015. Molecular Mechanisms of Arsenic Toxicity, in: *Advances in Molecular Toxicology*. Elsevier, pp. 77–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802229-0.00002-5>
- Ito, K., Bernardi, R., Morotti, A., Matsuoka, S., Saglio, G., Ikeda, Y., Rosenblatt, J., Avigan, D.E., Teruya-Feldstein, J., Pandolfi, P.P., 2008. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 453, 1072–1078. <https://doi.org/10.1038/nature07016>
- Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., Pandolfi, P.P., 2012. A PML–PPAR- $\delta$  pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* 18, 1350–1358. <https://doi.org/10.1038/nm.2882>

- Ivanschitz, L., De Thé, H., Le Bras, M., 2013. PML, SUMOylation, and Senescence. *Front. Oncol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00171>
- Ivanschitz, L., Takahashi, Y., Jollivet, F., Ayrault, O., Le Bras, M., de Thé, H., 2015. PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 14278–14283. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507540112>
- Jain, S., Wheeler, J.R., Walters, R.W., Agrawal, A., Barsic, A., Parker, R., 2016. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* 164, 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.038>
- Janer, A., Martin, E., Muriel, M.-P., Latouche, M., Fujigasaki, H., Ruberg, M., Brice, A., Trottier, Y., Sittler, A., 2006. PML clastosomes prevent nuclear accumulation of mutant ataxin-7 and other polyglutamine proteins. *J. Cell Biol.* 174, 65–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511045>
- Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., Peres, L., Berthier, C., Soilihi, H., Raught, B., de Thé, H., 2010. PML/RARA Oxidation and Arsenic Binding Initiate the Antileukemia Response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell* 18, 88–98. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.003>
- Jensen, K., Shiels, C., Freemont, P.S., 2001. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20, 7223–7233. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204765>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
- Kaminsky, R., Denison, C., Bening-Abu-Shach, U., Chisholm, A.D., Gygi, S.P., Broday, L., 2009. SUMO Regulates the Assembly and Function of a Cytoplasmic Intermediate Filament Protein in *C. elegans*. *Dev. Cell* 17, 724–735. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.005>
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H.P., Wada, H., Fukuda-Kamitani, T., Yeh, E.T.H., 1998. Identification of Three Major Sentrinization Sites in PML. *J. Biol. Chem.* 273, 26675–26682. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26675>
- Kim, J., Han, K.Y., Khanna, N., Ha, T., Belmont, A.S., 2019. Nuclear speckle fusion via long-range directional motion regulates speckle morphology after transcriptional inhibition. *J. Cell Sci.* jcs.226563. <https://doi.org/10.1242/jcs.226563>
- Kim, M.K., Yang, S., Lee, K.-H., Um, J.-H., Liu, M., Kang, H., Park, S.J., Chung, J.H., 2011. Promyelocytic leukemia inhibits adipogenesis, and loss of promyelocytic leukemia results in fat accumulation in mice. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 301, E1130–E1142. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00092.2011>
- Koken, M.H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M.K., Sobczak-Thépot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., de Thé, H., 1995. The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10, 1315–1324.
- Korb, E., Wilkinson, C.L., Delgado, R.N., Lovero, K.L., Finkbeiner, S., 2013. Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nat. Neurosci.* 16, 874–883. <https://doi.org/10.1038/nn.3429>
- Krieghoff, E., Milovic-Holm, K., Hofmann, T.G., 2007. FLASH Meets Nuclear Bodies: CD95 Receptor Signals via a Nuclear Pathway. *Cell Cycle* 6, 771–775. <https://doi.org/10.4161/cc.6.7.4046>

- Krieghoff-Henning, E., Hofmann, T.G., 2008. Role of nuclear bodies in apoptosis signalling. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1783, 2185–2194.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.002>
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., Lowe, S.W., 2008. Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell* 134, 657–667.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Kumar, R., González-Prieto, R., Xiao, Z., Verlaan-de Vries, M., Vertegaal, A.C.O., 2017. The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nat. Commun.* 8, 1809. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01900-x>
- Kurki, S., Latonen, L., Laiho, M., 2003. Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *J. Cell Sci.* 116, 3917–3925.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.00714>
- Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., 2018. PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011>
- Lallemand-Breitenbach, V., De Thé, H., 2010. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000661–a000661. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000661>
- Lallemand-Breitenbach, V., Guillemain, M.-C., Janin, A., Daniel, M.-T., Degos, L., Kogan, S.C., Michael Bishop, J., de Thé, H., 1999. Retinoic Acid and Arsenic Synergize to Eradicate Leukemic Cells in a Mouse Model of Acute Promyelocytic Leukemia. *J. Exp. Med.* 189, 1043–1052.  
<https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1043>
- Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Benhenda, S., Nasr, R., Lei, M., Peres, L., Zhou, J., Zhu, J., Raught, B., de Thé, H., 2008. Arsenic degrades PML or PML–RAR $\alpha$  through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* 10, 547–555. <https://doi.org/10.1038/ncb1717>
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Dobeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., de Thé, H., 2001. Role of Promyelocytic Leukemia (Pml) Sumolation in Nuclear Body Formation, 11s Proteasome Recruitment, and as2O3-Induced Pml or Pml/Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  Degradation. *J. Exp. Med.* 193, 1361–1372.  
<https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1361>
- Lang, M., Jegou, T., Chung, I., Richter, K., Münch, S., Udvarhelyi, A., Cremer, C., Hemmerich, P., Engelhardt, J., Hell, S.W., Rippe, K., 2010. Three-dimensional organization of promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J. Cell Sci.* 123, 392–400. <https://doi.org/10.1242/jcs.053496>
- Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., Dejean, A., 1995. The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene* 11, 871–876.
- Lee, J., Salsman, J., Foster, J., Dellaire, G., Ridgway, N.D., 2020. Lipid-associated PML structures assemble nuclear lipid droplets containing CCT $\alpha$  and Lipin1. *Life Sci. Alliance* 3, e202000751.  
<https://doi.org/10.26508/lsa.202000751>
- Lehmann-Che, J., Bally, C., de Thé, H., 2014. Resistance to Therapy in Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371, 1170–1172. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1409040>
- Li, H., Leo, C., Zhu, J., Wu, X., O’Neil, J., Park, E.-J., Chen, J.D., 2000. Sequestration and Inhibition of Daxx-Mediated Transcriptional Repression by PML. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1784–1796.  
<https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1784-1796.2000>
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., Russo, P.S., Jiang, Q.-X., Nixon, B.T., Rosen, M.K., 2012. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature* 483, 336–340.  
<https://doi.org/10.1038/nature10879>

- Li, Y., Ma, X., Chen, Zhiming, Wu, H., Wang, P., Wu, W., Cheng, N., Zeng, L., Zhang, H., Cai, X., Chen, S.-J., Chen, Zhu, Meng, G., 2019. B1 oligomerization regulates PML nuclear body biogenesis and leukemogenesis. *Nat. Commun.* 10, 3789. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11746-0>
- Licht, J.D., 2006. Reconstructing a disease: What essential features of the retinoic acid receptor fusion oncoproteins generate acute promyelocytic leukemia? *Cancer Cell* 9, 73–74. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.024>
- Liebschner, D., Afonine, P.V., Baker, M.L., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Croll, T.I., Hintze, B., Hung, L.-W., Jain, S., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R.D., Poon, B.K., Prisant, M.G., Read, R.J., Richardson, J.S., Richardson, D.C., Sammito, M.D., Sobolev, O.V., Stockwell, D.H., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A.G., Videau, L.L., Williams, C.J., Adams, P.D., 2019. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in *Phenix*. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 75, 861–877. <https://doi.org/10.1107/S2059798319011471>
- Lin, Y., Currie, S.L., Rosen, M.K., 2017. Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs. *J. Biol. Chem.* 292, 19110–19120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800466>
- Liu, G., Liu, M., Kim, E.-H., Maaty, W.S., Bothner, B., Lei, B., Rensing, C., Wang, G., McDermott, T.R., 2012. A periplasmic arsenite-binding protein involved in regulating arsenite oxidation: Arsenite-binding protein. *Environ. Microbiol.* 14, 1624–1634. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02672.x>
- Lo-Coco, F., Avvisati, G., Vignetti, M., Thiede, C., Orlando, S.M., Iacobelli, S., Ferrara, F., Fazi, P., Cicconi, L., Di Bona, E., Specchia, G., Sica, S., Divona, M., Levis, A., Fiedler, W., Cerqui, E., Breccia, M., Fioritoni, G., Salih, H.R., Cazzola, M., Melillo, L., Carella, A.M., Brandts, C.H., Morra, E., von Lilienfeld-Toal, M., Hertenstein, B., Wattad, M., Lübbert, M., Hänel, M., Schmitz, N., Link, H., Kropp, M.G., Rambaldi, A., La Nasa, G., Luppi, M., Ciceri, F., Finizio, O., Venditti, A., Fabbiano, F., Döhner, K., Sauer, M., Ganser, A., Amadori, S., Mandelli, F., Döhner, H., Ehninger, G., Schlenk, R.F., Platzbecker, U., 2013. Retinoic Acid and Arsenic Trioxide for Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 369, 111–121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300874>
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R.V., Alsheich, O., Pandolfi, P.P., Haupt, Y., 2003. The Promyelocytic Leukemia Protein Protects p53 from Mdm2-mediated Inhibition and Degradation. *J. Biol. Chem.* 278, 33134–33141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301264200>
- Lu, J., Qian, J., Xu, Z., Yin, S., Zhou, L., Zheng, S., Zhang, W., 2021. Emerging Roles of Liquid–Liquid Phase Separation in Cancer: From Protein Aggregation to Immune-Associated Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 631486. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.631486>
- Luo, Y.-Y., Wu, J.-J., Li, Y.-M., 2021. Regulation of liquid–liquid phase separation with focus on post-translational modifications. *Chem. Commun.* 57, 13275–13287. <https://doi.org/10.1039/D1CC05266G>
- Lyon, A.S., Peoples, W.B., Rosen, M.K., 2021. A framework for understanding the functions of biomolecular condensates across scales. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 215–235. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00303-z>
- Ma, Y., Liu, L., Jin, J., Lou, Y., 2016. All-Trans Retinoic Acid plus Arsenic Trioxide versus All-Trans Retinoic Acid plus Chemotherapy for Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia: A Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11, e0158760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158760>
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A.R.N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., Lopez, R., 2022. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* 50, W276–W279. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>
- Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.-F., Moiseeva, O., Ferbeyre, G., 2004. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* 23, 91–99. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206886>

- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M., 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90199-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90199-x)
- Mann, J.R., Donnelly, C.J., 2021. RNA modulates physiological and neuropathological protein phase transitions. *Neuron* 109, 2663–2681. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.06.023>
- Mao, Y.S., Sunwoo, H., Zhang, B., Spector, D.L., 2011a. Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* 13, 95–101. <https://doi.org/10.1038/ncb2140>
- Mao, Y.S., Zhang, B., Spector, D.L., 2011b. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 27, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.006>
- Marçais, A., Cook, L., Witkover, A., Asnafi, V., Avettand-Fenoel, V., Delarue, R., Cheminant, M., Sibon, D., Frenzel, L., de Thé, H., Bangham, C.R.M., Bazarbachi, A., Hermine, O., Suarez, F., 2020. Arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as a maintenance therapy for adult T cell leukemia/lymphoma. *Retrovirology* 17, 5. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-0513-y>
- Marinello, M., Werner, A., Giannone, M., Tahiri, K., Alves, S., Tesson, C., 2019. SUMOylation by SUMO2 is implicated in the degradation of misfolded ataxin-7 via RNF4 in SCA7 models 16.
- Maroui, M.A., Pampin, M., Chelbi-Alix, M.K., 2011. Promyelocytic Leukemia Isoform IV Confers Resistance to Encephalomyocarditis Virus via the Sequestration of 3D Polymerase in Nuclear Bodies. *J. Virol.* 85, 13164–13173. <https://doi.org/10.1128/JVI.05808-11>
- Martens, J.H.A., Brinkman, A.B., Simmer, F., Francoijs, K.-J., Nebbioso, A., Ferrara, F., Altucci, L., Stunnenberg, H.G., 2010. PML-RAR $\alpha$ /RXR Alters the Epigenetic Landscape in Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Cell* 17, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.042>
- Martín-Martín, N., Piva, M., Urosevic, J., Aldaz, P., Sutherland, J.D., Fernández-Ruiz, S., Arreal, L., Torrano, V., Cortazar, A.R., Planet, E., Guiu, M., Radosevic-Robin, N., Garcia, S., Macías, I., Salvador, F., Domenici, G., Rueda, O.M., Zabala-Letona, A., Arruabarrena-Aristorena, A., Zúñiga-García, P., Caro-Maldonado, A., Valcárcel-Jiménez, L., Sánchez-Mosquera, P., Varela-Rey, M., Martínez-Chantar, M.L., Anguita, J., Ibrahim, Y.H., Scaltriti, M., Lawrie, C.H., Aransay, A.M., Iovanna, J.L., Baselga, J., Caldas, C., Barrio, R., Serra, V., dM Vivanco, M., Matheu, A., Gomis, R.R., Carracedo, A., 2016. Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer. *Nat. Commun.* 7, 12595. <https://doi.org/10.1038/ncomms12595>
- Massiah, A.M., 2019. Zinc-Binding B-Box Domains with RING Folds Serve Critical Roles in the Protein Ubiquitination Pathways in Plants and Animals, in: Summers, M. (Ed.), *Ubiquitin Proteasome System - Current Insights into Mechanism Cellular Regulation and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85895>
- Mathews, V., George, B., Chendamarai, E., Lakshmi, K.M., Desire, S., Balasubramanian, P., Viswabandya, A., Thirugnanam, R., Abraham, A., Shaji, R.V., Srivastava, A., Chandy, M., 2010. Single-Agent Arsenic Trioxide in the Treatment of Newly Diagnosed Acute Promyelocytic Leukemia: Long-Term Follow-Up Data. *J. Clin. Oncol.* 28, 3866–3871. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.5031>
- Mathews, V., George, B., Lakshmi, K.M., Viswabandya, A., Bajel, A., Balasubramanian, P., Shaji, R.V., Srivastava, V.M., Srivastava, A., Chandy, M., 2006. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity. *Blood* 107, 2627–2632. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3532>
- Maul, G.G., Guldner, H.H., Spivack, J.G., 1993. Modification of discrete nuclear domains induced by herpes simplex virus type 1 immediate early gene 1 product (ICP0). *J. Gen. Virol.* 74, 2679–2690. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-12-2679>
- Maul, G.G., Yu, E., Ishov, A.M., Epstein, A.L., 1995. Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *J. Cell. Biochem.* 59, 498–513. <https://doi.org/10.1002/jcb.240590410>

- Maurel, C., Scherer, N.M., Hogan, A., Vidal-Itriago, A., Don, E.K., Radford, R., Chapman, T., Cull, S., Vourc'h, P., Chung, R., Lee, A., Morsch, M., 2022. The post-translational modification SUMO affects TDP-43 phase separation, compartmentalization, and aggregation in a zebrafish model (preprint). *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.14.503569>
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., 2007. *Phaser* crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>
- McPhee, M.J., Salsman, J., Foster, J., Thompson, J., Mathavarajah, S., Delleire, G., Ridgway, N.D., 2022. Running 'LAPS' Around nLD: Nuclear Lipid Droplet Form and Function. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 837406. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.837406>
- Mediani, L., Guillén-Boixet, J., Vinet, J., Franzmann, T.M., Bigi, I., Mateju, D., Carrà, A.D., Morelli, F.F., Tiago, T., Poser, I., Alberti, S., Carra, S., 2019. Defective ribosomal products challenge nuclear function by impairing nuclear condensate dynamics and immobilizing ubiquitin. *EMBO J.* 38. <https://doi.org/10.15252/emj.2018101341>
- Mehta, S., Zhang, J., 2022. Liquid–liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 22, 239–252. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00444-7>
- Melnick, A., Licht, J.D., 1999. Deconstructing a disease: RAR $\alpha$ , its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167–3215.
- Meroni, G., Desagher, S., 2022. Cellular Function of TRIM E3 Ubiquitin Ligases in Health and Disease. *Cells* 11, 250. <https://doi.org/10.3390/cells11020250>
- Miki, T., Xu, Z., Chen-Goodspeed, M., Liu, M., Van Oort-Jansen, A., Rea, M.A., Zhao, Z., Lee, C.C., Chang, K.-S., 2012. PML regulates PER2 nuclear localization and circadian function: PML in circadian clock. *EMBO J.* 31, 1427–1439. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.1>
- Milovic-Holm, K., Kriehoff, E., Jensen, K., Will, H., Hofmann, T.G., 2007. FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J.* 26, 391–401. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601504>
- Missiroli, S., Bonora, M., Patergnani, S., Poletti, F., Perrone, M., Gafà, R., Magri, E., Raimondi, A., Lanza, G., Tacchetti, C., Kroemer, G., Pandolfi, P.P., Pinton, P., Giorgi, C., 2016. PML at Mitochondria-Associated Membranes Is Critical for the Repression of Autophagy and Cancer Development. *Cell Rep.* 16, 2415–2427. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.082>
- Mitrea, D.M., Cika, J.A., Guy, C.S., Ban, D., Banerjee, P.R., Stanley, C.B., Nourse, A., Deniz, A.A., Kriwacki, R.W., 2016. Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA. *eLife* 5, e13571. <https://doi.org/10.7554/eLife.13571>
- Moiseeva, O., Mallette, F.A., Mukhopadhyay, U.K., Moores, A., Ferbeyre, G., 2006. DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged  $\beta$ -Interferon Stimulation. *Mol. Biol. Cell* 17, 1583–1592. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-09-0858>
- Morgan, M., Thorburn, J., Pandolfi, P.P., Thorburn, A., 2002. Nuclear and cytoplasmic shuttling of TRADD induces apoptosis via different mechanisms. *J. Cell Biol.* 157, 975–984. <https://doi.org/10.1083/jcb.200204039>
- Müller, S., Matunis, M.J., Dejean, A., 1998. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* 17, 61–70. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.1.61>
- Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y.F., Goshima, N., Hirose, T., 2012. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles: LncRNA processing for nuclear body architecture. *EMBO J.* 31, 4020–4034. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.251>



- Naranmandura, H., Suzuki, K.T., 2008. Identification of the Major Arsenic-Binding Protein in Rat Plasma As the Ternary Dimethylarsinous–Hemoglobin–Haptoglobin Complex. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 678–685. <https://doi.org/10.1021/tx700383g>
- Nardella, C., Clohessy, J.G., Alimonti, A., Pandolfi, P.P., 2011. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 11, 503–511. <https://doi.org/10.1038/nrc3057>
- Nasr, R., Guillemain, M.-C., Ferhi, O., Soilihi, H., Peres, L., Berthier, C., Rousselot, P., Robledo-Sarmiento, M., Lallemand-Breitenbach, V., Gourmel, B., Vitoux, D., Pandolfi, P.P., Rochette-Egly, C., Zhu, J., de Thé, H., 2008. Eradication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Nat. Med.* 14, 1333–1342. <https://doi.org/10.1038/nm.1891>
- Németh, A., Conesa, A., Santoyo-Lopez, J., Medina, I., Montaner, D., Péterfia, B., Solovei, I., Cremer, T., Dopazo, J., Längst, G., 2010. Initial Genomics of the Human Nucleolus. *PLoS Genet.* 6, e1000889. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000889>
- Nervi, C., Ferrara, F.F., Fanelli, M., Rippo, M.R., Tomassini, B., Ferrucci, P.F., Ruthardt, M., Gelmetti, V., Gambacorti-Passerini, C., Diverio, D., Grignani, F., Pelicci, P.G., Testi, R., 1998. Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* 92, 2244–2251.
- Nisole, S., Fernandez, J., Maarifi, G., Arhel, N.J., 2019. SUMO régule la capacité de TRIM5α à inhiber le VIH-1. *médecine/sciences* 35, 106–109. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019016>
- Nisole, S., Maroui, M.A., Mascle, X.H., Aubry, M., Chelbi-Alix, M.K., 2013. Differential Roles of PML Isoforms. *Front. Oncol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00125>
- Niu, C., Livingston, C.M., Li, L., Beran, R.K., Daffis, S., Ramakrishnan, D., Burdette, D., Peiser, L., Salas, E., Ramos, H., Yu, M., Cheng, G., Strubin, M., Delaney IV, W.E., Fletcher, S.P., 2017. The Smc5/6 Complex Restricts HBV when Localized to ND10 without Inducing an Innate Immune Response and Is Counteracted by the HBV X Protein Shortly after Infection. *PLOS ONE* 12, e0169648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169648>
- Niwa-Kawakita, M., Ferhi, O., Soilihi, H., Le Bras, M., Lallemand-Breitenbach, V., de Thé, H., 2017. PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J. Exp. Med.* jem.20160301. <https://doi.org/10.1084/jem.20160301>
- Nizami, Z., Deryusheva, S., Gall, J.G., 2010. The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000653–a000653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000653>
- Occhionorelli, M., Santoro, F., Pallavicini, I., Gruszka, A., Moretti, S., Bossi, D., Viale, A., Shing, D., Ronzoni, S., Muradore, I., Soncini, M., Pruneri, G., Rafaniello, P., Viale, G., Pelicci, P.G., Minucci, S., 2011. The self-association coiled-coil domain of PML is sufficient for the oncogenic conversion of the retinoic acid receptor (RAR) alpha. *Leukemia* 25, 814–820. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.18>
- Ohsaki, Y., Kawai, T., Yoshikawa, Y., Cheng, J., Jokitalo, E., Fujimoto, T., 2016. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation. *J. Cell Biol.* 212, 29–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.201507122>
- Okazaki, T., Kageji, T., Kuwayama, K., Kitazato, K.T., Mure, H., Hara, K., Morigaki, R., Mizobuchi, Y., Matsuzaki, K., Nagahiro, S., 2012. Up-regulation of endogenous PML induced by a combination of interferon-beta and temozolomide enhances p73/YAP-mediated apoptosis in glioblastoma. *Cancer Lett.* 323, 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.013>
- Ordóñez, E., Thiyagarajan, S., Cook, J.D., Stemmler, T.L., Gil, J.A., Mateos, L.M., Rosen, B.P., 2008. Evolution of Metal(loid) Binding Sites in Transcriptional Regulators. *J. Biol. Chem.* 283, 25706–25714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803209200>
- Osterwald, S., Deeg, K.I., Chung, I., Parisotto, D., Worz, S., Rohr, K., Erfle, H., Rippe, K., 2015. PML induces compaction, TRF2 depletion and DNA damage signaling at telomeres and promotes their alternative lengthening. *J. Cell Sci.* 128, 1887–1900. <https://doi.org/10.1242/jcs.148296>

- Owen, I., Shewmaker, F., 2019. The Role of Post-Translational Modifications in the Phase Transitions of Intrinsically Disordered Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 5501. <https://doi.org/10.3390/ijms20215501>
- Pandolfi, P.P., Alcalay, M., Fagioli, M., Zangrilli, D., Mencarelli, A., Diverio, D., Biondi, A., Lo Coco, F., Rambaldi, A., Grignani, F., 1992. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 11, 1397–1407.
- Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoynov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L.A., Weigert, M., Myers, E.W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A.A., Alberti, S., 2015. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047>
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P.P., Pelicci, P.G., 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207–210. <https://doi.org/10.1038/35018127>
- Pickett, H.A., Reddel, R.R., 2015. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 875–880. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3106>
- Powell, B.L., Moser, B., Stock, W., Gallagher, R.E., Willman, C.L., Stone, R.M., Rowe, J.M., Coutre, S., Feusner, J.H., Gregory, J., Couban, S., Appelbaum, F.R., Tallman, M.S., Larson, R.A., 2010. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 116, 3751–3757. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-269621>
- Privalsky, M.L., 2004. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 315–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032802.155556>
- Quignon, F., Chen, Z., de Thé, H., 1997. Retinoic acid and arsenic: towards oncogene-targeted treatments of acute promyelocytic leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1333, M53–M61. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(97\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(97)00025-5)
- Raelson, J.V., Nervi, C., Rosenauer, A., Benedetti, L., Monczak, Y., Pearson, M., Pelicci, P.G., Miller, W.H., 1996. The PML/RAR alpha oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 88, 2826–2832.
- Rawle, R., Saley, T.C., Kang, Y.-S., Wang, Q., Walk, S., Bothner, B., McDermott, T.R., 2021. Introducing the ArsR-Regulated Arsenic Stimulon. *Front. Microbiol.* 12, 630562. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630562>
- Reddy, B.A., Etkin, L.D., 1991. A unique bipartite cysteine-histidine motif defines a subfamily of potential zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* 19, 6330–6330. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6330>
- Reddy, B.A., Etkin, L.D., Freemont, P.S., 1992. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 344–345. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(92\)90308-V](https://doi.org/10.1016/0968-0004(92)90308-V)
- Regad, T., Bellodi, C., Nicotera, P., Salomoni, P., 2009. The tumor suppressor Pml regulates cell fate in the developing neocortex. *Nat. Neurosci.* 12, 132–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2251>
- Reichelt, M., Wang, L., Sommer, M., Perrino, J., Nour, A.M., Sen, N., Baiker, A., Zerboni, L., Arvin, A.M., 2011. Entrapment of Viral Capsids in Nuclear PML Cages Is an Intrinsic Antiviral Host Defense against Varicella-Zoster Virus. *PLoS Pathog.* 7, e1001266. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001266>
- Reuter, N., Schilling, E.-M., Scherer, M., Müller, R., Stamminger, T., 2017. The ND10 Component Promyelocytic Leukemia Protein Acts as an E3 Ligase for SUMOylation of the Major Immediate Early Protein IE1 of Human Cytomegalovirus. *J. Virol.* 91, e02335-16, [/jvi/91/10/e02335-16.atom](https://doi.org/10.1128/JVI.02335-16). <https://doi.org/10.1128/JVI.02335-16>

- Reymond, A., 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* 20, 2140–2151. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2140>
- Rivera, C., Verbel-Vergara, D., Arancibia, D., Lappala, A., González, M., Guzmán, F., Merello, G., Lee, J.T., Andrés, M.E., 2021. Revealing RCOR2 as a regulatory component of nuclear speckles. *Epigenetics Chromatin* 14, 51. <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00425-4>
- Ryan, C.M., Kindle, K.B., Collins, H.M., Heery, D.M., 2010. SUMOylation regulates the nuclear mobility of CREB binding protein and its association with nuclear bodies in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1136–1141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.040>
- Sahin, U., de Thé, H., Lallemand-Breitenbach, V., 2022. Sumoylation in Physiology, Pathology and Therapy. *Cells* 11, 814. <https://doi.org/10.3390/cells11050814>
- Sahin, U., Ferhi, O., Jeanne, M., Benhenda, S., Berthier, C., Jollivet, F., Niwa-Kawakita, M., Faklaris, O., Setterblad, N., de Thé, H., Lallemand-Breitenbach, V., 2014. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J. Cell Biol.* 204, 931–945. <https://doi.org/10.1083/jcb.201305148>
- Sanchez, J.G., Okreglicka, K., Chandrasekaran, V., Welker, J.M., Sundquist, W.I., Pornillos, O., 2014. The tripartite motif coiled-coil is an elongated antiparallel hairpin dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2494–2499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318962111>
- Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Cai, L.F., Erdjument-Bromage, H., Kaufman, A.J., Singh, B., Teruya-Feldstein, J., Tempst, P., Pandolfi, P.P., 2006. A CK2-Dependent Mechanism for Degradation of the PML Tumor Suppressor. *Cell* 126, 269–283. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.041>
- Schlenk, R.F., Dohner, K., Kneba, M., Gotze, K., Hartmann, F., del Valle, F., Kirchen, H., Koller, E., Fischer, J.T., Bullinger, L., Haddank, M., Spath, D., Groner, S., Krebs, B., Kayser, S., Corbacioglu, A., Anhalt, A., Benner, A., Frohling, S., Dohner, H., for the German-Austrian AML Study Group (AMLSG), 2009. Gene mutations and response to treatment with all-trans retinoic acid in elderly patients with acute myeloid leukemia. Results from the AMLSG Trial AML HD98B. *Haematologica* 94, 54–60. <https://doi.org/10.3324/haematol.13378>
- Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F.F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W.W., Waxman, S., Pelicci, P.G., Lo Coco, F., Avvisati, G., Testy, U., Peschle, C., Gambacorti-Passerini, C., Nervi, C., Miller, W.H., 1998. Arsenic Trioxide as an Inducer of Apoptosis and Loss of PML/RAR $\alpha$  Protein in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 90, 124–133. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.2.124>
- Shay, J.W., 2001. Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 677–685. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.677>
- Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic Binding to Proteins. *Chem. Rev.* 113, 7769–7792. <https://doi.org/10.1021/cr300015c>
- Shen, T.H., Lin, H.-K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., Pandolfi, P.P., 2006. The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol. Cell* 24, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.013>
- Shiels, C., Islam, S.A., Vatcheva, R., Sasieni, P., Sternberg, M.J.E., Freemont, P.S., Sheer, D., 2001. PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 114, 3705–3716. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3705>
- Shin, Y., Brangwynne, C.P., 2017. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* 357, eaaf4382. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4382>
- Short, K.M., Cox, T.C., 2006. Subclassification of the RBCC/TRIM Superfamily Reveals a Novel Motif Necessary for Microtubule Binding. *J. Biol. Chem.* 281, 8970–8980. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512755200>
- Sides, M.D., Block, G.J., Shan, B., Esteves, K.C., Lin, Z., Flemington, E.K., Lasky, J.A., 2011. Arsenic mediated disruption of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies induces ganciclovir

- susceptibility in Epstein–Barr positive epithelial cells. *Virology* 416, 86–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.04.005>
- Simon, J.R., Eghtesadi, S.A., Dzuricky, M., You, L., Chilkoti, A., 2019. Engineered Ribonucleoprotein Granules Inhibit Translation in Protocells. *Mol. Cell* 75, 66-75.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.010>
- Souquere, S., Beauclair, G., Harper, F., Fox, A., Pierron, G., 2010. Highly Ordered Spatial Organization of the Structural Long Noncoding NEAT1 RNAs within Paraspeckle Nuclear Bodies. *Mol. Biol. Cell* 21, 4020–4027. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0690>
- Spector, D.L., Lamond, A.I., 2011. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000646–a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>
- Sprague, B.L., Pego, R.L., Stavreva, D.A., McNally, J.G., 2004. Analysis of Binding Reactions by Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biophys. J.* 86, 3473–3495.  
<https://doi.org/10.1529/biophysj.103.026765>
- Stadler, M., Chelbi-Alix, M.K., Koken, M.H., Venturini, L., Lee, C., Saïb, A., Quignon, F., Pelicano, L., Guillemain, M.C., Schindler, C., 1995. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* 11, 2565–2573.
- Stehmeier, P., Muller, S., 2009. Phospho-Regulated SUMO Interaction Modules Connect the SUMO System to CK2 Signaling. *Mol. Cell* 33, 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.013>
- Sternsdorf, T., Phan, V.T., Maunakea, M.L., Ocampo, C.B., Sohal, J., Silletto, A., Galimi, F., Le Beau, M.M., Evans, R.M., Kogan, S.C., 2006. Forced retinoic acid receptor  $\alpha$  homodimers prime mice for APL-like leukemia. *Cancer Cell* 9, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.12.030>
- Stochaj, U., Weber, S.C., 2020. Nucleolar Organization and Functions in Health and Disease. *Cells* 9, 526. <https://doi.org/10.3390/cells9030526>
- Sun HDML, Hu XC, Zhang TD., 1992. Ai-Lin I treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *J Integrat Chin West Med.*
- Takahashi, J., Fujigasaki, H., Iwabuchi, K., Bruni, A.C., Uchihara, T., El Hachimi, K.H., Stevanin, G., Dürr, A., Lebre, A.-S., Trottier, Y., de Thé, H., Tanaka, J., Hauw, J.-J., Duyckaerts, C., Brice, A., 2003. PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiol. Dis.* 13, 230–237. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00080-9)
- Tallman, M.S., Nabhan, C., Feusner, J.H., Rowe, J.M., 2002. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 99, 759–767. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.3.759>
- Tatham, M.H., Geoffroy, M.-C., Shen, L., Plechanovova, A., Hattersley, N., Jaffray, E.G., Palvimo, J.J., Hay, R.T., 2008. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.* 10, 538–546. <https://doi.org/10.1038/ncb1716>
- Tessier, S., Ferhi, O., Geoffroy, M.-C., González-Prieto, R., Canat, A., Quentin, S., Pla, M., Niwa-Kawakita, M., Bercier, P., Rérolle, D., Therizols, P., Fabre, E., Vertegaal, A.C.O., de Thé, H., Lallemand-Breitenbach, V., 2022. Exploration of nuclear body-enhanced sumoylation reveals that PML represses 2-cell features of embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 13, 5726. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33147-6>
- Thomas, J.M.H., Keegan, R.M., Rigden, D.J., Davies, O.R., 2020. Extending the scope of coiled-coil crystal structure solution by *AMPLE* through improved *ab initio* modelling. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 76, 272–284. <https://doi.org/10.1107/S2059798320000443>
- Tong, X., Tang, R., Xu, J., Wang, W., Zhao, Y., Yu, X., Shi, S., 2022. Liquid–liquid phase separation in tumor biology. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 221. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01076-x>
- Torka, P., Al Ustwani, O., Wetzler, M., Wang, E.S., Griffiths, E.A., 2016. Swallowing a bitter pill—oral arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *Blood Rev.* 30, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2015.11.004>

- Tournier, C., 2000. Requirement of JNK for Stress- Induced Activation of the Cytochrome c-Mediated Death Pathway. *Science* 288, 870–874. <https://doi.org/10.1126/science.288.5467.870>
- Tripathi, V., Song, D.Y., Zong, X., Shevtsov, S.P., Hearn, S., Fu, X.-D., Dundr, M., Prasanth, K.V., 2012. SRSF1 regulates the assembly of pre-mRNA processing factors in nuclear speckles. *Mol. Biol. Cell* 23, 3694–3706. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-03-0206>
- Tsimberidou, A.-M., Tirado-Gomez, M., Andreeff, M., O'Brien, S., Kantarjian, H., Keating, M., Lopez-Berestein, G., Estey, E., 2006. Single-agent liposomal all-trans retinoic acid can cure some patients with untreated acute promyelocytic leukemia: an update of The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Series. *Leuk. Lymphoma* 47, 1062–1068. <https://doi.org/10.1080/10428190500463932>
- Uggè, M., Simoni, M., Fracassi, C., Bernardi, R., 2022. PML isoforms: a molecular basis for PML pleiotropic functions. *Trends Biochem. Sci.* 47, 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.02.002>
- Uversky, V.N., 2017. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 44, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.015>
- Valentin G, 1836. *Repertorium für Anatomie und Physiologie*. Verl. Von Veit Comp 1–293.
- Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T.H., Van Ostade, X., 2010. A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int. J. Biol. Sci.* 51–67. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.51>
- van Tol, S., Hage, A., Giraldo, M.I., Bharaj, P., Rajsbaum, R., 2017. The TRIMendous Role of TRIMs in Virus-Host Interactions. *Vaccines* 5. <https://doi.org/10.3390/vaccines5030023>
- Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M.-F., Moiseeva, O., Begin, V., Saad, F., Mes-Masson, A.-M., Ferbeyre, G., 2011. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* 25, 41–50. <https://doi.org/10.1101/gad.1975111>
- Vertegaal, A.C.O., Andersen, J.S., Ogg, S.C., Hay, R.T., Mann, M., Lamond, A.I., 2006. Distinct and Overlapping Sets of SUMO-1 and SUMO-2 Target Proteins Revealed by Quantitative Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 2298–2310. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600212-MCP200>
- Voisset, E., Moravcsik, E., Stratford, E.W., Jaye, A., Palgrave, C.J., Hills, R.K., Salomoni, P., Kogan, S.C., Solomon, E., Grimwade, D., 2018. Pml nuclear body disruption cooperates in APL pathogenesis and impairs DNA damage repair pathways in mice. *Blood* 131, 636–648. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-794784>
- Wagner, J.M., Roganowicz, M.D., Skorupka, K., Alam, S.L., Christensen, D., Doss, G., Wan, Y., Frank, G.A., Ganser-Pornillos, B.K., Sundquist, W.I., Pornillos, O., 2016. Mechanism of B-box 2 domain-mediated higher-order assembly of the retroviral restriction factor TRIM5 $\alpha$ . *eLife* 5, e16309. <https://doi.org/10.7554/eLife.16309>
- Wagner, Rudolph, 1835. Einige Bemerkungen und Fragen über die Keimbläschen (vesicula germinativa). *Müller's Arch. Anat Physiol Wiss. Med* 373–377.
- Wan, J., Block, S., Scribano, C.M., Thiry, R., Esbona, K., Audhya, A., Weaver, B.A., 2019. Mad1 destabilizes p53 by preventing PML from sequestering MDM2. *Nat. Commun.* 10, 1540. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09471-9>
- Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P.J., Islam, S.A., Freemont, P.S., Sheer, D., 2004. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J. Cell Biol.* 164, 515–526. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305142>
- Wang, P., Benhenda, S., Wu, H., Lallemand-Breitenbach, V., Zhen, T., Jollivet, F., Peres, L., Li, Y., Chen, S.-J., Chen, Z., de Thé, H., Meng, G., 2018. RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03498-0>

- Wang, Q.Q., Zhou, X.Y., Zhang, Y.F., Bu, N., Zhou, J., Cao, F.L., Naranmandura, H., 2015. Methylated arsenic metabolites bind to PML protein but do not induce cellular differentiation and PML-RAR $\alpha$ ; protein degradation. *Oncotarget* 6. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4662>
- Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F., Pandolfi, P.P., 1998. Role of PML in Cell Growth and the Retinoic Acid Pathway. *Sci. New Ser.* 279, 1547–1551.
- Wang, Z.-Y., Chen, Z., 2008. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 111, 2505–2515. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102798>
- Warrell, R.P., de The, H., Wang, Z.-Y., Degos, L., 1993. Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 329, 177–189. <https://doi.org/10.1056/NEJM199307153290307>
- Weber, S.C., Brangwynne, C.P., 2015. Inverse Size Scaling of the Nucleolus by a Concentration-Dependent Phase Transition. *Curr. Biol.* 25, 641–646. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.012>
- Weerapana, E., Wang, C., Simon, G.M., Richter, F., Khare, S., Dillon, M.B.D., Bachovchin, D.A., Mowen, K., Baker, D., Cravatt, B.F., 2010. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790–795. <https://doi.org/10.1038/nature09472>
- Wei, X., Yu, Z.K., Ramalingam, A., Grossman, S.R., Yu, J.H., Bloch, D.B., Maki, C.G., 2003. Physical and Functional Interactions between PML and MDM2. *J. Biol. Chem.* 278, 29288–29297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212215200>
- Weidtkamp-Peters, S., Lenser, T., Negorev, D., Gerstner, N., Hofmann, T.G., Schwanitz, G., Hoischen, C., Maul, G., Dittrich, P., Hemmerich, P., 2008. Dynamics of component exchange at PML nuclear bodies. *J. Cell Sci.* 121, 2731–2743. <https://doi.org/10.1242/jcs.031922>
- West, J.A., Mito, M., Kurosaka, S., Takumi, T., Tanegashima, C., Chujo, T., Yanaka, K., Kingston, R.E., Hirose, T., Bond, C., Fox, A., Nakagawa, S., 2016. Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization. *J. Cell Biol.* 214, 817–830. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601071>
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., Wilson, K.S., 2011. Overview of the CCP 4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
- Wu, G., Lee, W.-H., Chen, P.-L., 2000. NBS1 and TRF1 Colocalize at Promyelocytic Leukemia Bodies during Late S/G<sub>2</sub> Phases in Immortalized Telomerase-negative Cells: IMPLICATION OF NBS1 IN ALTERNATIVE LENGTHENING OF TELOMERES. *J. Biol. Chem.* 275, 30618–30622. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000390200>
- Wu, H.-C., Rérolle, D., Berthier, C., Hleihel, R., Sakamoto, T., Quentin, S., Benhenda, S., Morganti, C., Wu, C., Conte, L., Rimsky, S., Sebert, M., Clappier, E., Souquere, S., Gachet, S., Soulier, J., Durand, S., Trowbridge, J.J., Bénit, P., Rustin, P., El Hajj, H., Raffoux, E., Ades, L., Itzykson, R., Dombret, H., Fenaux, P., Espeli, O., Kroemer, G., Brunetti, L., Mak, T.W., Lallemand-Breitenbach, V., Bazarbachi, A., Falini, B., Ito, K., Martelli, M.P., de Thé, H., 2021. Actinomycin D Targets NPM1c-Primed Mitochondria to Restore PML-Driven Senescence in AML Therapy. *Cancer Discov.* 11, 3198–3213. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0177>
- Yang, S., Kuo, C., Bisi, J.E., Kim, M.K., 2002. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat. Cell Biol.* 4, 865–870. <https://doi.org/10.1038/ncb869>
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y., Baltimore, D., 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 1067–1076. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80294-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80294-9)
- Yao, R.-W., Xu, G., Wang, Ying, Shan, L., Luan, P.-F., Wang, Yang, Wu, M., Yang, L.-Z., Xing, Y.-H., Yang, L., Chen, L.-L., 2019. Nascent Pre-rRNA Sorting via Phase Separation Drives the Assembly of Dense

- Fibrillar Components in the Human Nucleolus. *Mol. Cell* 76, 767-783.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.014>
- Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R., Reddel, R.R., 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* 59, 4175–4179.
- Yeung, P.L., Denissova, N.G., Nasello, C., Hakhverdyan, Z., Chen, J.D., Brenneman, M.A., 2012. Promyelocytic leukemia nuclear bodies support a late step in DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J. Cell. Biochem.* 113, 1787–1799. <https://doi.org/10.1002/jcb.24050>
- Zhang, H., Yang, L., Ling, J., Czajkowsky, D.M., Wang, J.-F., Zhang, X.-W., Zhou, Y.-M., Ge, F., Yang, M., Xiong, Q., Guo, S.-J., Le, H.-Y., Wu, S.-F., Yan, W., Liu, B., Zhu, H., Chen, Z., Tao, S., 2015. Systematic identification of arsenic-binding proteins reveals that hexokinase-2 is inhibited by arsenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15084–15089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521316112>
- Zhang, J.-M., Yadav, T., Ouyang, J., Lan, L., Zou, L., 2019. Alternative Lengthening of Telomeres through Two Distinct Break-Induced Replication Pathways. *Cell Rep.* 26, 955-968.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.102>
- Zhang, M., Serna-Salas, S., Damba, T., Borghesan, M., Demaria, M., Moshage, H., 2021. Hepatic stellate cell senescence in liver fibrosis: Characteristics, mechanisms and perspectives. *Mech. Ageing Dev.* 199, 111572. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111572>
- Zhang, P., 2017. On arsenic trioxide in the clinical treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leuk. Res. Rep.* 7, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.lrr.2017.03.001>
- Zhang, P. et al., 1996. Treatment of 72 cases of acute promyelocytic leukemia with intravenous arsenic trioxide. *Chin J Hematol* 17, 58–62.
- Zhang, S., Hinde, E., Parkyn Schneider, M., Jans, D.A., Bogoyevitch, M.A., 2020. Nuclear bodies formed by polyQ-ataxin-1 protein are liquid RNA/protein droplets with tunable dynamics. *Sci. Rep.* 10, 1557. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57994-9>
- Zhang T D, Rong F X., 1979. Treatment of acute granulocytic leukemia by Ailin No.1 and dialectic theory (in Chinese). *Med Pharm Heilongjiang* 4, 7–11.
- Zhang, X.W., Yan, X.J., Zhou, Z.R., Yang, F.F., Wu, Z.Y., Sun, H.B., Liang, W.X., Song, A.X., Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Zhang, Q.Y., Yang, H.Y., Huang, Q.H., Zhou, G.B., Tong, J.H., Zhang, Y., Wu, J.H., Hu, H.Y., de Thé, H., Chen, S.J., Chen, Z., 2010. Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RAR Oncoprotein by Directly Binding PML. *Science* 328, 240–243. <https://doi.org/10.1126/science.1183424>
- Zheng, P.-Z., Wang, K.-K., Zhang, Q.-Y., Huang, Q.-H., Du, Y.-Z., Zhang, Q.-H., Xiao, D.-K., Shen, S.-H., Imbeaud, S., Eveno, E., Zhao, C.-J., Chen, Y.-L., Fan, H.-Y., Waxman, S., Auffray, C., Jin, G., Chen, S.-J., Chen, Z., Zhang, J., 2005. Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7653–7658. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502825102>
- Zhong, S., Müller, S., Ronchetti, S., Freemont, P.S., Dejean, A., Pandolfi, P.P., 2000. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 95, 2748–2752.
- Zhou, J., Pérès, L., Honoré, N., Nasr, R., Zhu, J., de Thé, H., 2006. Dimerization-induced corepressor binding and relaxed DNA-binding specificity are critical for PML/RARA-induced immortalization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9238–9243. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603324103>
- Zhou, W., Cheng, L., Shi, Y., Ke, S.Q., Huang, Z., Fang, X., Chu, C., Xie, Q., Bian, X., Rich, J.N., Bao, S., 2015. Arsenic trioxide disrupts glioma stem cells via promoting PML degradation to inhibit tumor growth. *Oncotarget* 6, 37300–37315. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5836>

- Zhu, H., Wu, L., Maki, C.G., 2003. MDM2 and Promyelocytic Leukemia Antagonize Each Other through Their Direct Interaction with p53. *J. Biol. Chem.* 278, 49286–49292. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308302200>
- Zhu, H.-H., Hu, J., Lo-Coco, F., Jin, J., 2019. The simpler, the better: oral arsenic for acute promyelocytic leukemia. *Blood* 134, 597–605. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000760>
- Zhu, H.-H., Qin, Y.-Z., Huang, X.-J., 2014. Resistance to Arsenic Therapy in Acute Promyelocytic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 370, 1864–1866. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1316382>
- Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., de Thé, H., 1999. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14807–14812. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.14807>
- Zhu, J., Koken, M.H.M., Quignon, F., Chelbi-Alix, M.K., Degos, L., Wang, Z.Y., Chen, Z., de Thé, H., 1997. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: Implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3978–3983. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3978>
- Zhu, J., Zhou, J., Peres, L., Riaucoux, F., Honoré, N., Kogan, S., de Thé, H., 2005. A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation. *Cancer Cell* 7, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.01.005>
- Zhu, L., Richardson, T.M., Wacheul, L., Wei, M.-T., Feric, M., Whitney, G., Lafontaine, D.L.J., Brangwynne, C.P., 2019. Controlling the material properties and rRNA processing function of the nucleolus using light. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 17330–17335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903870116>



# Annexes

Annexe 1: Arsenic ties PML B2-box trimer to switch Nuclear Body assembly dynamics and trigger anti-leukemia response: Key resource table

<b>Product name</b>	<b>Supplier</b>	<b>Reference</b>	<b>Final concentration</b>
<i>DMEM, high glucose, pyruvate</i>	Thermo Fisher	41966052	x
<i>5-fluorouracil</i>	Sigma-Aldrich	F6627	x
<i>Anti-Actine antibody</i>	Sigma-Aldrich	A2066	x
<i>Agel-HF</i>	NEB	R3552	x
<i>Anti-evaporation oil</i>	IBIDI	50051	
<i>Anti-FLAG antibody</i>	Sigma-Aldrich	F1804	
<i>Antimony(III) oxide</i>	Sigma-Aldrich	637173-100G	1µM
<i>Anti-mouse-HRP</i>	Jackson ImmunoResearch	115-035-062	x
<i>Anti-rabbit-HRP</i>	Jackson ImmunoResearch	111-035-045	x
<i>Anti-SUMO2/3</i>	Cell Signaling Technologies	4971P	x
<i>Arsenic trioxide</i>	Sigma-Aldrich	1969	1-10µM
<i>AvrII</i>	NEB	R0174	x
<i>BioTrace nitrocellulose membranes</i>	BioTrace Pall Laboratory	732-3031	x
<i>Bromophenol blue</i>	Sigma-Aldrich	B0126	x
<i>Cacodylic acid (dimethyl-arsenic)</i>	Sigma-Aldrich	C0125	2µM
<i>DAPI</i>	Thermo Fisher	62248	1µg/mL
<i>Effectene</i>	Qiagen	301425	x
<i>Fluoromount-G</i>	SouthernBiotech	0100-20	
<i>Foetal bovine serum</i>	Eurobio	CVFSVF00-01	10% v/v
<i>Formalin</i>	Sigma-Aldrich	HT501128	x
<i>Anti-GFP (Green Fluorescent Protein)</i>	Roche	1,181E+10	x
<i>Glass-bottom culture dishes</i>	IBIDI	81156	x
<i>Glycerol</i>	Sigma-Aldrich	G5516	x
<i>Goat anti-mouse Alexa Fluor 488</i>	Jackson ImmunoResearch	115-545-003	x
<i>Goat anti-mouse rhodamine red-X</i>	Jackson ImmunoResearch	115-295-003	x
<i>Goat anti-mouse STAR RED</i>	Abberior	STRED-1001	x
<i>Anti-HA antibody</i>	Covance	MMS-101R- 1000	x
<i>HBSS</i>	Thermo Fisher	<a href="#">14025092</a>	x
<i>Hydrogen peroxide</i>	Sigma-Aldrich	516813	500µM
<i>Interleukin 3</i>	Stemcell	78042	x
<i>Interleukin 6</i>	Stemcell	78052	x
<i>Laemmli buffer</i>	Sigma-Aldrich	S3401	x
<i>L-Glutamine (200 mM)</i>	Thermo Fisher	25030081	2mM
<i>Methylarsonic acid</i>	Greyhouse	N-12922	2µM
<i>N-ethyl-maleimide</i>	Sigma-Aldrich	E3876	10µM / 20mM
<i>NuPAGE 4-12% BT gels</i>	Thermo Fisher	NP0336	x
<i>NuPAGE MOPS SDS running buffer</i>	Thermo Fisher	NP0001	x
<i>Penicilin / Streptomycin</i>	ThermoFisher	15140122	100U/mL

<i>Anti-PML antibody</i>	Merck Millipore	MAB3738	x
<i>Polybrene</i>	Sigma-Aldrich	TR-1003	1µg/mL
<i>Puromycin</i>	Sigma-Aldrich	P8833	2µg/mL
<i>Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	NEB	E0554S	x
<i>ReAsH</i>	Thermofisher	T34562	2µM
<i>RPMI medium</i>	Thermo Fisher	12633012	x
<i>SCF</i>	Stemcell	78064	x
<i>SDS</i>	Sigma-Aldrich	L4509	x
<i>SfiI</i>	NEB	R0123	x
<i>Stemspan</i>	Stemcell	9600	x
<i>SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate</i>	Thermo Fisher	34076	x
<i>SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate</i>	Thermo Fisher	34096	x
<i>T4 DNA ligase</i>	NEB	M0202	x
<i>TCEP</i>	Thermo Fisher	77720	50mM
<i>Triton X-100</i>	Sigma-Aldrich	T9284	x
<i>Trizma</i>	Sigma-Aldrich	93362	x

Table 4: List of the reagents used in this study

<b>Machine name</b>	<b>Supplier</b>
<b>Fusion FX</b>	Vilber
<b>LSM 980</b>	Carl Zeiss Micro-Imaging
<b>Axio Observer 7</b>	Carl Zeiss Micro-Imaging
<b>Nikon Eclipse Ti</b>	Nikon

Table 5: List of the machines used in this study

Construction	Amorce F	Amorce R
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-HIS<sub>6</sub>-HA-</b> <b>PMLIII<sup>C213A</sup></b>	GCC GCT GTG CGC CTC GTG CGC GC	TTG GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-HIS<sub>6</sub>-HA-</b> <b>PMLIII<sup>C389S</sup></b>	CCT CAG CTC TTC CAT CAC CCA GG	TCC TGC AGG CGC ACC TTG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>I202A</sup></b>	GCT GAC CAG CGC CTA CTG CCG AGG	GTA GGG GTG CGG TGG TTG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C189S</sup></b>	CAA CAT CTT CTC CTC CAA CCC CAA CC	TTG GTC TTG CGG GTG CCG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C212S</sup></b>	CAA GCC GCT GTC CTG CTC GTG CG	GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG CTG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C213S</sup></b>	GCC GCT GTG CTC CTC GTG CGC GC	TTG GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG CTG GTC
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C213V</sup></b>	GCC GCT GTG CGT CTC GTG CGC GC	TTG GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C213L</sup></b>	GCC GCT GTG CCT CTC GTG CGC GC	TTG GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C213F</sup></b>	GCC GCT GTG CTT CTC GTG CGC GC	TTG GAA CAT CCT CGG CAG TAG ATG CTG G
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C215S</sup></b>	GTG CTG CTC GTC CGC GCT CCT TG	AGC GGC TTG GAA CAT CCT CG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>A216G</sup></b>	CTG CTC GTG CGG GCT CCT TGA CA	CAC AGC GGC TTG GAA CAT CC
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>A216V</sup></b>	CTG CTC GTG CGT GCT CCT TGA CA	CAC AGC GGC TTG GAA CAT CC
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>L217G</sup></b>	CTC GTG CGC GGG CCT TGA CAG CAG	CAG CAC AGC GGC TTG GAA
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>L218G</sup></b>	GTG CGC GCT CGG TGA CAG CAG CC	GAG CAG CAC AGC GGC TTG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>L218F</sup></b>	GTG CGC GCT CTT TGA CAG CAG CC	GAG CAG CAC AGC GGC TTG
<b>pMSCV<sub>puro</sub>-GFP-</b> <b>PMLIII<sup>C389S</sup></b>	CCT CAG CTC TTC CAT CAC CCA GG	TCC TGC AGG CGC ACC TTG

Table 6: List of the primers used for site-directed mutagenesis

<b>Data Set</b>	<b>MBP-B2</b>	<b>MBP-B2 C213A-A216V</b>
<i>Space group</i>	<i>H3</i>	<i>H32</i>
<i>a, b, c (Å)</i>	122.6, 122.6, 163.2	121.6, 121.6, 161.3
<i>a, b, g (°)</i>	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
<i>Resolution (Å)</i>	50.0 - 2.1 (2.18 - 2.10)	35.0 - 2.6 (2.69 - 2.60)
<i>R<sub>sym</sub></i>	0.072 (0.84)	0.184 (1.581)
<i>R<sub>pim</sub></i>	0.03 (0.357)	0.092 (0.775)
<i>I/s(I)</i>	33.9 (1.9)	7.24 (1.13)
<i>CC<sup>1/2</sup></i>	0.997 (0.74)	0.988 (0.393)
<i>Completeness (%)</i>	99.8 (100.0)	99.6 (99.79)
<i>Redundancy</i>	6.6 (6.4)	5.0 (5.1)
<i>Refinement</i>		
<i>Resolution (Å)</i>	35.4 - 2.1	35.0 - 2.6
<i>No. of reflections</i>	53,556	14,29
<i>R<sub>work</sub>/R<sub>free</sub> (%)</i>	18.6/23.34	20.16/24.61
<i>Protein atoms</i>	6,388	3184
<i>Metal atoms</i>	4	2
<i>Cofactor atoms</i>	46	25
<i>B factors (Å<sup>2</sup>)</i>	50.7	52.3
<i>protein</i>	50.9	52.4
<i>ligands</i>	38.4	46.4
<i>Rmsd bond lengths (Å)</i>	0.008	0.009
<i>Rmsd bond angles (°)</i>	0.95	1.02
<i>Ramachandran outliers (%)</i> :	0	0
<i>Ramachandran favored (%)</i> :	97.7	96.3

Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

Table 7: Data collection and refinement statistics

## Annexe 2 : Etude du rôle de la boîte B2 de PML in vivo

# INTRODUCTION

Dans nos travaux présentés dans les résultats principaux, nous avons élucidé la structure tridimensionnelle de la boîte B2 de PML et identifié son rôle dans la dynamique d'assemblage des CNP. Nous avons aussi identifié le site de liaison de l'arsenic au sein de la boîte B2 de PML et montré son rôle dans la perte de l'auto-renouvellement de cellules hématopoïétiques transformées par PML-RAR $\alpha$  induite par l'arsenic.

Nous nous sommes également intéressés au rôle de la boîte B2 dans la réponse au stress oxydant *in vivo*. Pour cela, nous avons tiré parti des modèles de souris knock-in pour PML générées par la technologie CRISPR-Cas9 avant mon arrivée au laboratoire. Nous disposons de sept lignées de souris :

- Une lignée *Pml*<sup>WT</sup>.
- Une lignée *Pml*<sup>KO</sup>.
- Une lignée *Pml*<sup>E167R</sup> mutée sur le site consensus de SUMOylation de la lysine mK160 sur laquelle se forment les chaînes poly-SUMO.
- Une lignée *Pml*<sup>A220V</sup> portant la mutation majoritairement retrouvée chez les patients APL résistants à la thérapie par l'arsenic, localisée sur l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML. L'A220 est l'équivalent murin de l'A216 humaine.
- Une lignée *Pml*<sup>NLS-K/A</sup> mutée sur le site de localisation nucléaire de PML, induisant la formation de corps cytoplasmiques.
- Une lignée *Pml*<sup>ANES</sup> mutée sur le site d'export nucléaire de PML, bloquant la protéine PML au noyau.
- Une lignée *Pml*<sup>iso1KO</sup> où l'isoforme majoritaire de PML a été déléetée.

Pour chaque modèle, nous nous sommes intéressés à caractériser les défauts d'assemblage des CNP dans différents organes dont le foie puis à étudier leur effet de perte ou de gain de fonction sur la réponse physiopathologique à des inducteurs de stress oxydants et à l'arsenic. Pour des raisons de cohérence, nous ne présenterons ici que les résultats obtenus pour les mutants *Pml*<sup>KO</sup> et *Pml*<sup>A220V</sup> complémentaires de ceux présentés dans les résultats principaux.



# RESULTATS

## *La mutation Pml<sup>A220V</sup> induit une désorganisation de la formation des CNP et perturbe les effets des oxydants et de l'arsenic sur leur formation*

La première partie de cette étude a consisté à caractériser l'effet de la mutation *Pml<sup>A220V</sup>* sur la formation des CNP dans les conditions basales. Les expériences d'immunofluorescence réalisées chez les souris *Pml<sup>WT</sup>* sur des coupes de foies ou sur des MEF primaires indiquent que les noyaux de ces cellules présentent entre 10 et 30 CNP (Figure 31.A, 31.C.). La fraction diffuse correspondant à la protéine PML non associée aux CNP est visualisable dans le modèle de MEF primaires (Figure 31.C.). Comme attendu, la mutation *Pml<sup>A220V</sup>* induit un défaut d'assemblage des CNP. Dans les hépatocytes, reconnaissables par leurs noyaux volumineux sur les coupes de foies, ou dans les MEF primaires, cette mutation abolit la formation des CNP. PML est alors détectée uniquement sous une forme nucléaire diffuse. Ce mutant ne peut former des corps nucléaires que dans des cellules hépatiques à petit noyaux (Figure 31.A.) qui pourraient être des cellules endothéliales ou des cellules immunitaires.

La mutation *Pml<sup>A220V</sup>* induit également une perte de la SUMOylation basale de PML, sans affecter la stabilité de la protéine (Figure 31.B.). Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études où la désorganisation des CNP en réponse à des mutations du RING ou de la boîte B1 de PML induisent une perte de la SUMOylation basale et nos résultats principaux (Li et al., 2019; Wang et al., 2018). Le défaut d'assemblage des CNP est associé à une perte du recrutement des protéines partenaires aux corps, retrouvés sous forme diffuse dans le nucléoplasme (Figure 31.C.).

La substitution d'une alanine par une valine sur l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML est la plus fréquemment retrouvée chez les patients APL résistants à la thérapie par l'arsenic (de Thé et al., 2017). Nous avons donc étudié la réponse de ce mutant à l'arsenic et aux oxydants *in vivo*.

Le traitement à l'arsenic induit la formation de CNP plus volumineux dans les noyaux des cellules hépatiques des souris *Pml<sup>WT</sup>* (Figure 31.D.). La formation de quelques CNP de petite taille

est observable dans les noyaux des cellules hépatiques des souris *Pml<sup>A220V</sup>* en réponse à 30 minutes de traitement à l'ATO. Les animaux portant cette mutation conservent donc une sensibilité résiduelle à cette drogue, comme précédemment observé *in cellulo* dans les résultats principaux.

Le traitement avec des oxydants classiques comme l'acétaminophène (APAP), induisent la formation de CNP chez les souris *Pml<sup>WT</sup>* avec un effet plus faible que l'arsenic (Figure 31.E.). Des résultats similaires ont été observés en réponse à des temps courts de traitement avec d'autres inducteurs de stress oxydant (non montrés). Aucune induction de la formation des CNP n'est observée chez le mutant *Pml<sup>A220V</sup>*.

L'arsenic ou les oxydants comme l'acétaminophène induisent la formation des CNP et l'hyper-SUMOylation dans des cellules exprimant *Pml<sup>WT</sup>* (Figure 31.F-G). L'incapacité du mutant *Pml<sup>A220V</sup>* à former des CNP en réponse à l'arsenic et aux oxydants est associée à une perte de l'hyper-SUMOylation induite par ces molécules. Ces observations confirment *in vivo* que des mutations de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML altèrent la formation des CNP dans les conditions basales et la réponse à l'arsenic. L'insensibilité du mutant *Pml<sup>A220V</sup>* à l'APAP suggère quant à elle un rôle de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 dans l'assemblage de PML en réponse au stress oxydant *in vivo*.

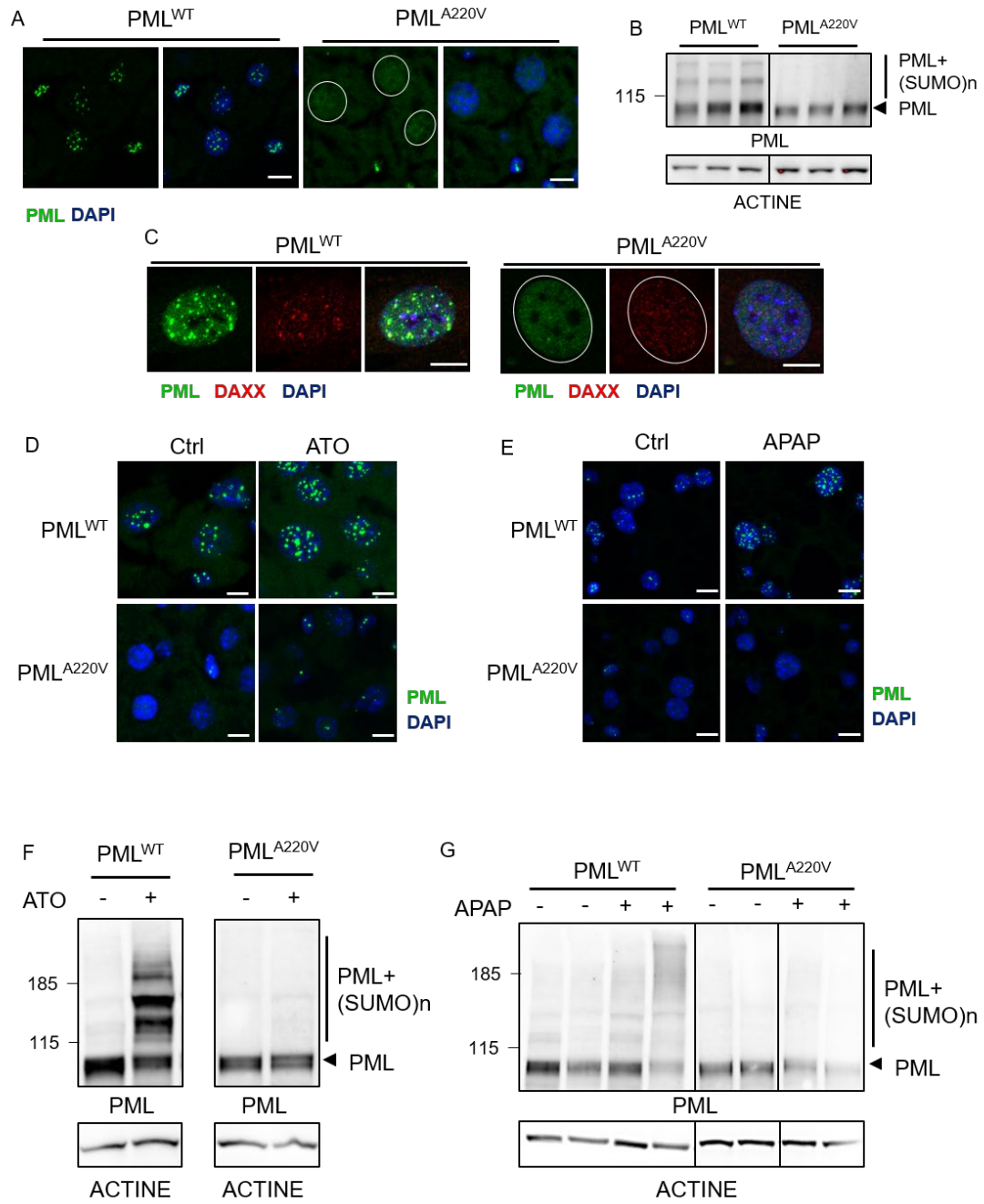


Figure 31 : Caractérisation des défauts d'assemblage et de SUMOylation du mutant  $Pml^{A220V}$  dans les conditions basales et en réponse aux oxydants

- A. Défaut d'assemblage des CNP avec la mutation  $Pml^{A220V}$  dans des coupes de foies de souris analysées par microscopie confocale. Les cercles blancs indiquent les bordures des noyaux des cellules  $Pml^{A220V}$ . Barre d'échelle :  $5\mu m$ .
- B. Analyse des défauts de SUMOylation basale du mutant  $Pml^{A220V}$  par Western blot.
- C. Modifications de la distribution de DAXX, partenaire de PML aux CNP dans des MEF primaires portant la mutation  $Pml^{A220V}$ . Les cercles blancs indiquent les bordures des noyaux des cellules  $Pml^{A220V}$ . Barre d'échelle :  $5\mu m$ .
- D. Défaut d'assemblage des CNP avec la mutation  $Pml^{A220V}$  en réponse à un traitement de 30 minutes à l'ATO observé sur des coupes de foie. Barre d'échelle :  $5\mu m$ .
- E. Défaut d'assemblage des CNP avec la mutation  $Pml^{A220V}$  en réponse à un traitement de 2h à l'acétaminophène observé sur des coupes de foie. Barre d'échelle :  $5\mu m$ .
- F. Le mutant  $Pml^{A220V}$  est insensible à un traitement de 30min à l'ATO, révélé par WB sur des échantillons de foie.
- G. Le mutant  $Pml^{A220V}$  est insensible à un traitement de 6h à l'APAP, révélé par WB sur des échantillons de foie.

### *L'abolition de la formation des CNP en réponse à une mutation de la boîte B2 modifie la réponse à un stress oxydant chronique*

L'analyse du nombre de foyers positifs pour l'histone H2AX phosphorylé ( $\gamma$ H2AX), classiquement utilisé comme un marqueur de stress oxydant, révèle que les animaux portant la mutation  $Pml^{A220V}$  présentent des niveaux de dommages à l'ADN significativement supérieurs aux animaux  $Pml^{WT}$  et équivalents aux animaux  $Pml^{KO}$  (Figure 32.A.). Ces résultats préliminaires pourraient indiquer des niveaux d'oxydations basales plus élevés chez ce mutant ponctuel et comparables à ceux observés chez les souris déficientes en PML.

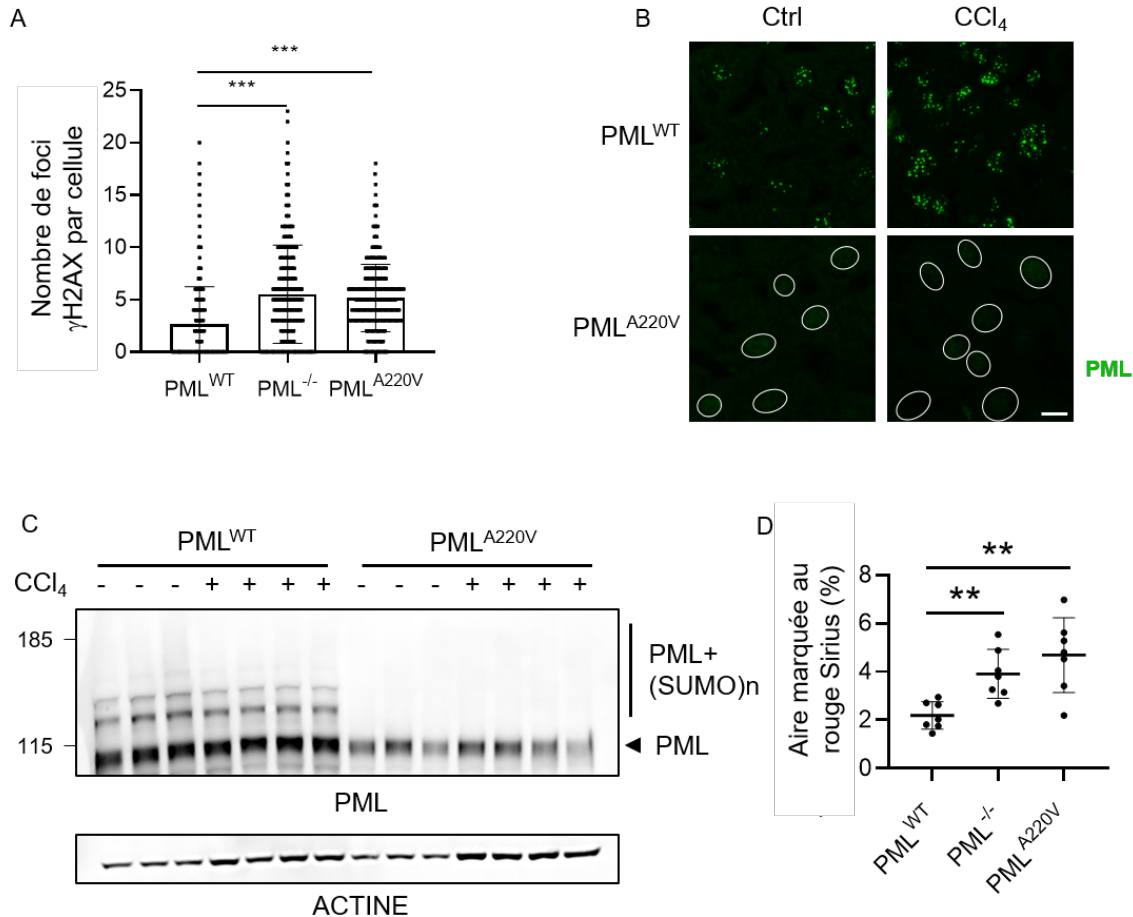


Figure 32 : Etude de la réponse du mutant  $Pml^{A220V}$  à un stress oxydant chronique

- Quantification du nombre de foyers  $\gamma$ H2AX sur des coupes de foies de souris étudiée par immunofluorescence. Sur le graphique, chaque point correspond à un noyau. Les quantifications ont été réalisées sur  $n=3$  champs différents issus de  $N=3$  animaux. Les résultats du test Mann-Whitney sont indiqués (\*\*\*,  $P<0,001$ ). Barre d'erreur : déviation standard.
- Défaut d'assemblage des CNP avec la mutation  $Pml^{A220V}$  en réponse à un traitement de 5 semaines avec du CCl<sub>4</sub> observé sur des coupes de foie. Les régions présentées sont périvasculaires. Les cercles blancs indiquent les bordures des noyaux des cellules  $Pml^{A220V}$ . Barre d'échelle: 5 $\mu$ m.
- Etude de la SUMOylation de PML chez des souris  $Pml^{WT}$  et  $Pml^{A220V}$  en réponse à 5 semaines de traitement au CCl<sub>4</sub> étudié par Western blot.
- Quantification de la surface de fibrose colorée au rouge Sirius après 5 semaines de traitement au CCl<sub>4</sub> chez les souris  $Pml^{WT}$ ,  $Pml^{KO}$  et  $Pml^{A220V}$ . Sur les images, la barre d'échelle correspond à 200 $\mu$ m. Sur le graphique chaque point représente la moyenne des aires fibrotiques quantifiées pour un animal. Les résultats du test Mann-Whitney sont indiqués (\*\*,  $P<0,01$ ). Barre d'erreur : déviation standard.

Nous avons également testé l'effet de la mutation  $Pml^{A220V}$  sur la réponse à un stress oxydant chronique. De précédentes études rapportent qu'un traitement prolongé avec du tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) induit une fibrose hépatique limitée par l'activation de la

sénescence des cellules stellaires hépatiques et dépendante de la voie p53 (Humpton et al., 2022; Krizhanovsky et al., 2008; Zhang et al., 2021). Dans ce contexte, un défaut d'activation de la voie p53 dans nos souris déficientes en PML ou présentant un défaut d'assemblage des CNP pourrait se traduire par une augmentation des dommages hépatiques.

Nos résultats préliminaires indiquent que le traitement durant 5 semaines avec le CCl<sub>4</sub> induit la formation des CNP à proximité des vaisseaux sanguins hépatiques chez les souris *Pml*<sup>WT</sup> (Figure 32.B.). Comme observé en réponse aux traitements avec d'autres oxydants (Figure 32), le traitement avec le CCl<sub>4</sub> n'induit pas la formation des CNP chez le mutant *Pml*<sup>A220V</sup>. Aucune hyper-SUMOylation de PML n'est détectée lors de l'analyse de la SUMOylation hépatique de la protéine après 5 semaines de traitement avec le CCl<sub>4</sub> (Figure 32.C.). De manière intéressante, l'analyse de la surface colorée au Sirius Red sur des coupes de foies de ces animaux, reflétant les niveaux de fibroses hépatiques, indiquent que les souris déficientes en PML ou portant la mutation *Pml*<sup>A220V</sup> présentent des dommages hépatiques équivalents et que ces dommages sont significativement supérieurs aux souris *Pml*<sup>WT</sup>.

Pris dans leur ensemble, ces résultats préliminaires confirment *in vivo* qu'une mutation de l'hélice  $\alpha$  de la boîte B2 de PML provoque des défauts d'assemblage des CNP dans les conditions basales et en réponse à l'arsenic. L'insensibilité du mutant *PML*<sup>A220V</sup> à l'APAP suggère également un rôle de l'hélice  $\alpha$  de PML dans la réponse au stress oxydant *in vivo*. De plus, nos résultats préliminaires obtenus avec le modèle CCl<sub>4</sub> ont permis de révéler que cette mutation est corrélée à une augmentation des dommages hépatiques en réponse à un stress oxydant chronique de la même manière que chez les animaux *PML*<sup>KO</sup>. L'augmentation de la fibrose pourrait refléter un défaut d'entrée en sénescence des cellules stellaires hépatiques due à un défaut d'activation de la voie p53. De futures études s'intéresseront à étudier ces hypothèses.

# MATERIEL ET METHODES

## *Drogues et molécules utilisées*

Nom	Fournisseur	Référence	Dose utilisée	Concentration de la solution
APAP (Acetaminophen)	Sigma-Aldrich	A5000	300 µg/g	15 µg/µL dans du PBS réchauffé
Arsenic	Sigma-Aldrich	202673	5 µg/g	1 µg/µL dans du PBS-NaOH 50mM.
Tétrachlorure de carbone	Sigma-Aldrich	289116	2,5 µL/g	20% CCl <sub>4</sub> dans de l'huile minérale
Huile minérale	Sigma-Aldrich	M8410	N.D.	N.D.

Tableau 8: Liste des drogues utilisées dans cette étude

## *Modèles animaux et traitements*

### *Création de lignées murines transgéniques pour le gène *Pml**

Les animaux ont été manipulés selon les directives de la protection animale du comité d'éthique d'expérimentation animale Paris-Nord n°121 (référéncé sous le numéro APAFIS#22504-2019101810251298 v4). Les souris sont élevées au sein de la plateforme de modèles pré-cliniques de l'unité INSERM US53, CNRS 2030, au sein de l'université Paris Cité (IRSL : Institut de Recherche Saint-Louis) en respectant un cycle de 12 heures jour/nuit dans des conditions SPF (Specific Pathogen Free) avec un accès libre à l'eau et à la nourriture.

La lignée de souris consanguine BALB/cByJ utilisée dans le cadre de cette étude a été fournie par Charles River et est déficiente pour l'enzyme acyl-coenzyme A déshydrogénase (*Acads*<sup>KO</sup>).

Le génotypage sur *Pml* a été réalisé avec le kit PCR multiplexe (Qiagen) en utilisant les amorces suivantes : 5'- GGTTGTCAGACTTGGCTGTGA -3' et 5'- CTCTTCCAGTTGGGCAAGAC -3'.

La PCR a été réalisée avec le programme suivant : une première étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 2 minutes puis une dénaturation de 30 secondes à 95°C, suivie d'une étape d'hybridation de 90 secondes à 60°C et d'une étape d'élongation de 90 secondes à 72°C. Ces 3 dernières étapes constituent un cycle répété 35 fois. Le cycle se termine par une incubation de 1 minute à 72°C avant de préserver les produits de PCR à 4°C.

Les souris *Pml<sup>A220V</sup>* ont été obtenues par édition du génome par la technique CRISPR-Cas9, réalisée sur des zygotes BALB/cByJ en utilisant la méthode TAKE (Hashimoto and Takemoto, 2015). Brièvement, une hyperovulation a été induite chez des femelles WT Balb/cByJ âgées de trois à quatre semaines en utilisant du CARD HyperOva (Cosmo bio) et de la gonadotropine chorionique humaine (Sigma). Ces femelles ont été placées en accouplement avec des mâles WT Balb/cByJ âgés de 8 à 20 semaines. Les ARN guides dirigés contre *Pml*, la protéine HIFI-Cas9 et l'ADN donneur ont été synthétisés par IDT pour former Alt-R CRISPR-Cas9 ribonucléoprotéine et ont été électroporés (NEPA21; Sonidal) dans les zygotes pour introduire la mutation *Pml<sup>A220V</sup>*. La séquence du guide utilisé est 5'- rGrUrG rUrUrG rCnrArCr rArUrG rCrGrC rGrCrU rCrCrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArU rGrCrU- 3'. Un génotypage des animaux a été réalisé comme décrit précédemment et les produits de PCR obtenus ont été séquencés (Eurofins Genomics).

#### Traitements d'induction de stress oxydant in vivo

Tous les traitements ont été initiés par voie intra-péritonéale chez des souris *Pml<sup>WT</sup>*, *Pml<sup>KO</sup>*, *Pml<sup>A220V</sup>* homozygotes, âgées de 7 à 10 semaines, de même âge et de même sexe. Pour chaque génotype, 3 souris contrôles ont été injectées avec de l'huile minérale seule et 7 souris ont reçu les injections de CCl<sub>4</sub>.

Les animaux traités à l'arsenic (5µg/g) ont reçu une injection et ont été euthanasiés puis disséqués après 30 minutes ou 2 heures de traitement. Les souris traitées à l'APAP (300 µg/g) ont reçu une injection après un régime à jeun de 12 heures sur la nuit (boisson à volonté) et ont été euthanasiées puis sacrifiées après 2 heures ou 6 heures de traitement. L'induction d'une fibrose hépatique chronique sur nos modèles murins a nécessité 10 injections de tétrachlorure de carbone (2,5 µL CCl<sub>4</sub> 20%/µg) réparties sur 5 semaines (2 injections par semaine) ; les souris ont ensuite été euthanasiées puis disséquées 48h après la dernière injection.

A la fin de chaque type de traitements, les différents lobes du foie ont été prélevés et conservés de différentes manières afin de procéder à de multiples analyses :



- Le lobe médian gauche coupé en deux dont un morceau a été congelé dans l'azote liquide pour de future analyse protéique, un morceau a été congelé à -20°C dans une solution de stabilisation des ARN appelée « RNAlater » (Invitrogen - Ref. AM7021)
- Le lobe médian droit recouvert de milieu de congélation pour tissu (Leica – Ref. 14020108926), a été congelé rapidement dans l'azote liquide afin d'obtenir un bloc, utilisable pour effectuer des coupes de tissu congelé au cryostat.
- Le grand lobe gauche fixé directement dans l'AFA (Q-path – Ref. 11656713), un fixateur histologique à fixation rapide (mélange d'acide acétique, de formaline et d'alcool), a ensuite été inclus en paraffine après 24 heures de fixation, afin d'obtenir un bloc, utilisable pour effectuer des coupes de tissus au microtome.

### Isolation et culture des MEF primaires

Les fibroblastes embryonnaires de souris primaires ont été isolés à partir d'embryons (E13,5) de souris *Pml<sup>WT</sup>*, *Pml<sup>A220V</sup>*. Après avoir retiré la tête et les viscères, les embryons ont été dissociés mécaniquement dans de la trypsine 0,5% v/v (Gibco). Les cellules ainsi obtenues ont étéensemencées en boîtes de culture de 15cm de diamètre, à raison de 3 millions de cellules par boîte. Seules les cellules fibroblastiques adhèrent au fond de la boîte. Elles sont cultivées en normoxie à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> en atmosphère humide dans un milieu DMEM High Glucose (4,5g/L) avec pyruvate (Gibco) et supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (Eurobio Scientific), 100U/ml pénicilline-streptomycine (Gibco) et 2mM glutamine (Gibco).

### Préparation des coupes histologiques

#### Cryosections de foies

Les lobes de foie congelés directement dans un milieu de congélation spécifique ont ensuite été coupés par tranche de 7-8 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (modèle NX70, ThermoFisher) mis à disposition sur la plateforme d'histologie (CIRB – Collège de France). Les cryosections ont été recueillies sur une lame Superfrost Plus (ThermoFisher) et conservées à -80°C.

## Coupes en paraffine

Les lobes de foie fixés dans l'AFA pendant 24 heures, ont ensuite été inclus en paraffine. L'inclusion en paraffine s'effectue par différents bains successifs à l'aide d'un automate de type carrousel (Modèle Citadel 2000, Thermofisher) mis à disposition sur la plateforme d'histologie (CIRB – Collège de France). Ainsi, le protocole d'inclusion dure 17h30, les lobes de foie sont d'abord déshydratés dans différents bains d'alcools de plus en plus concentrés : Ethanol 70% (1h), Ehtanol 90% (1h30), Ethanol 100% (1h), Ethanol 100% (1h30), Ethanol 100% (2h) ; puis les lobes de foie subissent une étape de clarification avec des bains successifs d'hydrocarbures aliphatiques (SubX – Leica Biosystems Ref.3803670E) : SubX (1h), SubX (1h30), SubX (2h) ; les lobes de foie imprégnés de solvant organique peuvent ensuite être infiltrés par la paraffine après 2 bains : Paraffine (2h), Paraffine (2h). Les lobes inclus en paraffine sont ensuite immergés dans un moule rempli de paraffine liquide sur une station d'enrobage (Shandon – Thermofisher) mise à disposition par la plateforme d'histologie (CIRB – Collège de France) ; les moules sont ensuite refroidis sur une plaque réfrigérée à -4°C afin de durcir la paraffine et figer le tissu à l'intérieur du bloc de paraffine.

Ces blocs de tissus inclus en paraffine ont ensuite permis d'effectuer des tranches de 6 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome couplé à un système de transfert automatique de coupes vers le défripeur (HM355S + STS – Thermofisher), mis à disposition par la plateforme d'histologie (CIRB – Collège de France). Les coupes paraffines ont été recueillies sur une lame Superfrost Plus (ThermoFisher), séchées dans un incubateur à 40°C pendant 24 heures puis conservées à 4°C.

## *Etude Histologique des coupes de foie*

### Coloration hématoxyline – éosine – safran sur coupes de foie

Afin d'apprécier la structure tissulaire du foie de nos modèles murins traitées et non traitées, une coloration histologique de type HES pour hématoxyline (noyau en violet foncé), éosine (cytoplasme en rose) et safran (fibres de collagène en jaune), a été effectuée sur les coupes de tissus inclus en paraffine.

Avant de procéder à la coloration, les coupes doivent être réhydratées, les lames sont donc plongées dans différents bains successifs permettant le déparaffinage et la réhydratation des coupes : SubX (5 min), SubX (5min), SubX (5 min), Ethanol 100% (5 min), Ethanol 100% (5 min), Ethanol 90% (5 min), Ethanol 70% (5 min), Eau (2 min).

Les coupes sont ensuite colorées au niveau des noyaux et du cytoplasme en pratiquant les bains suivants : Hématoxyline de Mayer (5 min, Leica Biosystems), eau du robinet (2 min), carbonate de Lithium saturée (30 s, SIGMA), eau du robinet (1 min), eosine 1% (2 min, Leica Biosystems – Ref. 3801602E), Eau du robinet (1 min).

Les bains qui suivent, permettent la déshydratation des coupes et la coloration des fibres de collagène : Ethanol 90% (1 min), Ethanol 100% (2 min), Safran 0,1% (4 min, solution obtenue par infusion d'1 g de Safran dans 1 L d'éthanol 100 % chauffé à 40 °C pendant 24-48h), Ethanol 100% (1 min), Ethanol 100% (1 min), Ethanol 100% (1min).

Pour mieux éclaircir les colorants, les coupes sont plongées dans un clarifiant : SubX (1 min), SubX (1 min), SubX (1 min) ; puis elles sont montées à l'aide d'un milieu de montage compatible avec l'agent clarifiant (SubX Mounting Medium – Leica Biosystems Ref. 3801741).

Les lames colorées ont ensuite été scannées sur le scanner de lames (Axioscan 7 – Carl Zeiss Micro-Imaging) mis à disposition par les plateformes d'Imagerie et d'Histologie (CIRB-Collège de France) afin de procéder à l'analyse de la structure du tissu.

#### Coloration au rouge picro-sirius sur coupes de foie

Afin d'évaluer le niveau de fibrose du foie de nos modèles murins traitées, une coloration histologique de type Rouge Picro-Sirius (coloration des fibres de collagène en rouge) a été effectuée sur les coupes de tissus inclus en paraffine.

Avant de procéder à la coloration, les coupes doivent être réhydratées, les lames sont donc plongées dans différents bains successifs permettant le déparaffinage et la réhydratation des coupes, suivant le même protocole que lors de la coloration HES décrite ci-dessus.

Les coupes sont ensuite colorées au niveau des fibres de collagène en pratiquant les bains suivants : Rouge Picro-Sirius (1 h sous agitation, solution obtenue en diluant 0,5 g de Rouge Sirius – Direct 80, SIGMA Ref.365548, dans une solution aqueuse saturée en acide picrique), Eau acétifiée 0,5% (1 min) en agitant fortement les lames, Eau acétifiée 0,5% (1min).

Les lames sont déshydratées dans des bains successifs à concentration croissante d'alcools : Ethanol 50% (10s), Ethanol 70% (1 min), Ethanol 90% (1 min), Ethanol 100% (1 min), Ethanol 100% (5 min), Ethanol 100% (5 min). Pour finir, les coupes sont clarifiées : SubX (5 min), SubX (5min) ; puis elles sont montées (SubX Mounting Medium – Leica Biosystems Ref. 3801741).

Les lames colorées ont ensuite été scannées sur le scanner de lames (Axioscan 7 – Carl Zeiss Micro-Imaging) mis à disposition par les plateformes d'Imagerie et d'Histologie (CIRB-Collège de France) afin de procéder à l'analyse des tissus et à la quantification des zones fibrotiques.

#### Immunomarquage et analyse de la distribution des CNP par microscopie confocale sur coupes de foies de souris

PML	Merck Millipore	MAB3738	Souris	1/1000e
DAXX	Santa Cruz	sc-7152	Lapin	1/500e
$\gamma$ H2AX	Merck Millipore	05-636		1/500e

Tableau 9: Anticorps primaires utilisés pour les immunofluorescences

Les coupes de foie de souris utilisées pour les immunomarquages ont été cryopréservées dans un milieu de congélation pour tissu (Leica) à -80°C. Les Mefs primaires ont quant à elles étéensemencées sur des lamelles de verre.

Le même protocole d'immunomarquage a été utilisé pour les coupes de foies et les Mefs primaires. Les échantillons ont été fixés à la formaline 10% (Sigma-Aldrich) durant 15 minutes et perméabilisées dans une solution de PBS 0,5% Triton-X100 (Sigma-Aldrich) pendant 15 minutes. Pour les coupes de foies de souris, une étape supplémentaire de blocage dans une solution de PBS 0,5% Triton-X100 supplémenté de 10% v/v de sérum de chèvre normal (NGS) durant une heure à température ambiante a été réalisée. Les anticorps primaires ont été dilués dans du PBS 0,5% Triton-X100 (supplémenté de 10% NGS v/v pour les coupes de foies de souris) et incubés à

température ambiante pendant 1 heure. Les anticorps secondaires supplémentés en DAPI (1µg/ml) ont également été dilués dans la solution de perméabilisation et incubés durant 1 heure à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés pour la microscopie confocale ont été fournis par Jackson ImmunoResearch et sont couplés à des fluorochromes (Alexa Fluor 488, 568, 594, 647). Les lamelles ont été montées en utilisant un milieu de montage à base de Mowiol.

L'analyse par microscopie confocale a été réalisée sur un microscope à balayage laser LSM 980 (Carl Zeiss Micro-Imaging) équipé d'un détecteur spectral et d'un module Airyscan 2 ou avec un microscope confocal à spinning disk (Nikon Eclipse Ti) équipé d'une caméra Coolsnap HQ2 (Photometrics) mis à disposition par la plateforme d'Imagerie (CIRB – Collège de France). Les acquisitions ont été réalisées en utilisant un objectif 60X à immersion à huile.

### Western blot

Les échantillons de foies de souris ont été gelés instantanément dans de l'azote liquide. Ils ont ensuite été broyés avec une bille de métal en utilisant un Tissue Lyser (Qiagen) dans un tampon Laemmli dépourvu de réducteur (200mM Tris pH 6,8, 8% SDS, 40% glycérol, 0,2% bleu de bromophénol). Tous les produits entrant dans la composition des tampons cités ci-dessus ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Le protocole utilisé pour la suite de l'analyse par Western blot est similaire à celui décrit dans les méthodes de la partie « résultats supplémentaires ».

## *Analyse des données*

### Quantification des zones fibrotiques sur une coupe de foie colorée au rouge picro-sirius

Le logiciel QuPath, software open source, permet d'analyser des coupes de tissus colorées et de quantifier tout type de signal (Bankhead, P. et al. QuPath : Open source software for digital pathology image analysis. Scientific Reports (2017).) Ce logiciel permet d'analyser l'image complète des coupes de tissu ; on peut à l'aide d'outils de classification d'objet et de pixel apprendre au logiciel à reconnaître le signal que l'on souhaite quantifier (machine learning). Des

scripts d'analyse peuvent aussi être incorporés dans le programme pour l'adapter à notre demande.

La coloration rouge-picrosirius a ainsi été quantifiée sur l'ensemble de chaque coupe de foie, en utilisant l'outil de machine learning ; le programme de machine learning a été mis en place par Philippe Mailly (Plateforme Imagerie – CIRB – Collège de France).

#### Comptage du nombre de foyers $\gamma$ H2AX

Les comptages du nombre de foyers  $\gamma$ H2AX, a été réalisée sur des coupes de foies de souris imagées avec un microscope confocal à spinning disk (Nikon Eclipse Ti) équipé d'une caméra Coolsnap HQ2 (Photometrics). Les analyses ont été menées sur les échantillons de foies de n=3 animaux. Pour chaque animal, un minimum de n=3 champs, projetés en z (somme des intensités), comportant chacun environ n=50 cellules ont été analysés.

Annexe 3 : Article de recherche, Nature  
Communications, publié



## Article

# Exploration of nuclear body-enhanced sumoylation reveals that PML represses 2-cell features of embryonic stem cells

Received: 6 March 2021

Accepted: 5 September 2022

Published online: 29 September 2022

Check for updates

Sarah Tessier<sup>1,2,7,10</sup>, Omar Ferhi<sup>1,2,10</sup>, Marie-Claude Geoffroy<sup>1,2,10</sup>, Román González-Prieto<sup>3,8</sup>, Antoine Canat<sup>2,9</sup>, Samuel Quentin<sup>2,4</sup>, Marika Pla<sup>5</sup>, Michiko Niwa-Kawakita<sup>2</sup>, Pierre Bercier<sup>1,2</sup>, Domitille Rérolle<sup>1,2</sup>, Marilyn Tirard<sup>6</sup>, Pierre Therizols<sup>2</sup>, Emmanuelle Fabre<sup>2</sup>, Alfred C. O. Vertegaal<sup>3</sup>, Hugues de Thé<sup>1,2,4</sup>✉ & Valérie Lallemand-Breitenbach<sup>1,2</sup>✉

Membrane-less organelles are condensates formed by phase separation whose functions often remain enigmatic. Upon oxidative stress, PML scaffolds Nuclear Bodies (NBs) to regulate senescence or metabolic adaptation. PML NBs recruit many partner proteins, but the actual biochemical mechanism underlying their pleiotropic functions remains elusive. Similarly, PML role in embryonic stem cell (ESC) and retro-element biology is unsettled. Here we demonstrate that PML is essential for oxidative stress-driven partner SUMO2/3 conjugation in mouse ESCs (mESCs) or leukemia, a process often followed by their poly-ubiquitination and degradation. Functionally, PML is required for stress responses in mESCs. Differential proteomics unravel the KAP1 complex as a PML NB-dependent SUMO2-target in arsenic-treated APL mice or mESCs. PML-driven KAP1 sumoylation enables activation of this key epigenetic repressor implicated in retro-element silencing. Accordingly, *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs re-express transposable elements and display 2-Cell-Like features, the latter enforced by PML-controlled SUMO2-conjugation of DPPA2. Thus, PML orchestrates mESC state by coordinating SUMO2-conjugation of different transcriptional regulators, raising new hypotheses about PML roles in cancer.

Membrane-less organelles are stress-sensitive deposits of concentrated bio-molecules. One specific type is nuclear bodies (NBs) scaffolded by the promyelocytic leukemia protein (PML), which attracts many disparate partner proteins. PML is required for essential processes such as senescence, metabolism, or viral restriction<sup>1,2</sup>. Restoration of PML NBs with arsenic or retinoic acid therapies underlies cures of patients with acute promyelocytic leukemia (APL), emphasizing the physio-pathological relevance of these compartments<sup>3</sup>. In vivo, PML senses reactive oxygen species (ROS), driving PML NB assembly and physiological responses to oxidative stress<sup>4,5</sup>. Arsenic directly binds PML, promoting its multimerization and NB assembly<sup>6-9</sup>. PML is also essential for the fitness of normal or

malignant stem cells<sup>10-13</sup> and its down-regulation alleviates reprogramming of mouse embryonic fibroblast (MEFs) into iPSCs<sup>14</sup>. These findings raise the question of how PML NBs contribute to stem cell biology and their response to stress.

Most PML NB partners recruited by the sumoylated PML scaffold were serendipitously discovered. PML shell insolubility has thwarted biochemical purification efforts to establish a comprehensive list of these partners. No generic biochemical activity has been demonstrated so far that might explain the diversity of PML-regulated physiological processes<sup>1,2</sup>. PML NBs have a proposed role in post-translational modifications of partners, including sumoylation, since UBC9, the SUMO-E2 enzyme, concentrates within NBs<sup>12,9</sup>. Functionally,

A full list of affiliations appears at the end of the paper. ✉ e-mail: [hugues.dethe@inserm.fr](mailto:hugues.dethe@inserm.fr); [valerie.lallemand@inserm.fr](mailto:valerie.lallemand@inserm.fr)



multi- or poly- conjugation by SUMO2/3 (two indistinguishable SUMO paralogues) may control proteasomal degradation through recruitment of SUMO-targeted ubiquitin ligases<sup>7,15–18</sup>. Sumoylation may also regulate transcription<sup>19</sup> and sustain epigenetic modifications, notably those essential for maintaining the identity of mouse embryonic stem cells (mESCs)<sup>20–22</sup>. In various cell lines, oxidative stress increases sumoylation, while paradoxically SUMO enzymes are inhibited by ROS<sup>23–26</sup>. These observations raise the question of whether sumoylation control might be involved in some PML-mediated functions, in particular in stem cell fate.

Here we establish that arsenic-enhanced PML NB biogenesis drives sumoylation and we identify an unbiased list of protein targets from primary cells. By establishing a biochemical function for PML NBs, our results explain the pleiotropy of PML physiological roles. Remarkably, in mESCs, PML favors SUMO2 conjugation of the KAP1 epigenetic regulatory complex, as well as that of the master transcription factor DPPA2 to oppose 2-Cell-Like (2CL) features, unraveling an unexpected key role for PML in the homeostasis of pluripotent ESCs.

## Results

### PML allows stress-induced mESC growth inhibition and SUMO2 conjugation in vivo

In pluripotent mESCs, PML expression is high and NBs are abundant, compared to early stages of differentiation induced by retinoic acid treatment and LIF withdraw (Fig. 1a). Arsenic stress rapidly increased PML NB assembly and recruited SUMO1/2/3 (Supplementary Fig. 1a), as in transformed cell lines<sup>6</sup>. To functionally explore any role of PML NBs in mESC homeostasis and stress response, we generated CRISPR/Cas9-engineered *Pml* knock out (*Pml*<sup>-/-</sup>) mESCs. Critically, in two independent clones, PML was required for full arsenic-driven growth arrest (Fig. 1b), implying that the dynamics of NB assembly plays a key role in mESCs stress response.

Similar to PML expression, global SUMO2 conjugation was higher in undifferentiated mESCs than in their committed counterparts (Fig. 1a, right). To explore any role of PML NBs in sumoylation control, we leveraged mESCs and two in vivo biological systems wherein NB biogenesis is tunable by arsenic treatment (Fig. 1c). First, in *Pml*<sup>+/+</sup> and *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, we stably expressed His<sub>10</sub>-SUMO1 or 2 (ref. 27) at low levels compared to endogenous SUMO peptides (Fig. 1d-inputs). Second, we expressed low His<sub>10</sub>-SUMO2 level in an APL mouse model, where PML is expressed, but NB formation is impaired, a phenotype rapidly reversed by arsenic<sup>3,6</sup> (Fig. 1c, Supplementary Fig. 1b). Third, using His<sub>6</sub>-HA-tagged *Sumo1* knock-in mice<sup>28</sup>, we derived *His<sub>6</sub>-HA-Sumo1;Pml*<sup>+/+</sup> and *His<sub>6</sub>-HA-Sumo1;Pml*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1c). In this setting, PML and SUMO expressions can first be boosted by polyI:C (pI:C)<sup>29,30</sup> (Supplementary Fig. 1c) and then PML NBs biogenesis can be enhanced by arsenic (Supplementary Fig. 1d).

To assess basal and arsenic-induced sumoylation, we first performed His-pulldown enrichment and Western blot analyses. In mESCs, arsenic rapidly promoted conjugation by SUMO1 and SUMO2/3 only in *Pml*<sup>+/+</sup> cells (Fig. 1d left and right respectively, quantification Supplementary Fig. 1e). Moreover, in untreated *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, basal His<sub>10</sub>-SUMO2 conjugation was less efficient than in their *Pml*<sup>+/+</sup> counterparts (Fig. 1d, right arrowed). In contrast, basal SUMO1 conjugation was reproducibly slightly higher in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, suggesting that SUMO1 might compensate for the SUMO2/3 conjugation defect (Fig. 1d, left panel arrowed). Similarly, in His<sub>10</sub>-SUMO2-APLs, we observed a drastic global SUMO2 hyper-conjugation upon NB restoration by arsenic treatment (Fig. 1e, and Supplementary Fig. 1b, f). Finally, in the liver of *His<sub>6</sub>-HA-Sumo1* knock-in mice, arsenic treatment increased His<sub>6</sub>-HA-SUMO1 conjugation, but also massively induced SUMO2/3-modification of SUMO1 conjugates, an effect sharply enhanced by pI:C priming (Fig. 1f, quantification Supplementary Fig. 1g). Here again, arsenic-enhanced sumoylation was not observed in the *Pml*<sup>-/-</sup> background. Importantly, experiments in *HA-His<sub>10</sub>-Sumo3* knock-in mice (encoding

the SUMO2 paralogue) demonstrated that arsenic-enhancement of direct SUMO2 conjugation in liver was of much greater amplitude than the one detected by SUMO1 pull-down (Fig. 1f, g). Collectively, all three models converge to demonstrate that stress-induced PML NB assembly correlates with global hyper-SUMO2 conjugation. In mESCs, such PML/SUMO2 coupling was even observed in the basal unstressed state.

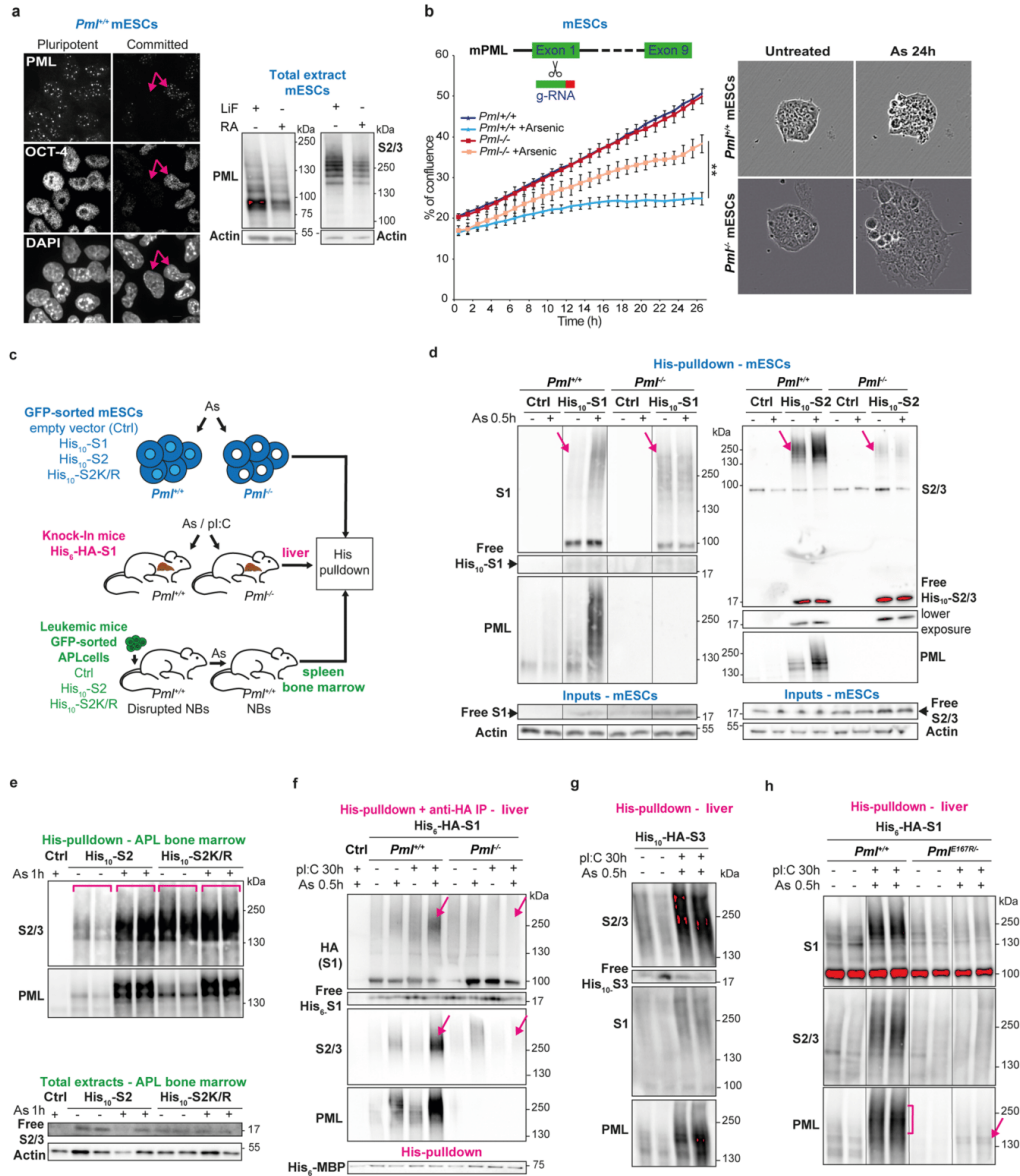
SUMO2/3 being prone to its own sumoylation<sup>20</sup>, we questioned PML contribution to the formation of SUMO2-containing chains. In both mESCs and APL mice, stable expression of a His<sub>10</sub>-SUMO2 mutant defective for chain formation (SUMO2K/R)<sup>27</sup> blocked arsenic-increased global SUMO2 conjugation (Fig. 1e and Supplementary Fig. 1h), while critically, arsenic-induced PML multi-sumoylation was preserved. In untreated APL mice, the level of basal global conjugates was sharply increased in the His<sub>10</sub>-SUMO2K/R pulldown (Fig. 1e, right part), suggesting that this mutant blocks basal SUMO2 chain formation and the subsequent degradation of targets, leading to their accumulation.

To mechanistically explore the contribution of NBs to PML- and arsenic-controlled sumoylation, we investigated whether the latter depends on partner protein recruitment, which requires a specific sumoylation site in PML<sup>29</sup>. We thus generated a E167R *Pml* knock-in mouse mutated on the corresponding sumoylation consensus sequence and derived *Pml*<sup>E167R/+</sup>; His<sub>6</sub>-HA-*Sumo1* mice. As expected, PML NB-localization of endogenous DAXX, a well-known PML partner, was impaired in these mice (Supplementary Fig. 1i). Critically, global hyper-sumoylation by SUMO1 and SUMO2/3 upon arsenic/pI:C co-treatment was abolished in liver tissues of *Pml*<sup>E167R/+</sup>; His<sub>6</sub>-HA-*Sumo1* mice (Fig. 1h right part, control PML profile in Supplementary Fig. 1j). Collectively, these findings support the conclusion that PML NBs, through partner recruitment, favor their sumoylation, primarily by SUMO2/3 chain formation.

### PML NBs favor stress-induced SUMO2-dependent ubiquitination

Given that hyper-sumoylation may drive poly-ubiquitination and degradation, we then assessed the fate of PML-driven sumoylated proteins upon arsenic stress. We found that sumoylated proteins decreased rapidly after their initial boost in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs (Fig. 2a and Supplementary Fig. 2a) or liver (Fig. 2b). Critically, in both models, this decrease was accompanied by a PML-dependent wave of dual SUMO2-specific/ubiquitin conjugation (Fig. 2a, b and Supplementary Fig. 2b) and accumulation of poly-ubiquitinated proteins in PML NBs (Supplementary Fig. 2c). In vivo pre-treatment with Bortezomib, a proteasome inhibitor, stabilized SUMO2/3 conjugates upon arsenic exposure in *Pml*-proficient livers or APL (Supplementary Fig. 2d and Supplementary Fig. 4b below). In the experiments above, we cannot exclude that a fraction of SUMO2-conjugates consists of sumoylated PML. Note, however, that the kinetic changes in PML profiles upon arsenic treatment do not match that of SUMO2 (Fig. 2b) and that SUMO2K/R altered the basal and arsenic-induced SUMO2 conjugates, but not those of PML (Fig. 1e). Collectively, these observations support the idea that PML NBs enables SUMO2-dependent ubiquitination and subsequent degradation of a substantial amount of targets under oxidative stress ex vivo or in vivo.

Arsenic-driven PML NB formation may concentrate the SUMO-E2 UBC9 within NBs (Supplementary Fig. 2e)<sup>9</sup>. In cell lines and in vitro, SUMO and ubiquitin modifying enzymes may be inactivated by ROS, which oxidizes their active-site cysteines<sup>24,26</sup>. Since PML is also a cysteine-rich oxidation-prone protein<sup>8</sup>, we wondered whether PML shell might constitute a local oxidation-protective environment. We thus explored the redox status within PML NBs using the glutathione Grx1-roGFP2 sensor<sup>31</sup> in fusion with the NB-associated SPI100 protein (Supplementary Fig. 2f). Grx1-roGFP2-SPI100 was localized at PML NBs, as expected, and was significantly less oxidized than in the rest of the nucleoplasm. Thus, lower oxidation levels at PML NBs suggests that PML NBs could shield sumoylation enzymes such as UBC9 from inhibition by cellular ROS.



**Identification of PML NB-dependent SUMO targets**

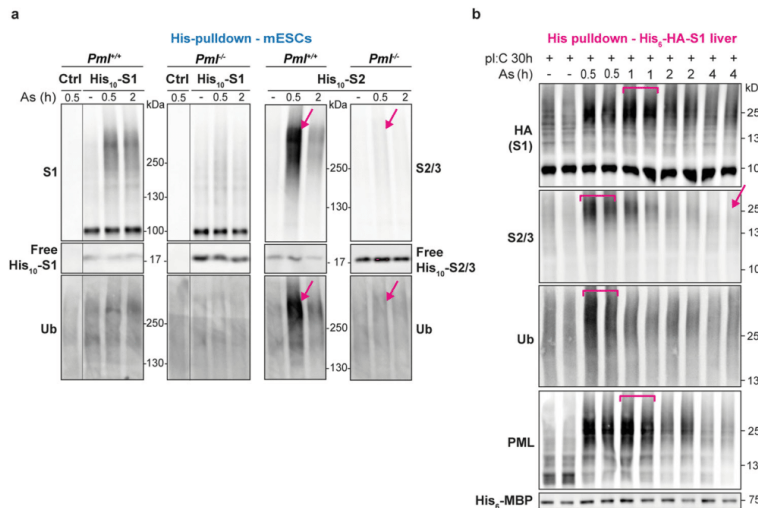
To identify the SUMO conjugates regulated upon PML NB assembly, we undertook large-scale purifications of sumoylated proteins in APL mice and in mESCs for label-free quantitative proteomic analysis (LFQ LC-MS/MS)<sup>27</sup> (Fig. 3a). The spleen is a hematopoietic organ enlarged upon leukemic cell invasion, rendering possible in vivo differential analysis of SUMO2 targets with altered (untreated APL) or restored (arsenic-treated APL) PML NBs formation. Three cohorts of His<sub>10</sub>-SUMO2-expressing or control APL mice were injected or not with arsenic and sampled after 1h (cohort no. 1), 3h (cohort no. 2) or 6h (cohort no. 3). To identify proteins conjugated specifically by His<sub>10</sub>-SUMO2, we compared, within

each cohort, His<sub>10</sub>-SUMO2 APL versus control APL, in both treated and untreated animals (see methods and Supplementary Data 1). We thus identified reliable His<sub>10</sub>-SUMO2-conjugated proteins, with over 60% overlap in untreated animals between the three cohorts (Supplementary Data 1). In untreated mice, PML and PML/RARA were the top SUMO conjugates, reflecting their known efficient baseline conjugation. Most of these in vivo identified basal SUMO2 targets belonged to canonical SUMO-regulated pathways and key hematopoietic regulators, notably C/EBPα<sup>32</sup> (Supplementary Data 1).

We then focused on targets differentially conjugated by SUMO2 upon arsenic-driven NB reassembly (Fig. 3b). To do so, we

**Fig. 1 | PML is required for stress response and sumoylation in mESCs and mice.** **a** PML NBs (representative confocal analysis, left) and PML expression (Western blot analysis, right) in pluripotent (LIF) versus committed (Retinoic Acid and LIF withdrawal) mESCs, in which Oct4 decreases (compare arrowed cell). Scale: 5  $\mu$ m. Representative data from three independent experiments. **b** InCuCyte cell proliferation assay showing arsenic stress-resistance with loss of Pml; top schematic of Pml edition. Mean  $\pm$  SD of  $n = 4$  independent biological replicates, right bar indicates adjusted p-value,  $**p = 0.007$ , between growth curves of arsenic-treated  $Pml^{+/+}$  and arsenic-treated  $Pml^{-/-}$  mESCs, one-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test (left); and representative images (right), Scale: 50  $\mu$ m. Representative of 2 CrispR/Cas9-generated  $Pml^{-/-}$  mESC clones. **c** Experimental mouse models with tunable PML NBs: (Blue)  $Pml^{+/+}$  or  $Pml^{-/-}$  mESCs stably expressing His<sub>10</sub>-SUMO1-, His<sub>10</sub>-SUMO2-, His<sub>10</sub>-SUMO2K/R-IRES-GFP or GFP (His<sub>10</sub>-S1, His<sub>10</sub>-S2, His<sub>10</sub>-S2K/R, Ctrl). (Pink) His<sub>6</sub>-HA-Sumo1 knock-in;  $Pml^{+/+}$  or  $Pml^{-/-}$  mice injected with arsenic and pl:C to maximize NBs. (Green) APL mice obtained from serial transplantations of APL cells (Ctrl APL) or sorted APL cells expressing the indicated His<sub>10</sub>-SUMOs, with arsenic injection to restore PML NBs. **d** Pulldown (PD)

of His<sub>10</sub>-S1 (left) or His<sub>10</sub>-S2 (right) conjugates showing arsenic-increased sumoylation in  $Pml^{-/-}$  mESCs only. Inputs indicating similar low levels of free His<sub>10</sub>-SUMO expression. Arrows: baseline sumoylation depending on PML. Representative data. Supplementary Fig. 1e for statistics. **e** PD from APL bone marrows as in (1d), showing increases in His<sub>10</sub>-S2, but not His<sub>10</sub>-S2K/R, conjugation upon arsenic injection. Total extracts indicate respective levels of free S2/3. Representative experiment (2 mice per condition, 1 Ctrl APL with untagged SUMO2),  $n = 3$ . **f** His<sub>6</sub>-HA-S1 conjugates dually purified from liver, showing PML-dependent increase in S1/2/3 conjugation upon arsenic/pl:C (pink arrows). Ctrl:  $Pml^{+/+}$  mice, His<sub>6</sub>-MBP recombinant protein; internal PD control. See Supplementary Fig. 1g for statistics. **g** Same as (1f), using His<sub>10</sub>-HA-Sumo3 knock-in mice. **h** Arsenic-increased sumoylation is lost in  $Pml^{E167R}$  knock in mice with PML NBs defective for partner recruitment, PD from the indicated mice, as in (1f). Control with PML profile from total extract in Supplementary Fig. 1j. **l**, **h** Representative of  $n = 6$  mice per condition over three independent experiments. Source data are provided as a Source Data file.



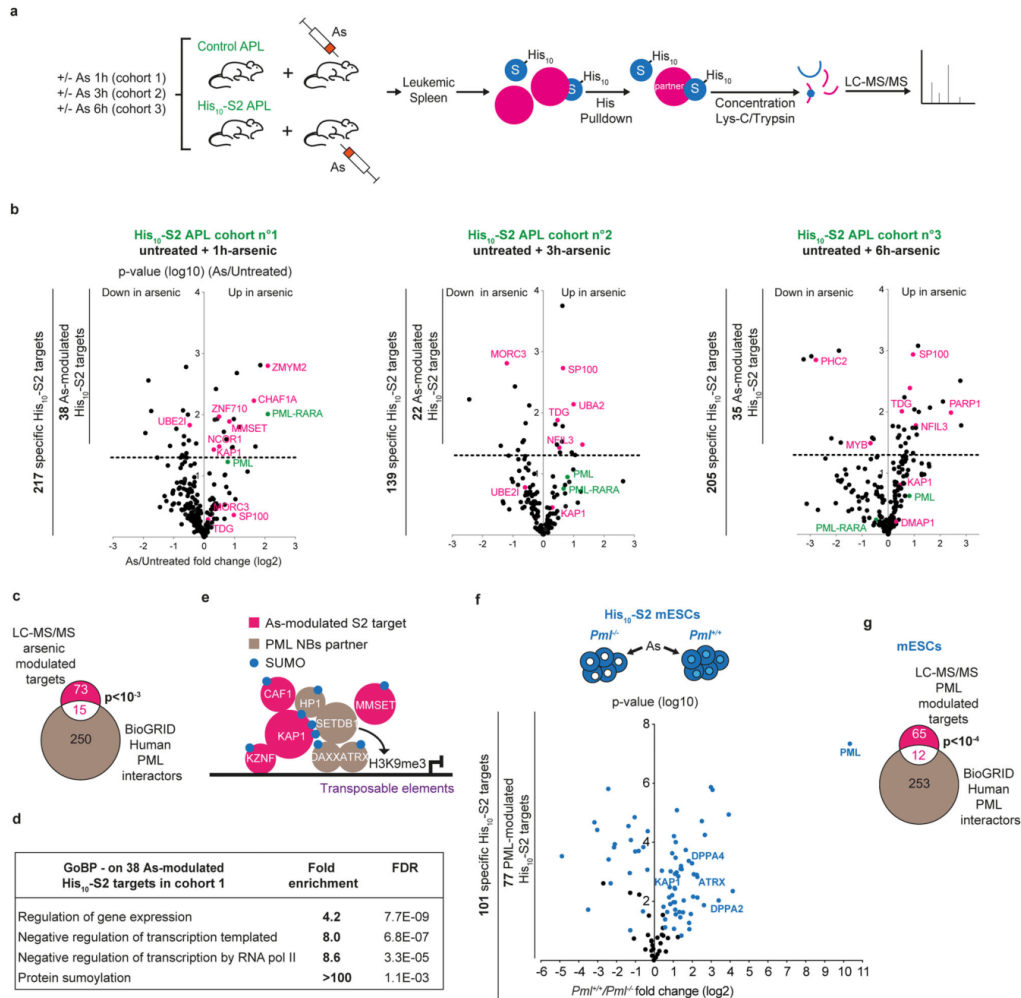
**Fig. 2 | PML NBs are required for SUMO2/ubiquitin conjugation in vivo.** **a** His-PD of His<sub>10</sub>-S1 or His<sub>10</sub>-S2 conjugates from mESCs exposed to arsenic, revealing a rapid ubiquitination of the SUMO2 conjugates only, after their PML-dependent boost. The levels of the various free His<sub>10</sub>-SUMOs in mESCs are indicated.  $n = 5$

independent experiments. **b** Representative of His pull-down from His<sub>6</sub>-HA-SUMO1 mouse liver showing waves of SUMO1 and multi-SUMO1, SUMO2/3 or Ubiquitin (Ub) conjugation with time of arsenic injection. 2 mice per condition are shown over 2 independent experiments with 3 mice per condition.

selected proteins significantly increased or decreased in arsenic-treated His<sub>10</sub>-SUMO2 APL compared to untreated His<sub>10</sub>-SUMO2 APL mice, within each cohort. The majority of the 88 arsenic-modulated targets identified among the 3 cohorts had increased sumoylation levels (Fig. 3b and Supplementary Data 2). Yet the abundance of those targets in the total APL proteome was unchanged upon arsenic (Supplementary Fig. 3a and Supplementary Data 2, 3), implying that arsenic actually enhanced their sumoylation, rather than their abundance. As expected, these 88 arsenic-modulated SUMO2 targets were enriched in known PML-interacting proteins (Fig. 3c)<sup>33</sup>. One hour after injection, when NBs started to re-organize, 19 targets displayed an increased sumoylation (Fig. 3b left, Supplementary Data 1–2), including PML/RARA itself, negative regulators of transcription and epigenetic regulators, some of which may bind RARA (NCOR1 or EPC2, the polycomb EZH2 partner) (Fig. 3d). Strikingly, among these early arsenic-modulated SUMO2 conjugates, we identified five proteins belonging to the same chromatin-remodeling complex involved in stem cell maintenance,

comprising KAP1 (TRIM28 or TIF1beta), CHAF1a subunit of the CAF-1 histone chaperone, the MMSET histone methyl transferase (also known as WHSC1 or NSD2) and two DNA-docking KRAB-Znf proteins (ZNF710, ZNF148) (Fig. 3b, e and Supplementary Data 2)<sup>34,35</sup>. Other members of the KAP1 complex, not identified in this experiment, are known PML NBs partners, such as the DAXX/ATRX H3.3 histone chaperone or the heterochromatin protein 1 (HP1) (Fig. 3e)<sup>35–37</sup>. Remarkably, the repertoire of arsenic-modulated His<sub>10</sub>-SUMO2 targets underwent significant changes with time (Fig. 3b and Supplementary Data 2). Sumoylation of proteins linked to stem cell potential, such as PML/RARA, KAP1 or Polycomb complex member (PHC2), all decreased at later timepoints, likely reflecting their SUMO2-triggered degradation (Fig. 3b and Supplementary Data 1–2). We also identified increases in sumoylation of SP100, TDG, MORC3 and NFIL3, known NB components, at later time points (Supplementary Fig. 3b)<sup>9</sup>. Several SUMO2 targets identified here -such as CCAR1, MORC3, KAP1- may contribute to the poorly understood PML control over p53 function (Fig. 3b and Supplementary Data 2)<sup>3,36,38,39</sup>.





**Fig. 3 | Identification of the His<sub>10</sub>-SUMO2 targets upon arsenic-induced PML NB reorganization in APL mice.** **a** Experimental setup for differential SUMO-proteome analyses upon arsenic, based on large-scale PD of His<sub>10</sub>-S2 conjugates from three mouse cohorts, each containing 6 Ctrl and 6 His<sub>10</sub>-S2 APL mice treated ( $n = 3$ ) or not with arsenic ( $n = 3$ ), for the indicated time, followed by LC-MS/MS analyses. **b** Volcano plots showing proteins differentially sumoylated in arsenic- vs untreated His<sub>10</sub>-S2 APL mice for each cohort; label-free quantification (LFQ) fold changes;  $p$ -values, two-sided  $t$ -test; dashed line represents  $p$ -value threshold (0.05). Targets plotted when significantly enriched in His<sub>10</sub>-S2 vs Ctrl APL mice (Supplementary Data 1), numbers of identified proteins in each group are indicated (left bars). **c** Venn diagram showing proteins common to arsenic-modulated His<sub>10</sub>-S2 targets identified in **(b)** and previously reported PML partners in ref. 33 and

Biogrids;  $p$ -value (proportion of PML interactors in arsenic-modulated His<sub>10</sub>-S2 targets), two-sided standard  $t$ -test. **d** Gene Ontology enrichment analysis (GOBP, gene ontology biological process) of 1h-arsenic-modulated targets, highlighting repressive transcriptional regulation. **e** Schematic overview of the arsenic-modulated SUMO2 targets (pink) and other members related to PML in the KAP1 complex. **f** Volcano plot showing His<sub>10</sub>-SUMO-2 conjugated proteins (blue) identified by LC-MS/MS analysis in His<sub>10</sub>-S2  $Pml^{-/-}$  vs  $Pml^{+/+}$  mESCs (see supplementary Fig 3c for Western blot controls).  $n = 4$  biological replicates; fold changes (log<sub>2</sub>),  $p$ -value (log<sub>10</sub>), two-sided  $t$ -test. **g** Venn diagram showing proteins common to PML-dependent His<sub>10</sub>-S2 targets identified in **(f)** and reported as PML partners as in **(c)**,  $p$ -value two-sided  $t$ -test.

To further support the relevance of our APL model for the identification of PML NB-regulated proteins, we performed the same SUMO proteomic analyses using mice engrafted with  $Pml$ -deficient APL cells (Supplementary Data 4). We compared  $Pml^{-/-}$  APL cells expressing or not His<sub>10</sub>-SUMO2, from leukemic mice treated or not with arsenic for 3 h. Among the 554 His<sub>10</sub>-SUMO2 targets in  $Pml^{-/-}$  APL mice, 86 were differentially conjugated in arsenic-treated mice. Remarkably, only a

few arsenic-modulated His<sub>10</sub>-SUMO2 targets identified in the previous  $Pml^{+/+}$  APL cohorts also varied upon arsenic treatment in  $Pml$ -deficient APL mice, PML/RARA being the top enhanced one (Supplementary Data 4). In particular, in absence of  $Pml$ , none of the previously identified members of KAP1 complex and other PML partners (TDG, MORC3, SP100) underwent arsenic-modulated change in sumoylation, consistently with their PML NBs-regulated SUMO2 conjugation.

Overall, these unbiased explorations of stress-modulated SUMO2-conjugation in vivo establish the sumoylation activity of PML NBs and identify a critical epigenetic regulatory complex as a key target.

We also analyzed the His<sub>10</sub>-SUMO2 targets differentially conjugated in *Pml*<sup>+/+</sup> and *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Supplementary Fig. 3c), treated with arsenic to maximize PML NB assembly. Strikingly, among the 101 proteins identified as specific His<sub>10</sub>-SUMO2 targets (by comparison with control mESCs that do not express tagged SUMO2), 77 proteins were differentially sumoylated in *Pml*<sup>+/+</sup> vs *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, with again a significant enrichment in known PML-interacting proteins (Fig. 3f, g and Supplementary Data 5). Importantly, 54 among these 77 His<sub>10</sub>-SUMO2 targets were increased in *Pml*<sup>+/+</sup> compared to *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, among which were KAP1 and its interacting NBS-associated partner, the ATRX H3.3 chaperone<sup>40</sup> (Fig. 3e, f). His<sub>10</sub>-SUMO2 conjugation of components of the polycomb repressive complexes (L3mbtl2, MGA, SUZ12) was increased in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs (Supplementary Data 5). Interestingly, we also identified as PML-dependent SUMO2 targets, DPPA2 and DPPA4, members of a transcription factor complex controlling mESCs identity (see below). Altogether, differential SUMO2 proteomic profiling identified various targets of PML NBs in treated APL and mESCs, not only KAP1 and its interacting chromatin-remodeling partners, but also key transcription regulators, suggesting a broad role of PML in epigenetic and transcriptional regulation.

#### PML favors KAP1 sumoylation and TE repression

Since sumoylation is a critical activator of KAP1 complex function<sup>34,41</sup> (Fig. 3e), we explored the role of PML and SUMOs in KAP1-dependent epigenetic repression in mESCs. We first established that multi-SUMO2 KAP1-conjugates were enriched in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs relative to *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs in basal conditions (Supplementary Fig. 4a). Then, arsenic sharply increased, in a PML-dependent manner, KAP1 conjugation by His<sub>10</sub>-SUMO2, but not by His<sub>10</sub>-SUMO1 (Fig. 4a and Supplementary Fig. 4a). In APL mice pre-treated with a proteasome inhibitor, KAP1 was also hyper-conjugated by SUMO2 upon arsenic treatment (Fig. 4b, controls in Supplementary Fig. 4b). Finally, KAP1-YFP had a nuclear diffuse localization, but it overlapped with PML NBs upon proteasome inhibition (Fig. 4c)<sup>42</sup>. Collectively, KAP1 behaves as a PML partner undergoing stress-enhanced SUMO2 conjugation, a key functional modification for this master epigenetic regulator.

KAP1 multi-sumoylation drives its interactions with HP1 and the SETDB1 methyltransferase, allowing trimethylation of lysine 9 of histone H3 and transcription repression<sup>34,35,41</sup> (Fig. 3e). In mESCs, the KAP1 complex represses endogenous retroviruses (ERVs)<sup>40,43</sup>, and the SUMO pathway is essential for this silencing<sup>22,34</sup>. Using chromatin immunoprecipitation, we first observed that H3K9me3 was significantly less abundant at the 5' LTRs of MLV, IAPZ, EtnERV2, and MusD elements of the ERV1 and ERVK families in *Pml*<sup>-/-</sup> versus *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs (Fig. 4d). In contrast, PML-deficiency had little effect on H3K9me3 modification at the LINE-1 promoter or the MERVL LTRs (Fig. 4d), consistent with their indirect repression by KAP1 reported in refs. 44,45. Accordingly, ERV and LINE-1 transcripts were derepressed in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, as indicated by RT-qPCR quantification (Fig. 4e). Then, in RNA-sequencing (RNA-seq) analysis for Transposable Element (TE) multi-mapped reads<sup>46</sup>, we found 73 repeated elements miss-regulated more than 4-fold upon PML deficiency, 68 of which were upregulated (Fig. 4f and Supplementary Data 6), primarily KAP1-repressed ERVs and LINE-1. Altogether, these observations imply that PML contributes to silence TEs in mESCs, most likely through its regulation of KAP1 sumoylation and repressive activity. Supporting this view, MORC3, another PML-dependent SUMO2 target and KAP1 partner (Fig. 3e and Supplementary Data 5), is involved in endogenous retroviral epigenetic silencing<sup>47</sup>.

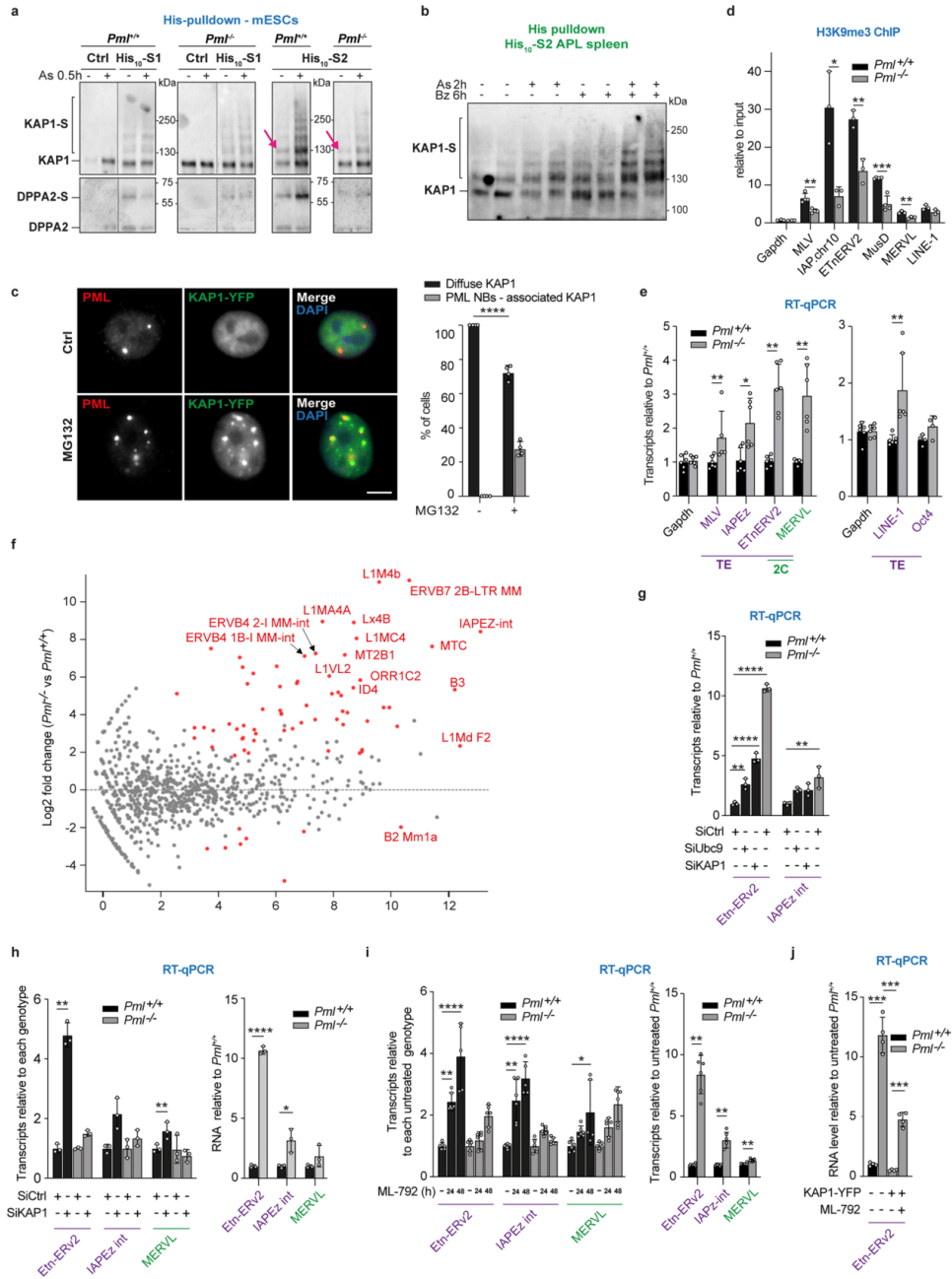
To strengthen the links between PML-driven KAP1-sumoylation and ERV repression, we first confirmed that down-regulation of UBC9

or KAP1 increased the expression of ERVK (Etn-ERV2 and IAPZ)<sup>40,48</sup>, similar to *Pml* knockout, although to a lesser extent (Fig. 4g and Supplementary Fig. 4c). To test whether the KAP1 complex is inactive in absence of PML due to defects in its sumoylation, we compared the effect of *Kap1* siRNA on ERVs in *Pml*<sup>+/+</sup> and *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs. While *Kap1* knockdown derepressed ERVs in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs, *Kap1* siRNA had no significant effect in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Fig. 4h). Similarly, sumoylation inhibition by the ML792 SUMO-activating enzyme poison increased ERVK in wildtype mESCs, while it had no effect in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Fig. 4i and Supplementary Fig. 4d). Finally, KAP1-YFP transduction in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs rescued ERVK repression (Fig. 4j and Supplementary Fig. 4f). This rescue was impaired when sumoylation was inhibited by ML792. Collectively these findings support the model that PML maintains ERV repression by controlling KAP1 sumoylation in mESCs.

#### PML opposes 2-cell like features of mESCs

Many TEs are transiently expressed in totipotent 2-cell (2C) embryos, but become repressed in pluripotent blastocysts (from which ESCs are derived). A fraction of mESCs oscillates in and out of a 2-Cell-Like (2CL) state, recapitulating some aspects of zygotic genome activation (ZGA), a process inhibited by the KAP1 complex. MERVL expression is a hallmark of 2CL transition<sup>49-51</sup> and was deregulated in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Fig. 4e and Supplementary Data 6). To investigate whether the loss of PML could also affect pluripotent to 2CL transition of mESCs, we compared transcriptomes of *Pml*<sup>-/-</sup> and *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs. Indeed, we found highly significant differential enrichment in the gene set encompassing both 2C- and 2CL-restricted transcripts<sup>49</sup> (Fig. 5a). The top upregulated genes in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs include key 2CL markers such *Zscan4*, *Eif1a* and *Eif1a*-like gene families (*Zscan4b-e*, *Gm2016*, *Gm5662*, *Gm4340*), as well as *Pwuil2* (Fig. 5b, Supplementary Fig. 4g and Supplementary Data 6). Expression of the *Dux* master activator, another hallmark of 2C embryos or 2CL mESCs<sup>50,51</sup>, was also upregulated in the absence of *Pml* (Fig. 5c). In contrast, transcripts of pluripotent markers, Nanog, Klf4 or Oct4 did not significantly change with *Pml* loss in our mESCs pool (Figs. 4f, 5g and Supplementary Data 6). Finally, *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs exhibited downregulation of MYC and oxidative phosphorylation pathways (Fig. 5d, Supplementary Fig. 4e and Supplementary Data 6), another feature of 2CL cells<sup>52,53</sup>. Collectively, PML appears to oppose the transcriptional 2CL program.

In addition to the KAP1 repressor, DPPA2 is a master positive transcriptional regulator of ZGA, upstream of *Dux*, both being required for the establishment of 2CL state<sup>45,50,54</sup>. Remarkably, the expression of *Mael* and *Prex2*, two *Dux*-independent targets of DPPA2<sup>45</sup>, were upregulated in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Supplementary Data 6 and Fig. 5c). The transcriptional activity of DPPA2 and its role to promote 2CL conversion are blocked by its sumoylation<sup>54,55</sup>. Critically, our mESC SUMO proteomic analysis identified both DPPA2 and DPPA4 as PML-dependent SUMO2 targets (Fig. 3f and Supplementary Data 5). We confirmed basal and arsenic-enhanced DPPA2 conjugation by His<sub>10</sub>-SUMO2 pull-down in *Pml*<sup>+/+</sup>, but not in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs (Fig. 5e, controls in Supplementary Fig. 4h). In contrast, His<sub>10</sub>-SUMO1 conjugation of DPPA2 was low, independent of *Pml*, and not modulated by arsenic, similar to that of KAP1 (Fig. 4a). Sumoylation inhibition by ML792 increased the DPPA2-target *Dux* and *Mael* transcripts in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs, while it had weaker or no effects in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, which have no basal DPPA2 sumoylation (Supplementary Fig. 4i). Thus, in addition to its role on KAP1 activation, PML may also maintain silencing of 2CL genes by controlling DPPA2 repressive sumoylation. Other PML-regulated SUMO2 conjugates identified by the mass spectrometry analyses, such as CHAF1a, ZMYM2, as well as the KDMSB H3K4me2/3 demethylase (Fig. 3e and Supplementary Data 2, 5), may also oppose 2CL transition<sup>51,56,57</sup>. To confirm that PML plays a role in the 2CL transition (in addition to mere proteomic/transcriptomic signatures), we assessed the number of mESCs with a 2CL feature by quantifying



ZSCAN4-positive and OCT4-negative cells<sup>58</sup>. Remarkably, these cells were significantly enriched in absence of *Pml* (Fig. 5f).

Ground state ESCs is obtained by triggering global DNA demethylation in 2i culture media with vitamin C<sup>59</sup>. In this setting, loss of *Pml* led to an even more drastic derepression of 2CL genes (Fig. 5g). Interestingly, *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs stopped growing and became

apoptotic when grown in 2i media, implying an essential role for PML in survival (Fig. 5h and Supplementary Fig. 4j). Collectively, these data establish a role for PML in restricting features of 2CL mESCs transition by enforcing SUMO2-conjugation of multiple positive (such as DPPA2) and negative (such as KAP1) master regulators.



**Fig. 4 | PML controls KAPI sumoylation leading to TE de-repression in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs.** **a** PML-dependent arsenic-enhanced S2-conjugation of KAPI and DPPA2 as in Fig. 2b (corresponding SUMO blots). Arrows indicate the baseline S2 adduct on KAPI. Representative data, *n* = 5 independent biological replicates. **b** Arsenic-increased sumoylation of KAPI in His<sub>10</sub>-S2 APL mice, stabilized by bortezomib pre-injection. PD *n* = 2 mice per condition; representative of two independent experiments (see Supplementary Fig. 4b for KAPI inputs and S2/3 conjugates). **c** Representative images of KAPI-YFP (green) localization overlapping with PML NBs (red) upon MG132 in HeLa cells, scale: 5µm (left). Percentage of cells with KAPI-YFP colocalization with PML NBs, *n* = 60 (untreated), 100 (MG132-treated) cells, Mean +/- SD of *n* = 4 independent biological replicates, \*\*\*\**p* < 0.0001 Two-tailed unpaired Student's *t*-test (right). **d** ChIP analysis showing decrease of the H3K9me3 mark at the promoter regions (LTRs or 5') of the indicated TEs in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs. Mean +/- SD of *n* = 4 biological replicates, relative to inputs and normalized on actin gene, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 two-tailed unpaired Student's *t*-test. Representative of *n* = 3 independent experiment. **e** Fold increase in the indicated TE transcripts, Mean +/- SD of *n* = 6 biological replicates from three independent experiments (right), normalized on actin and relative to paired values in *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, \*\*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001, two-tailed unpaired Mann-Whitney *t*-test.

Representative of two CrispR/Cas9-generated *Pml*<sup>-/-</sup> mESC clones. **f** MA-Plot of the RNAseq multireads analysis comparing *Pml*<sup>-/-</sup> to *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, showing increased TE expression. Red dots highlight significant TEs with >4 fold difference (see also Supplementary Data 6). **g** Fold change of the indicated ERV transcripts normalized on GAPDH, relative to siRNA Ctrl (Scr)-transfected *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, Mean +/- SD of *n* = 3 biological replicates \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\*\**p* < 0.0001, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. **h** Fold change of the indicated ERV transcripts in siKAPI-transfected mESCs related to their Ctrl (siRNA Scr) mESCs (left), fold changes in *Pml*<sup>-/-</sup> related to *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs are indicated (right), Mean +/- SD of *n* = 3 biological replicates, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\*\**p* < 0.0001, two-tailed unpaired Welch's test. **i** Fold change of the indicated ERV transcripts in *Pml*<sup>-/-</sup> and *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs treated or not with 1µM ML792 for 24 h or 48 h, Mean +/- SD of *n* = 6 biological replicates, one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test (left); fold changes in *Pml*<sup>-/-</sup> related to *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs are indicated, two-tailed unpaired Mann-Whitney *t*-test, \*\**p* < 0.01 (right). **j** Fold increase of Etn-ERV2 in *Pml*<sup>-/-</sup> expressing KAPI-YFP and treated or not with ML792, normalized to GAPDH and are relative to untreated *Pml*<sup>-/-</sup>. Mean +/- SD, \**p* < 0.05, two-tailed unpaired Welch's *t*-test. **g-j** Representative of three independent SD of *n* = 4 biological replicates experiments. Source data are provided as a Source Data file.

## Discussion

The abundance and integrity of PML NBs are challenged in a variety of physio-pathological conditions, ranging from oxidative stress to cancer or viral infections. The actual biochemical role of PML NBs was debated due to their pleiotropic biological activities and to the functional diversity of the one-by-one identified partner proteins. The formation of PML NBs is regulated by both the abundance of PML (depending on stem cell status, interferon or P53 signaling) and its oxidative stress-responsive dynamics, as explored with arsenic. Here, we formally demonstrate that PML NBs drastically enhance partner SUMO2 conjugation upon stress, subsequently regulating their stability *ex vivo* or *in vivo*. When PML is abundant, NBs may even facilitate conjugation in baseline conditions, as demonstrated for DPPA2 or KAPI in mESCs, controlling partner functions (Fig. 6). From yeast to human, sumoylation plays a critical role in adaptive stress responses<sup>24,60</sup>. Distinct from earlier studies<sup>61,62</sup>, our differential SUMO-proteomic evaluates stress responses *in vivo*, and identifies novel PML NB targets. Mechanistically, our data suggest that ROS-triggered cysteine-rich PML shells<sup>4,8</sup> may protect UBC9 from oxidation, although experiments identifying the impact of PML shells upon UBC9 oxidation and function would be required for formal demonstration *in cellulo*. While PML is not a bona fide SUMO-E3 ligase, our results support a model in which liquid-like condensates immobilize active enzymes and their substrates, to facilitate post-translational modifications of low abundance regulatory proteins<sup>63,64</sup>. In particular, PML NBs increase UBC9 processivity, enabling stress-induced global poly-SUMO2 modifications and proteasome degradation of partners<sup>16,17,65</sup> (Figs. 1 and 2). Other NB-associated UBC9 activators (PIAS, ARF) may further enhance PML NBs activity<sup>66-68</sup>. Furthermore, by sequestering SUMO1 or 2 away from the rest of the nucleoplasm (Supplementary Figs. 1a, 2e-f), PML NBs may also decrease their availability (together with that of UBC9) for non-NB-associated substrates, contributing to change of the spectrum of SUMO targets. In arsenic-treated APL mice, kinetic changes in the spectrum of SUMO targets suggest that the localization of PML - initially in close proximity to chromatin and later in reorganized NBs - may determine partner selectivity. Interestingly, our study unraveled number of putative RARA partners (KAPI, Polycomb), which undergo PML-facilitated sumoylation upon arsenic, suggesting that they may also be associated with PML/RARA. These key repressor complexes could thus contribute to PML/RARA-mediated gene silencing. Given its multiple roles, the KAPI complex could enforce leukemogenesis through PML/RARA-driven target gene silencing, but later contribute to therapy-induced PML/p53-mediated senescence<sup>35,69</sup>. Beyond APL, PML-facilitated KAPI repressive functions may actually contribute to senescence, viral latency<sup>70,71</sup> or cancer stem cell

biology<sup>13,72,73</sup>. The proposed PML roles in the regulation of chromatin status at specific loci may also involve KAPI and/or SUMO2/3 conjugation<sup>74-76</sup>.

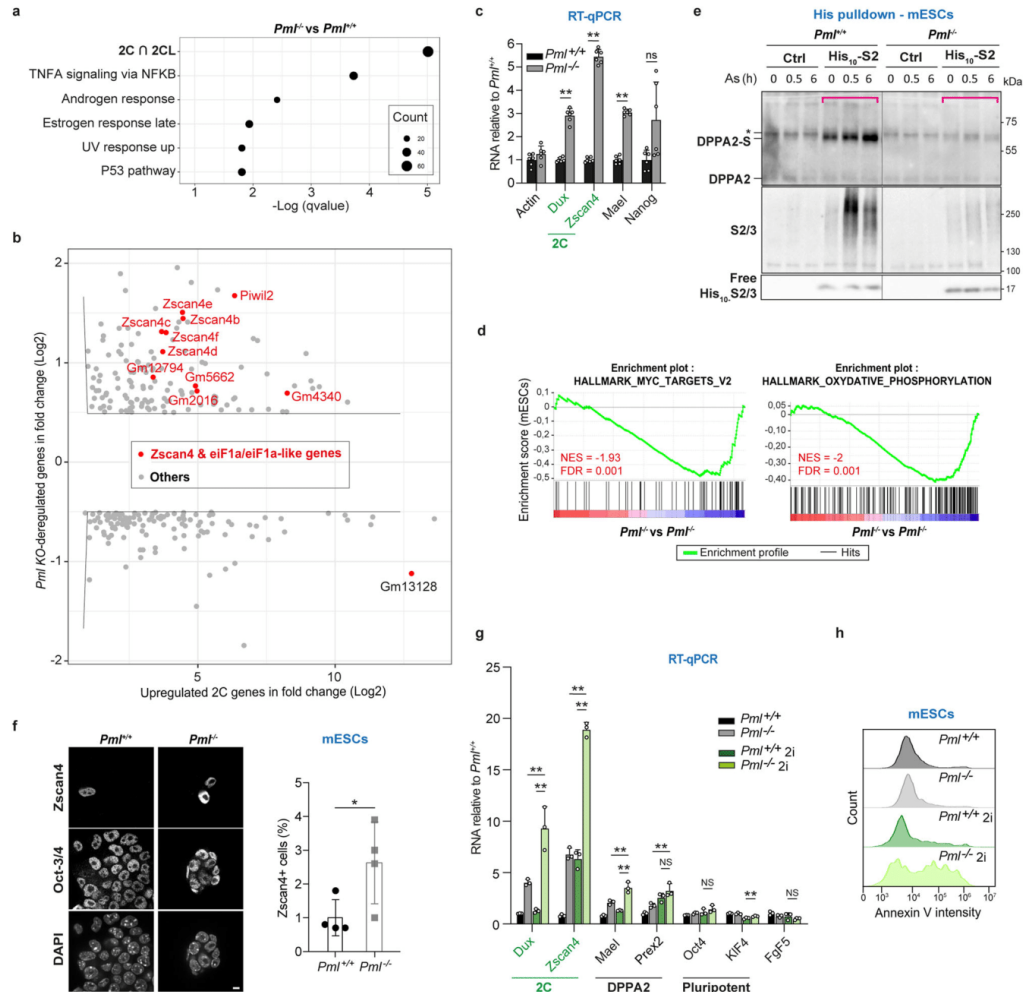
Sumoylation sustains epigenetic repression in mESCs, contributing to repression of both ERVs and 2CL program<sup>22,34,77</sup>. The PML-dependent control of TE expression unraveled here could explain basal activation of interferon signaling in multiple types of *Pml*<sup>-/-</sup> cells<sup>78,79</sup> (our unpublished data). Precisely ordering the events controlling 2CL transition is currently under active investigation, in particular regarding DUX/ZSCAN4 and MERLV contributions<sup>49,51,56,80</sup>. By coordinating the action of various repressors and activators through orchestration of their SUMO2 conjugation, PML NBs oppose mESC 2CL-like features and TE expression (Fig. 6). More broadly, enhancement of partner sumoylation is likely a common mechanism through which PML NBs exert their pleiotropic effects to orchestrates cell fate, adaptive responses or proteostasis.

## Methods

### Cell culture and transduction

Mouse ESCs E14tg2a were obtained from 129/Ola blastocyst mice (P. Navarro (Pasteur Institute, Paris, France) and cultured in DMEM (Gibco, #41966029) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), 1% non-essential amino acid (Gibco, #11140050), 1% Glutamax (Gibco, #35050-038), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, #10378016), 1000 units/ml of recombinant Leukemia Inhibitory Factor (LIF, Interchim, #8V6280) and 0.1% β-mercaptoethanol (Merck, #M6250) on gelatin-coated plates. Ground-state mESCs were grown in serum-free 2i medium (half NeurobasalGibco, #21103049) and DMEM/F-12 (Gibco, #11320033) supplemented with 0.5% N2 (Gibco, #17504048) and 1% B27 supplement (Gibco, #17504044), 1% Glutamax (Gibco, #35050-038), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, #10378016), 0.2 mg/ml BSA (ThermoFisher, #AM2616), 0.01% Monothioglycerol (Sigma, #M6145), 10000 units/ml LIF (Merck, #8V6280), 0.1% inhibitor cocktail (Merck, #PD0325901 & CHIR99021) and 1% Vitamin C (Sigma, #A4403). MEF (our laboratory), HeLa (ATCC), and Plat-E (Lavau C, USA) cells were grown in DMEM GlutaMAX (Gibco) supplemented with 10% FCS. All cells lines used were negative for mycoplasma (tested by Eurofins MWG France once a month) and were manipulated separately to avoid any cross contamination during cell passages. *Pml*<sup>-/-</sup> cells were regularly checked for the absence of PML by IF or WB. No Karyotype was performed.

APL cells or mESCs were transduced using retroviruses produced by Plat-E packaging cells, after transfection with MSCV-IRES-GFP constructs expressing His<sub>10</sub>-SUMO1 or 2 paralogs (Effecten reagent, Qiagen, #301425). GFP-positive cells with similar and weak fluorescent



**Fig. 5 | PML is required for 2CL transition and DPPA2 sumoylation in mESCs.** **a** GSEA gene-set term enrichment analysis of the transcripts deregulated in *Pml*<sup>-/-</sup> vs *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs from microarray analysis; 2C ∩ 2CL geneset: transcripts common to 2C embryo and 2CL cells from (ref. 49). **b** Transcripts de-regulated in *Pml*<sup>-/-</sup> vs *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs, related to upregulated genes in 2C embryo vs oocytes<sup>10</sup>. Transcripts with significant changes (gray) and key 2CL genes (red) are shown from microarray analysis (Supplementary Data 6). **c** Mean fold increase of the indicated 2CL transcripts and *Mael* as a direct target of DPPA2 (qRT-PCR) *n* = 6 independent biological replicates, normalized on *gapdh* and relative to values in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs, +/-SD, \*\**p* < 0.01, two-tailed unpaired Mann-Whitney test. Representative of the three Crispr/Cas9 *Pml*<sup>-/-</sup> clones. **d** GSEA analyses of RNAseq from *Pml*<sup>-/-</sup> vs *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs unraveling Myc targets and Oxidative phosphorylation as the top two altered

pathways (Supplementary Data 6). **e** PML-dependent arsenic-induced S2-conjugation of DPPA2, PD from the indicated mESCs. Inputs in Supplementary Fig. 4h. Representative data, *n* = 5 independent biological replicates. **f** Representative image (left) and percentages of Zscan4+ cells (right), increased among *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, mean ± SD, *n* = 4 independent experiments; total of 400 (left) and 3000 (right) nuclei from *n* = 4, \**p* < 0.05, unpaired two-tailed Student's *t*-test. **g** Mean fold change of the indicated 2CL transcripts, DPPA2 target and pluripotency genes from the indicated mESCs exposed or not to 2i medium. *n* = 3 independent biological replicates, normalized on *gapdh* and relative to unpaired values in *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs, +/-SD, \*\**p* < 0.01, two-tailed unpaired Mann-Whitney *t*-test. **h** FACS analysis to quantify Annexin V staining in *Pml*<sup>-/-</sup> vs *Pml*<sup>+/+</sup> mESCs exposed or not to 2i medium. Representative *n* = 3. Source data are provided as a Source Data file.

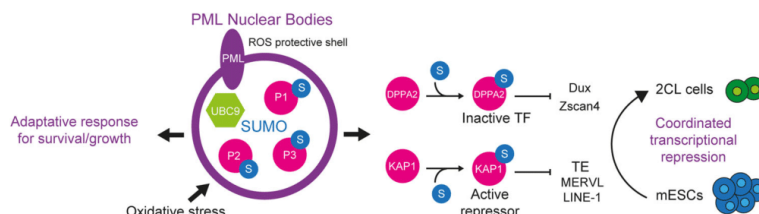
signals were sorted by flow cytometry. HeLa and mES cells were transfected with pBOS-KAP1-YFP plasmid using lipofectamine 2000 (Invitrogen, #11668019) and Lipofectamine 3000 (Invitrogen, #L3000001), respectively. KAP1-YFP positive mESCs were selected using 6 μg/ml bastacidin (Thermo Fischer #R21001); and YFP+ living cells were analyzed and sorted by flow cytometry (BD FACS Aria2, v9.0.1), after FCS/SSC gating.

Cells were treated with 1 μM As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Sigma, #01969), 1 μM retinoic acid (Sigma, # R2625), or 1 μM ML792 (Medchemtronica # HY-108702) when requested.

**CRISPR/Cas9 knockout mESCs**

To knockout *Pml*, a single guide RNA targeting *Pml* exon 1 (Supplementary Data 7) was subcloned into the pSpCas9 (BB)-2A-Puro





**Fig. 6 | Functional impact of PML NB-facilitated sumoylation.** PML NBs enhance the sumoylation of partner proteins (in pink). Through control of their sumoylation, PML coordinates the activity of KAP1 and DPPA2, orchestrating the inhibition

of 2CL features. These key regulators of mESC fate silence ERVs and 2CL genes. Depending on the cell environment, PML NBs may also drive an adaptative stress response.

plasmid (pX459v2, Addgene), and transfection of mESCs was performed using lipofectamine 3000 (Invitrogen, #L3000001). Puromycin-resistant colonies were expanded and three clones deficient for *Pml* were chosen after DNA sequencing and Western blot analysis.

#### siRNA transfection

Mouse ESCs were transfected with siRNA (Dharmacon, Supplementary Data 7) with Lipofectamine 3000 (Invitrogen, #L3000001) according to the manufacturer's standard recommendation, and analyzed after 3 days.

#### Mouse models and treatments

Animals were handled according to the guidelines of institutional animal care committees using protocols approved by the "Comité d'Ethique Experimentation Animal Paris-Nord" (no. 121). Mice were maintained in a 12 h light-dark cycle animal facility under specific pathogen-free conditions with free access to water and food (A03: SAFE; Institut de Recherche Saint Louis, Paris, France).

*His<sub>6</sub>-HA-Sumo1* knock-in mice deficient for *Pml* were obtained after backcrossing of 129/sv *Pml*<sup>-/-</sup> mice (Pier Paolo Pandolfi, USA) with C57Bl/6 *His<sub>6</sub>-HA-Sumo1* knock-in mice (Nils Brose, Netherlands) for seven generations. Genotyping was performed by multiplex PCR using specific primers to distinguish *Pml*<sup>-/-</sup> (660 bp) from *Pml*<sup>+/-</sup> (443 bp) and tagged *Sumo1* (210 bp) from endogenous *Sumo1* (163 bp).

*Pml*<sup>E167R/E167R</sup> mice were obtained by CRISPR/Cas9 genome edition, performed on BALB/cByJ zygotes, using TAKE methods<sup>81</sup>. Briefly, three to four-week-old BALB/cByJ females were super ovulated using CARD HyperOva (Cosmo bio, #KYD-010-EX) and human Chorionic Gonadotropin, Sigma; #CG-10) and then mated with males (8–20 weeks) to get zygotes. crRNA, TracrRNA, ssDNA, and Cas9 nuclease were purchased from IDT and electroporated (NEPA21; Sonidal) to introduce *Pml* point mutation encoding E167R substitution (Supplementary Data 7). Genotyping performed as described above and PCR products were sequenced (Supplementary Data 7). BALB/c *Pml*<sup>E167R/E167R</sup> mice were then crossed with C57Bl/6 *Sumo1*<sup>HIS6-HA/HIS6-HA</sup> mice to obtain *Pml*<sup>E167R/+</sup>;*Sumo1*<sup>HIS6-HA/WT</sup> heterozygote mice.

For APL mouse model, leukemic blasts of derived from h-MRP8-*PML/RARA* transgenic mice<sup>82</sup> were transduced with MSCV-IRES-EGFP-*His<sub>10</sub>-SUMO2* or *His<sub>10</sub>-SUMO2K/R* and transplanted by intravenous (i.v.) injection into FVB mice. Serial i.v. transplantations were performed using 10<sup>4</sup> GFP+ sorted APL cells from bone marrow.

7–8 week-old age and sex-matched mice were used for all experiments; treatments with arsenic (5 µg/g, Sigma, #202673), pl: C (20 µg/g, invivogen, #tlrl-picw), or Bortezomib (1 mg/g, CliniSciences, #A10160-25) administered by intraperitoneal (i.p.) injection. Control mice were from Charles River or APL mice (untransduced blasts), same age, sex and substrains. The number of animals used are indicated in the figure legends.

#### Constructs

Coding sequences for *His<sub>10</sub>-SUMO1*, *His<sub>10</sub>-SUMO2*, or all-lysine to arginine *His<sub>10</sub>-SUMO2* mutant (*His<sub>10</sub>-SUMO2K/R*) were PCR amplified from MSCV-HA-SUMO1 or pLV-*His<sub>10</sub>-SUMO2-Q87R* or pVL-*His<sub>10</sub>-SUMO2-allKR-Q87R* constructs<sup>3,27</sup> and cloned into MSCV-IRES-EGFP retroviral vector. *His<sub>10</sub>*-encoding adaptor was cloned into MSCV-SUMO1-IRES-GFP for *His<sub>10</sub>-SUMO1* construct (Supplementary Data 7). For MSCV-GRX1-roGFP2-SP100 construct, pGRX1-roGFP2 plasmid was used to insert GRX1-roGFP (Meng-Er Huang, Curie Orsay, France) into pMSCV-SP100 construct<sup>8</sup>. For pBOS-KAP1-YFP plasmid, KAP1 was PCR amplified from pEGFP-KAP1 (Addgene, #45568) and inserted in place of PMLIII into pBOS-PMLIII-YFP plasmid.

#### IncuCyte cell proliferation assay

To monitor cell growth upon arsenic, 5000 mESCs were seeded in triplicates on 96-well plates and analyzed with the IncuCyte live-cell imaging system (Essen). Four images per well were acquired with a 10× objective every 2 h for a period of 2–5 days. Sequential images were then analyzed using IncuCyte software.

#### Immunofluorescence and Glutathione redox potential assay

Cells were fixed in PFA 3.7% (Sigma, #HT5011) for 15 min and permeabilized in PBS 0.2% Triton X-100 for 15 min. For frozen mouse liver, 10 µm sections were fixed for 15 min in PFA 3.7% and permeabilized in PBS 0.2% Triton-X100 for 15 min at RT. Incubation with primary or secondary antibodies was performed in PBS 0.2% Triton X-100 and 1% BSA for 2 h before staining with DAPI for 3 min. Primary antibodies: anti-Daxx (1/1000; cat#7152, Santa-cruz), anti-Oct4 (1/1000; Cat#Sc5279, Santa-Cruz), anti-PML(1/2000; Cat#MAB3738, Millipore), anti-SUMO-1 (1/1000; Cat#Ab3875, Millipore), anti-SUMO-2 (1/1000; Cat#Ab81371, Abcam), anti-UBC9 (1/1000; Cat# 610749, BD sciences), anti-Ubiquitin (1/1000; Cat#BML-PW8810, Enzo), anti-Zscan4 (1/1000; Cat# AB4340, Millipore). Secondary antibodies: anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (1/200; Cat#A-11034, Sigma), anti-Mouse Alexa Fluor 594 (1/200; Cat#A-115-585-003, Jackson ImmunoResearch), anti-Rabbit Alexa Fluor 647 (1/200; Cat#A-111-605-003; Jackson ImmunoResearch). Proximity ligation assay was performed as previously described<sup>9</sup> with anti-E4BP4/NFIL3 (1/1000; Cat# 14312, Cell signaling), anti-PML(1/2000; Cat#MAB3738, Millipore) and anti-MORC3 (1/1000; Cat#NBPI-83036, Biotechne) antibodies. Image acquisitions were done by confocal microscopy (Spinning disk (CSU-WI, Yokogawa) and LSM 880 (Zeiss)) or by using an Axiovert-200 inverted-fluorescence microscope (Zeiss). Images were analyzed with Fiji software.

MEFs stably expressing GRX1-roGFP2 or GRX1-roGFP2-SP100 redox sensors were seeded in glass-bottom µ-dish (Biovalley). Measurement of the glutathione redox potential was performed by confocal microscopy analysis (Spinning disk (X1/TIRF) using 405-nm and 488-nm lasers. Ratios between quantified oxidized-405nm and reduced-488 nm forms of GRX1-roGFP2-SP100 were calculated within

regions of interest or the whole cell. Normalization was performed using 100  $\mu$ M diamide (Sigma, #D3648) and 5 mM DTT (Sigma, #D0632) treatments to determine the maximal and minimal oxidation capacities of the GRX1-roGFP2 sensor.

#### Western blot and His pulldown

Whole-cell extracts were obtained from bone marrow, APL spleen, or cell lines, after washed in PBS 1 $\times$ , by lysis and sonication in 2 $\times$  Laemmli buffer (Sigma, #S3401). Frozen mouse livers were first homogenized using Tissuelyser II (Qiagen), lysed in 1 $\times$  Laemmli buffer and processed as above. 10–20  $\mu$ g of proteins were loaded for SDS-PAGE on 4–12% or 4–20% NuPAGE Bis-Tris gels (Life Technology) and transferred to nitrocellulose membranes. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C and secondary antibodies 1 h at room temperature (RT). Antibodies used: anti-Actin (1/5000; Cat#A2066, Sigma), anti-DDPA2 (1/1000; Cat#MAB4356, Millipore), anti-HA (1/1000; Cat#901501; Bio-Legend), anti-MBP (1/1000; Cat#M3221; Sigma), anti-PML(1/1000; Cat#MAB3738, Millipore); anti-SUMO-1 (1/1000; Cat#AB3875, Millipore); anti-SUMO-2 (1/1000; Cat#Ab81371, Millipore), anti-TRIM28/Kap1 (1/1000; Cat#4124; Cell signaling), anti-UBC9 (1/1000; Cat#610749, BD Biosciences), anti-Ubiquitin (1/1000; Cat#BML-PW8810, Enzo); Secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch: anti-Mouse-HRP (1/5000; Cat#115-035-062), anti-Rabbit-HRP (1/5000; Cat#111-035-045). Proteins were detected using Dura ECL or Super Signal West Femto (ThermoFisher), using Vilber Fusion-Fx (BIO-ID v15.07). Quantifications of proteins of interest (as indicated in the figures) were relative to loading control. All uncropped blots are provided within the Source Data file.

For His<sub>6</sub>-HA-SUMO1 purification, frozen livers were homogenized as above and lysed with 6 M guanidine-HCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 10 mM imidazole pH 8.0 and boiled at 95 °C for 5 min. After sonication, the protein concentration was determined using <sup>125</sup>I-BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, #23225). Lysates were equalized and His<sub>6</sub>-HA-SUMO1-conjugates were enriched on nickel-nitrilotriacetic acid (NiNTA) agarose beads (Qiagen, #L30210) as described in<sup>15</sup>. For dual purifications, the samples were then diluted with RIPA buffer, 0.4% NaDoc, 1% NP 40, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, pH 7.5, 20 mM NEM (Sigma, #E3876), PIC (Proteases Inhibitor Cocktail, Roche, #11836170001). Anti-HA immunoprecipitation was additionally performed when indicated. Samples were incubated at 4 °C ON with anti-HA Affinity Matrix (Sigma, #11815016001), SUMO targets were eluted with HA peptide (Sigma, #11666975001). Pulldown of His<sub>10</sub>-SUMO conjugates from APL cells or mESCs at small scale was performed as above with wash buffers containing 50 mM Imidazole. His<sub>6</sub>-MBP recombinant protein was added to the samples as an internal control of the pulldown step efficacy, when possible.

For large-scale purification of His<sub>10</sub>-SUMO2 conjugates from APLs, leukemic mouse spleens (with >70% of GFP+ leukemic cells) were dissociated in culture medium and washed in PBS. For SUMO proteomics in mESCs, around 200 million (GFP+) mESCs and four replicates for each condition were used. His<sub>10</sub>-SUMO2 conjugates were purified as described in<sup>27,83</sup>. Briefly, cells were either lysed with Laemmli buffer as inputs or stored as dry frozen pellets. Guanidine lysis buffer (above) was added to frozen pellets for sonication and protein concentration was assessed using BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, #23225). Lysates were equalized for protein concentration and incubated with NiNTA agarose beads (Qiagen, #L30210) for O/N. Beads were washed using buffer 1 with 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.1% de Triton X-100), buffer 2 (8 M urea, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 10 mM Tris pH 8.0, 10 mM imidazole pH 8.0, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol and 0.1% Triton X-100), buffer 3 (8 M urea, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.3, 10 mM Tris pH 6.3, 10 mM imidazole pH 7.0 and 5 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol) and with buffer 3 without imidazole. Samples were eluted in 7 M urea, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris pH 7.0 and 500 mM imidazole

pH 7.0. Eluates were passed through pre-washed 0.45 $\mu$ m filter columns (Millipore) to remove any residual beads and subsequently concentrated on pre-washed 100 kDa cut off filters (Sartorius). Sample volume were equalized to 50  $\mu$ L (5% of the samples were used as pulldown control for Western blots analysis) and digested by LysC (Wako, #129-02541) and Trypsin (Promega, # V5111), and acidified using 2% TCA (Sigma, # T1647). Peptide samples were loaded on C18 StageTips and dried using vacuum.

#### Mass spectrometry data acquisition

Both His<sub>10</sub>-SUMO conjugates were processed by mass spectrometry analyses in Alfred Vertegaal laboratory (LUMC, Netherland). All the experiments were performed on an EASY-nLC 1000 system (Proxeon, Odense, Denmark) connected to a Q-Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Germany) through a nano-electrospray ion source as previously described<sup>18</sup>. The Q-Exactive was coupled to a 15 cm analytical column with an inner diameter of 75  $\mu$ m, in-house packed with 1.9  $\mu$ m C18-AQ beads (Reprospher-DE, Pur, Dr. Manish, Ammerbuch-Entringen, Germany). The gradient length was 120 min from 2 to 95% acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of 200 nL/minute. For the samples from cohort 2 and 3, two technical repeats were performed and the mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode with a top 5 method. Full-scan MS spectra were acquired at a target value of  $3 \times 10^6$  and a resolution of 70,000, and the Higher-Collisional Dissociation (HCD) tandem mass spectra (MS/MS) were recorded at a target value of  $1 \times 10^5$  and with a resolution of 17,500 with a normalized collision energy (NCE) of 25%. The maximum MS1 and MS2 injection times were 20 and 250 ms, respectively. The precursor ion masses of scanned ions were dynamically excluded (DE) from MS/MS analysis for 20 s. Ions with charge 1, and >6 were excluded from triggering MS2 analysis. For cohort 1, the mass spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode with a top 7 method, two independent technical repeats were performed. Full-scan MS spectra were acquired at a target value of  $3 \times 10^6$  and a resolution of 70,000, and the Higher-Collisional Dissociation (HCD) tandem mass spectra (MS/MS) were recorded at a target value of  $1 \times 10^5$  and with a resolution of 35,000 with a normalized collision energy (NCE) of 25%. The maximum MS1 and MS2 injection times were 20 and 120 ms, respectively. The precursor ion masses of scanned ions were dynamically excluded (DE) from MS/MS analysis for 60 s. Ions with charge 1, and >6 were excluded from triggering MS2 analysis.

#### Mass spectrometry data analysis

All RAW data were analyzed using MaxQuant (version 1.5.3.30) according to ref. 84. We performed the search against an in silico-digested UniProt reference proteome for *Mus musculus* (24 March 2016) and the human PML/RARA protein.

Database searches were performed with Trypsin/P, allowing four missed cleavages. Oxidation (M) and Acetyl (Protein N-term) were allowed as variable modifications with a maximum number of 5. Match between runs was performed with 0.7 min match time window and 20 min alignment time window. The maximum peptide mass was set to 5000. Label-Free Quantification was performed using the MaxLFQ approach, not allowing Fast LFQ<sup>85</sup>. Instrument type was set to Orbitrap.

Protein lists generated by MaxQuant were further analyzed by Perseus (version 1.5.5.3)<sup>86</sup>. Proteins identified as common contaminants were filtered out, and then all the LFQ intensities were log2 transformed. Different biological repeats of the experiment were grouped and only protein groups identified in all biological replicates in at least one group were included for further analysis. Missing values were imputed using Perseus software by normally distributed values with a 1.8 downshift (log2) and a randomized 0.3 width (log2) considering whole matrix values.

Proteins were considered to be SUMO2 targets when the difference between His<sub>10</sub>-SUMO2 APL samples and their respective (Ctrl)



APL control samples were statistically significant for  $p < 0.05$  (t-test) and larger than +0.7 (log2). Thus, total SUMO targets identified in each cohort were obtained by adding specific targets found in His<sub>10</sub>-S2 APL vs Ctrl APL mice and arsenic-treated His<sub>10</sub>-S2 APL vs arsenic-treated Ctrl APL mice. Then, we excluded proteins which total amount might increase upon arsenic, based on their increase upon arsenic in the Ctrl APL background, by comparing LFQ FC in Ctrl APL mice treated or not with arsenic.

We used a similar strategy for His<sub>10</sub>-S2 mESCs and Ctrl mESCs, with *Pml*<sup>+/+</sup> or *Pml*<sup>-/-</sup> genotypes, treated with 2 h of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 μM. We selected proteins as being SUMO2 targets when the difference between His<sub>10</sub>-SUMO2 mESCs samples and their respective Ctrl mESC samples (with the same genotype) was statistically significant for  $p < 0.05$  (FDR) and larger than +0.7 (log2).

Comparison with PML interactant was made using the Biogrid database [<https://thebiogrid.org/111384/summary/homo-sapiens/pml.html>]

### Chromatin immunoprecipitation

ChIP was performed with the iDeal ChIP-qPCR kit (Diagenode, #C01010180) according to the recommendation of the manufacturer. Briefly, mESC cells were crosslinked in 1% formaldehyde (Euromedex, #EM-15686) for 15 min at room temperature and quenched with 0.12 M glycine provided in the kit. The extracted chromatin was sonicated with a Bioruptor Pico (Diagenode) and immunoprecipitation was performed using 1 μg of an anti-H3K9me3 (Abcam, #ab8898) and 1 μg of a rabbit IgG-isotype (Diagenod, #C15410206) control antibody. Eluted DNA was quantified by real-time PCR on a Roche LightCycler by using FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, #4913850001) with the set of primers listed in Supplementary Data 7. Data were normalized with respect to percentage of input and correspond to the mean ± SD from at least three replicates.

### RNA preparation and quantitative RT-PCR

Total RNA extraction from mESCs was performed with the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, #74134) with an additional in-column DNase treatment. RNA was quantified using a Nanodrop One-One (ThermoFisher) before cDNA amplification or RNA seq libraries preparation. cDNA were prepared from 1 μg of total RNA with a Maxima First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher, #1641) including an additional step of DNase treatment before reverse transcription. Quantitative real-time PCR on cDNA was then performed as described for ChIP experiment. Expression levels were normalized to endogenous *Actin* or *Gapdh* gene as indicated.

### RNA sequencing

Quality control of purified RNA was performed using a 2100 BioAnalyzer (Agilent). Sequencing libraries were prepared with 800 ng of total RNA by using TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Gold Prep kit (Illumina, #20020598) allowing depletion of cytoplasmic and mitochondrial rRNA. Briefly, after reduction of rRNA with target-specific oligos combined with Ribo-Zero rRNA removal beads, purified RNA was then fragmented and sequentially reverse-transcribed with random primers into double-stranded cDNA fragments. After adapter ligation, cDNA fragments were enriched by PCR to obtain barcoded libraries size-selected with AMPureXP beads (Beckman Coulter, #A63881). Quantification and quality control of each library was assessed by using a 2100 Bioanalyzer. Final libraries were then normalized and pooled in equal molar concentration for 75 bp single-end sequencing with an Illumina NextSeq 550.

### RNA-SEQ mapping

The sequencing reads raw data (FASTQ) were submitted to quality check and were trimmed for Illumina adapters sequences and low-quality bases using Trim Galore (version 0.4.5 with default

parameters, [[http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim\\_galore/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/)]). Trimmed read pairs (>35 bp) were mapped to mouse reference genome (mm10 [[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001635.20/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001635.20/)]) using STAR<sup>87</sup> aligner (version 2.5.2b) with maximum multiple alignments of no more than 100, using the variables *-winAnchorMultimapNmax 100* and *-outFilterMultimapNmax 100*. From BAM files, Tetranscripts<sup>88</sup> (version 2.0.3) was used to quantify both gene (uniquely aligned reads only) and transposable element transcript abundances (including both unique- and multi-aligned reads). The differential expression analysis was done by using the DESeq2 package<sup>89</sup> for modeling the counts data with a negative binomial distribution and computing adjusted *P*-values. For the comparative analyses (*Pml*<sup>-/-</sup> versus WT), only genes with both FC > 2 and FDR < 0.05 were considered as differentially expressed.

### Microarrays transcriptomic data analysis

Total RNA was extracted from mESCs as described for RNA sequencing analysis. Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Mouse Transcriptome Assay 1.0 (MTA 1.0) was used to perform gene expression analysis on 3 *Pml*<sup>-/-</sup> and 3 *Pml*<sup>+/+</sup> mESC samples. Background correction, probe set signal integration, and quantile normalization were performed through Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm, as implemented in the “R” Affymetrix package. Genes whose abs(log<sub>2</sub>(fold-change)) between comparative group was ≥ 0.5 (with a *p* value cut-off of < 0.1) were selected. In addition, false discovery rate (FDR) was applied for multiple hypotheses testing using Benjamini-Hochberg correction. Genes with a FDR-adjusted *p* value (adjusted *p* value) ≤ 0.05 were finally accepted. Biological gene-pathway changes were scored using the Gene Set Enrichment Analysis algorithm (GSEA) using hallmark signature database (MSigDB, [<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/>]). A custom specific 2C∩2CL pathway was used based on<sup>49</sup> for transcripts restricted to both 2-cell embryo and 2CL cells.

### Statistical analysis

The number of independent experimental replications is indicated in the legends. Statistical analyses of mean and standard deviation were performed with Prism 7 (GraphPad Software) as well as Student's *t*-test, Welch or Wilcoxon Mann-Whitney tests; FDR for multiple hypotheses testing using Benjamini-Hochberg correction, as indicated.

### Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

### Data availability

The SUMO proteomic data generated in this study have been deposited in the ProteomeXchange Consortium, PRIDE<sup>90</sup> partner repository database, for APL data under the accession number PXD019609; for the mESCs data under the accession number PXD028865. The RNA seq data generated in this study have been deposited the EMBL-EBI database [<https://www.ebi.ac.uk/>] under the accession number E-MTAB-10153 and Affimetrix Microarrays transcriptomic data under the accession number E-MTAB-10151. Source data are provided with this paper.

### References

- Lallemand-Breitenbach, V. & de Thé, H. PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **52**, 154–161 (2018).
- Hsu, K. S. & Kao, H. Y. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci.* **8**, 5 (2018).
- de Thé, H., Pandolfi, P. P. & Chen, Z. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for oncoprotein-targeted cure. *Cancer Cell* **32**, 552–560 (2017).

4. Niwa-Kawakita, M. et al. PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J. Exp. Med.* **214**, 3197–3206 (2017).
5. Guo, S., Cheng, X., Lim, J. H., Liu, Y. & Kao, H. Y. Control of anti-oxidative response by the tumor suppressor protein PML through regulating Nrf2 activity. *Mol. Biol. Cell*, <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0692> (2014).
6. Zhu, J. et al. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 3978–3983 (1997).
7. Lallemand-Breitenbach, V. et al. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumoylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As(2)O(3)-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* **193**, 1361–1372 (2001).
8. Jeanne, M. et al. PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell* **18**, 88–98 (2010).
9. Sahin, U. et al. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J. Cell Biol.* **204**, 931–945 (2014).
10. Ito, K. et al. A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/nm.2882> (2012).
11. Martin-Martin, N. et al. Stratification and therapeutic potential of PML in metastatic breast cancer. *Nat. Commun.* **7**, 12595 (2016).
12. Guarnerio, J. et al. A non-cell-autonomous role for Pml in the maintenance of leukemia from the niche. *Nat. Commun.* **9**, 66 (2018).
13. Amodeo, V. et al. A PML/slit axis controls physiological cell migration and cancer invasion in the CNS. *Cell Rep.* **20**, 411–426 (2017).
14. Hadjimihael, C. et al. Promyelocytic leukemia protein is an essential regulator of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rep.* **8**, 1366–1378 (2017).
15. Sun, H., Levenson, J. D. & Hunter, T. Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins. *EMBO J.* **26**, 4102–4112 (2007).
16. Lallemand-Breitenbach, V. et al. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* **10**, 547–555 (2008).
17. Tatham, M. H. et al. RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.* **10**, 538–546 (2008).
18. Kumar, R., Gonzalez-Prieto, R., Xiao, Z., Verlaan-de Vries, M. & Versteeg, A. C. O. The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nat. Commun.* **8**, 1809 (2017).
19. Cubenas-Potts, C. & Matunis, M. J. SUMO: a multifaceted modifier of chromatin structure and function. *Dev. Cell* **24**, 1–12 (2013).
20. Zhao, X. SUMO-mediated regulation of nuclear functions and signaling processes. *Mol. Cell* **71**, 409–418 (2018).
21. Nacerddine, K. et al. The SUMO pathway is essential for nuclear integrity and chromosome segregation in mice. *Dev. Cell* **9**, 769–779 (2005).
22. Cossec, J. C. et al. SUMO safeguards somatic and pluripotent cell identities by enforcing distinct chromatin states. *Cell Stem Cell* **23**, 742–757.e748 (2018).
23. Keiten-Schmitz, J. et al. The nuclear SUMO-targeted ubiquitin quality control network regulates the dynamics of cytoplasmic stress granules. *Mol. Cell* **79**, 54–67.e57 (2020).
24. Stankovic-Valentin, N. & Melchior, F. Control of SUMO and ubiquitin by ROS: signaling and disease implications. *Mol. Asp. Med.* **63**, 3–17 (2018).
25. Seifert, A., Schofield, P., Barton, G. J. & Hay, R. T. Proteotoxic stress reprograms the chromatin landscape of SUMO modification. *Sci. Signal.* **8**, rs7 (2015).
26. Bossis, G. et al. The ROS/SUMO axis contributes to the response of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Rep.* **7**, 1815–1823 (2014).
27. Hendriks, I. A. et al. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 927–936 (2014).
28. Tirard, M. et al. In vivo localization and identification of SUMOylated proteins in the brain of His6-HA-SUMO1 knock-in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 21122–21127 (2012).
29. Stadler, M. et al. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* **11**, 2565–2573 (1995).
30. Sahin, U. et al. Interferon controls SUMO availability via the Lin28 and let-7 axis to impede virus replication. *Nat. Commun.* **5**, 4187 (2014).
31. Gutschner, M. et al. Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* **5**, 553–559 (2008).
32. Yuan, H. et al. Sumoylation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the biased primitive hematopoiesis of zebrafish. *Blood* **117**, 7014–7020 (2011).
33. Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T. H. & Van Ostade, X. A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int. J. Biol. Sci.* **6**, 51–67 (2010).
34. Yang, B. X. et al. Systematic identification of factors for provirus silencing in embryonic stem cells. *Cell* **163**, 230–245 (2015).
35. Czerwinska, P., Mazurek, S. & Wiznerowicz, M. The complexity of TRIM28 contribution to cancer. *J. Biomed. Sci.* **24**, 63 (2017).
36. Cheng, C. T., Kuo, C. Y. & Ann, D. K. KAP1 in charge of multiple missions: emerging roles of KAP1. *World J. Biol. Chem.* **5**, 308–320 (2014).
37. Ecco, G., Imbeault, M. & Trono, D. KRAB zinc finger proteins. *Development* **144**, 2719–2729 (2017).
38. Muthu, M., Cheriyian, V. T. & Rishi, A. K. CARP-1/CCAR1: a biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis. *Oncotarget* **6**, 6499–6510 (2015).
39. Takahashi, K. et al. Dynamic regulation of p53 subnuclear localization and senescence by MORC3. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1701–1709 (2007).
40. Elsasser, S. J., Noh, K. M., Diaz, N., Allis, C. D. & Banaszynski, L. A. Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature* **522**, 240–244 (2015).
41. Masclé, X. H., Germain-Desprez, D., Huynh, P., Estéphan, P. & Aubry, M. Sumoylation of the transcriptional intermediary factor 1beta (TIF1beta), the Co-repressor of the KRAB Multifinger proteins, is required for its transcriptional activity and is modulated by the KRAB domain. *J. Biol. Chem.* **282**, 10190–10202 (2007).
42. Briers, S., Crawford, C., Bickmore, W. A. & Sutherland, H. G. KRAB zinc-finger proteins localise to novel KAP1-containing foci that are adjacent to PML nuclear bodies. *J. Cell Sci.* **122**, 937–946 (2009).
43. Rowe, H. M. et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells. *Nature* **463**, 237–240 (2010).
44. Maksakova, I. A. et al. Distinct roles of KAP1, HP1 and G9a/GLP in silencing of the two-cell-specific retrotransposon MERVL in mouse ES cells. *Epigenet. Chromatin* **6**, 15 (2013).
45. De Iaco, A., Coudray, A., Duc, J. & Trono, D. DPPA2 and DPPA4 are necessary to establish a 2C-like state in mouse embryonic stem cells. *EMBO Rep.* **20**, <https://doi.org/10.15252/embr.201847382> (2019).
46. Jin, Y. & Hammell, M. Analysis of RNA-Seq Data Using TEtranscripts. *Methods Mol. Biol.* **1751**, 153–167 (2018).
47. Groh, S. et al. Morc3 silences endogenous retroviruses by enabling Daxx-mediated histone H3.3 incorporation. *Nat. Commun.* **12**, 5996 (2021).

48. Ecco, G. et al. Transposable elements and their KRAB-ZFP controllers regulate gene expression in adult tissues. *Dev. Cell* **36**, 611–623 (2016).
49. Macfarlan, T. S. et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* **487**, 57–63 (2012).
50. Eckersley-Maslin, M. et al. Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes Dev.* **33**, 194–208 (2019).
51. Yang, F. et al. DUX-miR-344-ZMYM2-mediated activation of MERV1 LTRs induces a totipotent 2C-like state. *Cell Stem Cell* **26**, 234–250 e237 (2020).
52. Fu, X., Wu, X., Djekidel, M. N. & Zhang, Y. Myc and Dnmt1 impede the pluripotent to totipotent state transition in embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **21**, 835–844 (2019).
53. Rodriguez-Terrones, D. et al. A distinct metabolic state arises during the emergence of 2-cell-like cells. *EMBO Rep.* **21**, e48354 (2020).
54. Yan, Y. L. et al. DPPA2/4 and SUMO E3 ligase PIAS4 oppositely regulate zygotic transcriptional program. *PLoS Biol.* **17**, e3000324 (2019).
55. Theurillat, I. et al. Extensive SUMO modification of repressive chromatin factors distinguishes pluripotent from somatic cells. *Cell Rep.* **32**, 108146 (2020).
56. Rodriguez-Terrones, D. et al. A molecular roadmap for the emergence of early-embryonic-like cells in culture. *Nat. Genet.* **50**, 106–119 (2018).
57. Yang, M. et al. Chemical-induced chromatin remodeling reprograms mouse ESCs to totipotent-like stem cells. *Cell Stem Cell* **29**, 400–418.e413 (2022).
58. Genet, M. & Torres-Padilla, M. E. The molecular and cellular features of 2-cell-like cells: a reference guide. *Development* **147**, <https://doi.org/10.1242/dev.189688> (2020).
59. Eckersley-Maslin, M. A., Alda-Catalinas, C. & Reik, W. Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 436–450 (2018).
60. Augustine, R. C. & Vierstra, R. D. SUMOylation: re-wiring the plant nucleus during stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**, 143–154 (2018).
61. Hendriks, I. A. et al. Site-specific mapping of the human SUMO proteome reveals co-modification with phosphorylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1038/nsmb.3366> (2017).
62. Becker, J. et al. Detecting endogenous SUMO targets in mammalian cells and tissues. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 525–531 (2013).
63. Shin, Y. & Brangwynne, C. P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science* **357**, <https://doi.org/10.1126/science.aaf4382> (2017).
64. Psakhye, I. & Jentsch, S. Protein group modification and synergy in the SUMO pathway as exemplified in DNA repair. *Cell* **151**, 807–820 (2012).
65. Hakli, M., Karvonen, U., Janne, O. A. & Palvimo, J. J. SUMO-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Exp. Cell Res.* **304**, 224–233 (2005).
66. Cappadocia, L., Pichler, A. & Lima, C. D. Structural basis for catalytic activation by the human ZNF451 SUMO E3 ligase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 968–975 (2015).
67. Rytinki, M. M., Kaikkonen, S., Pehkonen, P., Jaaskelainen, T. & Palvimo, J. J. PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 3029–3041 (2009).
68. Ivanschitz, L. et al. PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, 14278–14283 (2015).
69. Li, J. et al. Desumoylase SENP6 maintains osteochondroprogenitor homeostasis by suppressing the p53 pathway. *Nat. Commun.* **9**, 143 (2018).
70. Lusic, M. et al. Proximity to PML nuclear bodies regulates HIV-1 latency in CD4+ T cells. *Cell Host Microbe* **13**, 665–677 (2013).
71. Lomonte, P. The interaction between herpes simplex virus 1 genome and promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) as a hallmark of the entry in latency. *Micro. Cell* **3**, 569–572 (2016).
72. Ito, K. et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* **453**, 1072–1078 (2008).
73. Carracedo, A. et al. A metabolic prosurvival role for PML in breast cancer. *J. Clin. Investig.* **122**, 3088–3100 (2012).
74. Aoto, T., Saitoh, N., Ichimura, T., Niwa, H. & Nakao, M. Nuclear and chromatin reorganization in the MHC-Oct3/4 locus at developmental phases of embryonic stem cell differentiation. *Dev. Biol.* **298**, 354–367 (2006).
75. Delbarre, E. et al. PML protein organizes heterochromatin domains where it regulates histone H3.3 deposition by ATRX/DAXX. *Genome Res.* **27**, 913–921 (2017).
76. Kurihara, M. et al. Genomic profiling by ALAP-seq reveals transcriptional regulation by PML bodies through DNMT3A exclusion. *Mol. Cell* **78**, 493–505.e498 (2020).
77. Thompson, P. J. et al. hnRNP K coordinates transcriptional silencing by SETDB1 in embryonic stem cells. *PLoS Genet.* **11**, e1004933 (2015).
78. Choi, Y. H., Bernardi, R., Pandolfi, P. P. & Benveniste, E. N. The promyelocytic leukemia protein functions as a negative regulator of IFN-gamma signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 18715–18720 (2006).
79. Chiappinelli, K. B. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. *Cell* **162**, 974–986 (2015).
80. Torres-Padilla, M. E. On transposons and totipotency. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **375**, 20190339 (2020).
81. Hashimoto, M. & Takemoto, T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci. Rep.* **5**, 11315 (2015).
82. Lallemand-Breitenbach, V. et al. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J. Exp. Med.* **189**, 1043–1052 (1999).
83. Hendriks, I. A. & Vertegaal, A. C. Label-free identification and quantification of SUMO target proteins. *Methods Mol. Biol.* **1475**, 171–193 (2016).
84. Tyanova, S., Temu, T. & Cox, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319 (2016).
85. Cox, J. et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteom.* **13**, 2513–2526 (2014).
86. Tyanova, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**, 731–740 (2016).
87. Dobin, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
88. Jin, Y., Tam, O. H., Paniagua, E. & Hammell, M. Tetrascripts: a package for including transposable elements in differential expression analysis of RNA-seq datasets. *Bioinformatics* **31**, 3593–3599 (2015).
89. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
90. Perez-Riverol, Y. et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **47**, D442–D450 (2019).

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Agence Nationale pour la Recherche, ANR SUMOPiv (V.L.B.); the ERC, PML-Therapy



## Article

(ADG-785917) (H.D.T.); Fondation ARC (V.L.B.); ANRJC (P.T.). We kindly thank the staff of the animal facility in Research Institute of Saint-Louis (IRSL), A.L. Maubert for her help with mouse care. We are also grateful to image core microscopy facilities of IRSL and Collège de France, Paris, in particular N. Setterblad for his helpful advice with inucyte analysis. We warmly thank M. Tirard and N. Brose (Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany) for the sharing of His6-HA-*Sumo1* knock-in mice, and Meng-Er Huang (Institut Curie, Orsay, France) for his GRX1-roGFP2 construct. We thank Pablo Navarro (Pasteur) for providing mESCs. We also acknowledge P. Mayeux and V. Salnot of the Proteomic 3P5 platform in Cochin hospital, Paris, France, for the total APL proteomics. The Orbitrap Fusion mass spectrometer was acquired with funds from the FEDER through the « Operational Programme for Competitive-ness and employment 2007-2013 », and from the « Cancéropôle Ile-de-France ». We kindly thank P. Lesage, A. Amara, M.H. Verhlaac and D. Bouché for their critical readings of the manuscript, and other members of the team for helpful advice. We finally thank the support services of IRSL and CIRB.

### Author contributions

S.T., O.F., M.C.G., performed all experiments; R.G.P. performed SUMO proteomics (quantitative MS/MS analyses). D.R. extracted the transcripts for Affymetrix microarray. S.Q. analyzed RNAseq and transcriptomics data. A.C., E.F. and P.T. generated the *Pml*<sup>-/-</sup> mESCs, MNK the *Pml*<sup>E167R/E167R</sup> and *His10-HA-Sumo3* knock-in mouse, M.P. for *Pml*<sup>-/-</sup> and *Pml*<sup>E167R/E167R</sup> mouse crossing with *His6-HA-Sumo1* knock-in mice. M.T. generated the *His6-HA-Sumo1* Knock-in model<sup>28</sup>. P.B. generated Grx1-roGFP constructs and cell experiments. O.F., M.C.G., A.V., V.L.B. and H.d.T. designed experiments, interpreted data and contributed to the writing of the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33147-6>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Hugues de Thé or Valérie Lallemand-Breitenbach.

**Peer review information** *Nature Communications* thanks Francis Impens and the other anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

**Reprints and permission information** is available at <http://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) 2022, corrected publication 2023

<sup>1</sup>Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, PSL research university, Inserm, Cnrs, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, France. <sup>2</sup>Université Paris Cité, Inserm, CNRS, GenCellDis, Institut de Recherche Saint-Louis, F-75010 Paris, France. <sup>3</sup>Department of Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Center (LUMC), Einthovenweg 20, 2333, ZC Leiden, The Netherlands. <sup>4</sup>Service de Hématologie, AP-HP, Hôpital St. Louis, F-75010 Paris, France. <sup>5</sup>Normal and pathological hematopoiesis: Emergence, Environment and translational research, Université de Paris Cité, Inserm, IRSL, F-75010 Paris, France. <sup>6</sup>Department of Molecular Neurobiology, Max Planck Institute of Multidisciplinary Sciences, D-37075 Goettingen, Germany. <sup>7</sup>Present address: Honing Biosciences, Hôpital Saint Louis, 16, rue de la Grange aux Belles, 75010 Paris, France. <sup>8</sup>Present address: Genome Proteomics laboratory, Department of Cell Biology, Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER), University of Seville, Seville, Spain. <sup>9</sup>Present address: Institute of Epigenetics and Stem Cells (IES), Helmholtz Zentrum München, Feodor-Lynen-Straße 21, 81377 München, Germany. <sup>10</sup>These authors contributed equally: Sarah Tessier, Omar Ferhi, Marie-Claude Geoffroy. ✉e-mail: [hugues.dethe@inserm.fr](mailto:hugues.dethe@inserm.fr); [valerie.lallemand@inserm.fr](mailto:valerie.lallemand@inserm.fr)