



HAL
open science

L'oncogène Mdm2 : nouvelles fonctions et implications dans le métabolisme des cellules cancéreuses

Romain Riscal

► **To cite this version:**

Romain Riscal. L'oncogène Mdm2 : nouvelles fonctions et implications dans le métabolisme des cellules cancéreuses. Endocrinologie et métabolisme. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT3512 . tel-01621696

HAL Id: tel-01621696

<https://theses.hal.science/tel-01621696>

Submitted on 23 Oct 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**université de MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2 n°168
Et de l'unité de recherche IRCM U1194

Spécialité : **Biologie Santé**

Présentée par **Romain RISCAL**

**L'oncogène MDM2 : nouvelles fonctions et
implications dans le métabolisme des
cellules cancéreuses**

Soutenue le 30/09/2016 devant le jury composé de

M. le Pr Paul MANGEAT
M. le Dr Laurent LE CAM
Mme le Dr. Laëtitia LINARES
Mme le Dr. Sophie VASSEUR
M. le Dr Jean Christophe MARINE
M. le Dr Jean Emmanuel SARRY
M. le Dr Lluis FAJAS COLL

Président du jury
Directeur de Thèse
Co-directrice de Thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur



REMERCIEMENTS

Ours solitaire comme la plupart de mes amis me décrivent c'est très bien entouré par ma famille et par les membres de mon équipe que je suis arrivé au bout de cette aventure tumultueuse qu'est la thèse en un seul morceau.

Je vais d'abord remercier les membres du jury, qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail: M Paul MANGEAT, M Lluís FAJAS, M Jean Emmanuel SARRY, Mr Jean Christophe MARINE et Mme Sophie VASSEUR.

Ensuite mes plus profonds remerciements iront vers mes deux co-directeurs de thèse.

Laetitia, merci pour tout ce que tu m'as apporté pendant ces 4 années, tu es une personne généreuse, intelligente, et très investie dans ta recherche scientifique. Investissement que tu répercutes très bien sur tes étudiants pour en obtenir le meilleur. Nous avons formé une belle équipe avec beaucoup de bons moments. Toujours là pour aider et remotiver nous avons ensemble réussi à boucler une longue et belle histoire. Merci de m'avoir accordé toute ta confiance et donné autant de liberté. Je ne peux que te souhaiter le meilleur pour la suite sur le plan professionnel et personnel. Je ne me fais pas de souci pour toi. Au plaisir d'interagir dans le futur lors de mes prochaines aventures scientifiques.

Laurent, merci de m'avoir pris dans ton équipe moi le petit Pérolien qui ne parle pas un mot d'Anglais. Merci également pour ta disponibilité lors de toutes les étapes importantes d'une thèse et surtout pour les connexions scientifiques et autres que j'ai pu faire grâce à toi notamment lors de nos voyages à Cambridge (DNA Beer) et à Banff (Top less tree mémorable). Je te souhaite aussi le meilleur pour la suite et une bonne expérience aux US avec ta famille.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres de l'équipe actuelle, avec lesquels on a réussi à créer une sorte de famille (même si on peut encore visualiser deux sous familles MDM2 et E4F1) nous ayant permis de mener à bien plusieurs papiers en l'espace de quelques années.

Maryse, merci pour ton aide dans les tâches quotidiennes du laboratoire ainsi que pour la confection des nombreux plasmides que j'ai pu utiliser lors de ma thèse. Toujours de bonne humeur on aura eu pas mal de fou rire.

Berfin, merci pour ton soutien et ta bonne humeur quotidienne même si tu te mets parfois en colère pour un peu de Trizol dans ta poubelle ;). Je te souhaite plein de bonnes choses pour la fin de ta thèse mais ça part bien avec ce PNAS.

Laurie, merci d'avoir apporté un peu de Camargue dans cette recherche nordiste et étrangère notamment à travers ton vocabulaire très ferria pour faire simple et poli. Plein de bonnes choses pour ta future vie de maman.

Madi, merci pour le soutien et l'aide lors de ces fameuses révisions. Je te souhaite plein de réussite avec le projet en cours et plein de courage pour finir cette thèse comme il se doit.

Giuseppe, merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse, tu as emmené le soleil d'Italie avec toi dans ce labo. Merci aussi pour toute l'expertise scientifique que tu m'as apportée personnellement ainsi qu'à mon projet (gros coup de main pendant les

révisions). Je te souhaite plein de bonnes choses dans ta future aventure parisienne avec toute ta famille. Ne te fais pas de souci, MDM2 à la mito ça vaut un gros impact factor ;).

Matthieu, le papa, merci pour tout. Grace aux interactions autant personnelles que scientifiques tu auras grandement contribué à la réussite de cette thèse. J'espère qu'en post doc je vais trouver quelqu'un pour crier un peu lors de mes blots. Ca motive bien en tout cas. Par la même occasion on passe pour des fous.

Voilà ces quelques mots pour tous vous remercier et vous souhaiter encore pleins de bons moments et de réussite au sein de la LLC team.

Je tiens aussi à remercier tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire durant ma présence avec plus ou moins de moments partagés, Susie, Mathilde, Nelly, Marjery ou encore le roi du canoë kayak alias Samuel.

Mimi, dernières personnes de l'institut à remercier personnellement et pas des moindres. Je tiens à te remercier pour tous les moments passés ensemble, quasiment que des bons parce que si tu pleures je m'échappe attention... :D. Ta disponibilité (changer un milieu en soirée cause de manip à 20000), ton soutien (tu m'auras appris qu'on ne se suicide pas pour un blot :D) et ton apport calorique (je tuerai quelqu'un pour un Cupcake au Nutella) auront été des moteurs pour mon activité au labo. Bref je suis obligé de faire court sinon je vais perdre ma réputation d'ours ;).

Je tiens à remercier aussi l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu la chance d'interagir au sein de l'institut, je pense à Abdel (je t'en aurais volé des cartons de boîte de 15 en 4 ans), Philou (merci pour ta disponibilité et ta confection de solution toujours aussi pointue), Geneviève (princesse de l'azote liquide maintenant à la retraite), Cathy (entraide entre novice du métabolisme oblige)... Je ne vais pas m'amuser à citer tout le monde donc merci à tous les membres de l'IRCM.

Je vais aussi remercier les équipes extérieures au laboratoire avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer notamment nos amis toulousains pour leur accueil et leurs expertises métaboliques. Je pense à JE et toute son équipe (en particulier Estelle), le papa du métabolisme, merci pour tout ces « brain storming » très constructifs (surtout à minuit au Get Perrier ;D). Merci également à Jean Charles ainsi que toute son équipe (Lara, Florian et Maude) Métatoul pour la partie fluxomique, métabolomique (et alcoolomique au Dublineur aussi).

Le meilleur pour la fin, mes remerciements vont bien entendu à ma femme, Marine qui m'aura soutenue tout au long de ma thèse dans les bons comme dans les mauvais moments (surtout quand j'étais bon en rien et mauvais en tout). Un grand merci à notre fils Roméo, qui a apporté toute sa joie de vivre et son amour lors de mes deux dernières années de thèse. Il m'a surtout appris à partir du labo avant 19h30. MERCI

Je tiens également à remercier mes parents pour leur soutien tout au long de ma scolarité sans qui je ne serais jamais allé aussi loin dans mes études. Merci aussi à tous les membres de ma famille, mes grands parents, mon frère, mes beaux parents et mes amis (Nico, Toto, Vico, Pinpin, Flo ainsi que leurs compagnes). Autant de personnes toujours aussi à l'écoute de mon travail (sans trop comprendre par moment) et surtout présentes pour m'aérer l'esprit l'eau lors de grosses soirées d'apéritifs.

AVANT-PROPOS

Les cellules produisent de l'énergie et des composants cellulaires pour soutenir la croissance et la prolifération à travers plusieurs voies métaboliques importantes. La glycolyse génère du pyruvate qui est converti en acétyl-CoA afin d'alimenter le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). Ce TCA produit du NADH et du succinate importants pour la chaîne de transport des électrons et génère également des intermédiaires de biosynthèse, tel que le citrate, qui alimente la voie de synthèse des acides gras. La phosphorylation oxydative dans les mitochondries produit des niveaux élevés d'ATP. A terme la glycolyse aérobie fournit en énergie l'équivalent de 36/38 ATP pour une seule molécule de glucose. Les voies de biosynthèse génèrent des nucléotides, protéines et lipides nécessaires à la production de nouvelles cellules filles au cours de la prolifération.

Les processus métaboliques sont souvent modifiés pour répondre aux exigences de la prolifération anormale des cellules cancéreuses. Par exemple, l'effet Warburg soutient que les cellules cancéreuses augmentent l'absorption du glucose et donc leur glycolyse même dans des conditions normoxiques, on parle alors de glycolyse aérobie. Récemment, il a été suggéré que l'utilisation accrue de la glycolyse aide les cellules cancéreuses à maintenir de hauts taux de prolifération *via* la production d'intermédiaires glycolytiques qui alimentent les voies biosynthétiques nécessaires à la production de nouvelles cellules.

La plupart des oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs permettent l'expression de protéines favorisant la prolifération cellulaire ou l'arrêt du cycle cellulaire. Au cours des dernières années, nous avons appris que la prolifération était étroitement couplée avec des changements métaboliques. Pour cette raison, le métabolisme cancéreux est un domaine de recherche prometteur étant donné que le métabolisme des cellules cancéreuses peut être exploité en vue d'établir de nouvelles approches thérapeutiques. Conformément à la fonction normale de leurs protéines codées, oncogènes ou suppresseurs de tumeurs régulent le métabolisme cellulaire. Ceci est une partie intrinsèque de leur programme visant à réduire ou à favoriser la prolifération cellulaire. Les oncogènes favorisent l'absorption et le métabolisme des nutriments comme le glucose indispensable à la synthèse de lipides, nucléotides et protéines. p53, un suppresseur de tumeur bien connu intervient dans une multitude de voies métaboliques *via* l'activation ou la répression de nombreux gènes clés du métabolisme. Parmi ces voies on retrouve des gènes impliqués dans la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, la phosphorylation oxydative, le métabolisme des lipides ou encore celui de certains acides aminés comme la glutamine ou la sérine.

Quant au possible rôle des régulateurs de p53 dans le métabolisme énergétique, leur étude suscite trop peu d'intérêt. Cependant l'un d'entre eux, MDM2, a attiré toute mon attention lors de mes travaux de thèse.

Dans ce manuscrit, une partie introductive sera consacrée à l'oncogène MDM2, ses différentes fonctions et son ciblage thérapeutique en perspective d'établir de nouvelles thérapies dans les cancers humains. Dans la suite de l'introduction, je décrirai les principales voies métaboliques en cours d'études, et leurs rôles dans le cancer. Enfin je finirai cette introduction avec les facteurs de transcription ATF nouveaux acteurs du métabolisme en réponse aux stress comme les carences en acides aminés et les stress oxydatifs. Dans une seconde partie, je présenterai mon article qui regroupe l'ensemble des résultats de cette thèse. Une dernière partie sera enfin consacrée à une discussion générale et une remise en perspective de l'ensemble de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|--------|
| Remerciements: | p2-3 |
| Avant propos: | p4 |
| Index des figures: | p8 |
| Liste des abréviations: | p9-11 |
| Introduction: | |
| I – Le supresseur de tumeur p53: | |
| 1) Les fonctions de p53: | p13-14 |
| 2) Les principaux régulateurs de p53: | p15 |
| 3) p53 et métabolisme: | p16-18 |
| a) p53 régule la phosphorylation oxydative. | |
| b) p53 régule la glycolyse: | |
| c) p53 régule la glutaminolyse et le métabolisme des lipides: | |
| d) p53 régule les défenses anti-oxydantes: | |
| II - L'oncogène MDM2: | |
| 1) MDM2, d'un point de vue structural: | p19-20 |
| 2) Les motifs protéiques de MDM2: | p21-22 |
| 3) Activité E3 ligase: | p22-23 |
| 4) MDM2 est le régulateur principal de p53: | p23-25 |
| 5) Fonctions de MDM2 indépendante de p53: | p25-28 |
| a) Contrôle du cycle cellulaire: | |
| b) Différenciation cellulaire: | |
| c) Régulation transcriptionnelle: | |
| d) Réparation de l'ADN: | |
| e) Biosynthèse des ribosomes: | |
| f) Hypoxie: | |
| g) Dégradation des transporteurs: | |
| h) Apoptose, et inhibition de croissance: | |
| 6) Régulations de la protéine MDM2: | p29-32 |
| a) Régulation transcriptionnelle: | |
| b) Régulation traductionnelle: | |
| c) Régulation post traductionnelle: | |
| d) Régulation par localisation subcellulaire: | |
| 7) Inhibiteurs pharmacologiques ciblant MDM2: | p32-33 |
| III - MDM4 | p34-35 |

IV - Le métabolisme tumoral

| | |
|---|--------|
| 1) Glycolyse: | p38-39 |
| 2) Voie des pentoses phosphates: | p39-40 |
| 3) Métabolisme de la sérine: | p41-46 |
| a) Biosynthèse <i>de novo</i> de sérine: | |
| b) Sérine et la famille p53: | |
| c) Sérine et pyruvate kinase M2: | |
| d) Sérine principale source de glycine: | |
| e) Métabolisme un carbone (1C): | |
| f) Espoir de traitement: | |
| 4) La pyruvate kinase M2: | p46-51 |
| a) Les différentes isoformes de la pyruvate kinase: | |
| b) Pyruvate kinase M: gène, structure protéique et fonction | |
| c) PKM2 et cancer: | |
| 5) Lactate: | p51 |
| 6) Cycle de Krebs: | p52-53 |
| 7) Glutaminolyse: | p54 |

V - Activating Transcription Factor:

| | |
|---|--------|
| 1) Découverte et nomenclature: | p55 |
| 2) ATF3: | p55-57 |
| a) ATF3 et réponse au stress: | |
| b) Les fonctions d'ATF3: | |
| c) ATF3 et cancer: | |
| 3) ATF4: | p58-60 |
| a) localisation, structure et expression: | |
| b) Synthèse et dégradation: | |
| c) Fonctions biologiques: | |

VI - Le stress oxydatif:

| | |
|---|--------|
| 1) Introduction: | p61 |
| 2) ROS et processus physiologiques normaux: | p61 |
| 3) ROS et cancer: | p62-64 |
| a) ROS, acteurs de la tumorigenèse: | |
| b) Rôle bénéfique potentiel des ROS dans le cancer: | |
| 4) Les défenses cellulaires contre les ROS: | p64-67 |
| a) Les systèmes non-enzymatiques: | |
| b) Les systèmes enzymatiques: | |

| | |
|---|-----|
| Objectifs de la thèse: | p69 |
|---|-----|

Résultats:

Article

| | |
|-----------------------|---------|
| Introduction. | p70 |
| Manuscrit. | p71-111 |
| Conclusion | p112 |

Discussion et perspectives:

| | |
|---|----------|
| 1) MDM2: bien plus qu'un oncogène, un facteur pronostic: | p113-114 |
| 2) MDM2 Δ AD: un outil d'étude du métabolisme cancéreux | p114 |
| 3) Quelles kinases candidates pour la régulation allostérique de MDM2 ? | p115 |

| | |
|--|----------|
| 4) Tous les stress ne mènent pas à la chromatine: | p116 |
| 5) Oncogènes et suppresseurs de tumeur en première ligne des dérégulation du métabolisme cellulaire: | p117-118 |
| 6) Les voies non étudiées régulées par MDM2: | p119 |
| 7) MDM2 régulateur dans la course aux nutriments: | p119-121 |
| 8) MDM2 participe au contrôle de la transcription : | p121-122 |
| 9) MDM2 régulateur de la sérine: qu'en est il du métabolisme 1C ? | p122 |
| 10) La relation entre MDM2 et ATF4: | p123 |
| 11) Relevance physiologique de cette relocalisation à la chromatine: . . . | p123-125 |
| 12) Le complexe MDM2/E4F1: une piste vers la régulation du flux métabolique. | p125-126 |
| 13) Autre localisation inattendue de MDM2: la mitochondrie. | p126 |
| 14) Les perspectives cliniques : | p126-127 |
| Bibliographie: | p128-163 |

INDEX DES FIGURES

- Figure 1: Hallmarks of cancer.
- Figure 2: Le processus multi-étape du cancer.
- Figure 3: p53 répond à de nombreux signaux de stress et régule diverses réponses.
- Figure 4: Le code p53.
- Figure 5: La régulation du métabolisme cellulaire par p53
- Figure 6: La structure du gène *Mdm2*.
- Figure 7: Les principaux variants de MDM2.
- Figure 8: La structure de la protéine MDM2.
- Figure 9: Mode d'action des enzymes qui conduisent à la dégradation protéique.
- Figure 10: Boucle de rétrocontrôle impliquant p53 et MDM2.
- Figure 11: Les différentes fonctions de MDM2.
- Figure 12: Les sites de phosphorylation de MDM2.
- Figure 13: Les inhibiteurs de MDM2 utilisés en clinique.
- Figure 14: La structure de la protéine MDM4.
- Figure 15: Vue d'ensemble du métabolisme.
- Figure 16: Métabolisme normal vs métabolisme cancéreux.
- Figure 17: La glycolyse.
- Figure 18: Les principales voies de régulation de la glycolyse.
- Figure 19: La voie des pentoses phosphates.
- Figure 20: La voie de biosynthèse de la sérine.
- Figure 21: Adaptation des cellules cancéreuses à une carence en sérine.
- Figure 22: La disponibilité en sérine module l'activité de PKM2.
- Figure 23: Biosynthèse et devenir de la glycine.
- Figure 24: Epissage alternatif du gène *Pkm2* et devenir protéique.
- Figure 25: PKM2: un acteur important de la glycolyse aérobie.
- Figure 26: Devenir du lactate entre cellules hypoxiques et oxydatives.
- Figure 27: Le cycle de Krebs.
- Figure 28: La glutaminolyse.
- Figure 29: Réponse p53 médiée par les signaux de stress d'ATF3.
- Figure 30: L'ARNm d'ATF4.
- Figure 31: Régulation de la traduction d'ATF4.
- Figure 32: Les différentes kinases qui permettent la réponse ATF4 classique.
- Figure 33: Cycle du glutathion.
- Figure 34: La réponse à la carence en sérine
- Figure 35: Le repliement de MDM2
- Figure 36: L'hypoxie relocalise MDM2 à la chromatine
- Figure 37: L'absence de glutamine joue sur la stabilité de MDM2
- Figure 38: Carte de flux régulée par MDM2
- Figure 39: La boucle de régulation entre MDM2 et ATF4
- Figure 40: La différenciation adipocytaire relocalise MDM2 à la chromatine
- Figure 41: MDM2 est spontanément relocalisé à la chromatine dans les liposarcomes
- Figure 42: MDM2 et E4F1 co-régulateurs transcriptionnel.

LISTES DES ABREVIATIONS

- AARE**, Elément de réponse aux acides aminés
- ABL**, Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
- ACLY**, ATP citrate lyase
- ADN**, Acide désoxyribonucléique
- ADNmt**, Acide désoxyribonucléique mitochondrial
- AIF**, facteur induisant l'apoptose
- AKT**, Ak strain thymoma
- Ala**, Alanine
- ALAT**, l'alanine amino transférase
- AMP, ADP, ATP**, Adénosine mono-phosphate, diphosphate et triphosphate
- ARN**, Acide ribonucléique
- ARNm**, ARN messenger
- ARNt**, ARN de transfert
- AR**, Androgen receptor
- ARF**, Alternative Reading Frame
- ARF-BP1**, ARF-binding protein 1
- ASNS**, Asparagine synthase
- ATF**, Activating transcription factor
- ATM**, ataxia telangectasia mutated
- BAX**, Bcl-2 associated X protein
- BMI1**, B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
- CARPs**, Caspases-8 and -10 associated RING finger protein
- CAT**, catalase
- C/EBP**, CCAAT/ enhancer binding protein
- CBP**, CREB-binding protein
- CDK**, Cyclin-dependent kinase
- CDKN2A**, Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
- CK**, casein kinase
- CKI**, cyclin-dependent kinase inhibitor protein
- COP1**, Constitutive photomorphogenic 1
- CRE**, cAMP response element
- CREB**, cAMP response element binding protein
- CUL**, Cullin
- DAPK3**, Death-associated protein kinase 3
- DASA-58**, N,N'-diarylsulfonamide
- DHAP**, Dihydroxyacétone phosphate
- DKK1**, Dickkopf-related protein
- DNAPK**, DNA-dependent protein kinase
- DRAM**, damage-regulated autophagy modulator
- E2F**, E2 promoter binding factor
- E2F-DP1**, Transcription factor E2F dimérisation partner
- E4F1**, E4 promoter binding factor 1
- E6AP**, E6-associated protein
- EGF**, Endothelial growth factor
- EIF2 α** , Sous unité α du facteur d'initiation eucaryote 2
- ENO1**, Enolase 1
- ER α** , Oestrogen receptor- α
- ERK**, Extracellular signal-regulated kinase
- ETC**, transport des électrons de la mitochondrie
- F1,6BP**, Fructose 1,6 bisphosphate
- F6P**, Fructose 6 phosphate
- FACS**, Flow cytometry
- FDG**, fluorodeoxyglucose
- FOXO**, Forkhead box protein
- FAD(P)**, Flavine adenine dinucléotide (phosphate)
- G6P**, Glucose 6 phosphate
- G6PDH**, Glucose 6 phosphate déshydrogénase
- GA3P**, Glycéraldéhyde 3 phosphate

GAPDH, Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GADD45, Growth arrest and DNA damage 45
GAMT, guanidinoacétate méthyltransférase
GDH, glutamate déshydrogénase
GLDC, glycine décarboxylase
GLUT, Glucose transporter
GLS, glutaminase
GMP, GDP, GTP, Guanosine mono-phosphate, diphosphate et triphosphate
GOF, Gain of fonction
GPX, Glutathione peroxydase
GR, Glutathion réductase
GSH, Glutathione
GSK3 β , glycogène synthase kinase 3 β
GS, glutathione synthase
GSSG, Glutathione disulfite
GST, Glutathione S-transferase`

hnRNP, heterogenous nuclear ribonucleoprotein

HAUSP, Herpes virus-associated ubiquitin-specific protease

HCMV, Human cytomegalovirus

HDAC1, Histone deacetylase 1

HIF1 α , hypoxia-inducible factor 1 α

HKII, Hexokinase II

IGF-BP3, Facteur de croissance insulino-mimétique de type protéine de liaison

γ IR, Gamma irradiation

IR, Ionisante radiation

IRF8, IFN regulatory factor 8

K, Lysine

KO, Knock-out

LDH, lactate déshydrogénase

MCT, transporteur monocarboxylate

MDH, malate déshydrogénase

MDM2, Murine double minute 2

MDM2 FL, Murine double minute 2 Full Length

MDMX, Murine double minute x

ME, enzymes maliques

MEF, Mouse embryonic fibroblast

mi-ARN, Micro- Acide ribonucléique

MTBP, Mdm2 binding protein

MTHFD, methylenetetrahydrofolate déshydrogénase 2

mTORC, mammalian target of rapamycin complex

NAC, N-acetyl-L-cysteine

NAD(P), Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)

NEDD, Neddylation

NES, Nuclear export signal

NF- κ B, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NFAT1, nuclear factor of activated T cells 1

NLS, Nuclear localization signal

NoLS, Nucleolar localization signal

NOX, NADPH oxydase

NRF2, F-E2 related factor 2

OAA, oxaloacétate

ORF, Open reading frame

1,3 PGA, 1,3 bisphosphoglycérate

2 PGA, 2 phosphoglycérique

3 PGA, 3 phosphoglycérique

PAL-1, Phenylalanine ammonia-lyase 1

PC, pyruvate carboxylase

PCAF, p300/CBP associated factor

PDH, pyruvate déshydrogénase

PDK, pyruvate déshydrogénase kinase

PEP, Phosphoénol pyruvate

PET, Tomographie par émission de positrons

PGAM, Phosphoglycérate mutase

PGK, Phosphoglycérate kinase

Phe, phenylalanine

PFK1, Phosphofructokinase 1

PKB, Protein kinase B

PHGDH, phosphoglycerate dehydrogenase

PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PI3K, Phospho-inositide 3-kinase

PIRH2, p53-induced RING-H2

PK, Pyruvate kinase

PML, Promyelocytic leukaemia

PPP, Pentose phosphate pathway

PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate

PRB, Retinoblastoma protein

PRC2, polycomb repressor complex 2
PSAT1, Phosphosérine transaminase 1
PSPH, Phosphosérine phosphatase
PTB, polypyrimidine tract binding protein
PTEN, Phosphatase and tensin homolog
PUMA, The p53 upregulated modulator of apoptosis

R5P, Ribose 5 phosphate
RANBP2, Ran-binding protein 2
RANKL, receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
RASSF1, Ras association domain-containing protein 1
RE, réticulum endoplasmique
RING, Really interesting novel gene
ROS, Reactive oxygen species
RTK, Récepteur tyrosine kinase

SAICAR, succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5' phosphate
SAM, S-adénosylméthionine
SCF, Skp1, Cul1 and the F-box protein
SCO2, Cytochrome c oxydase synthase 2
Ser, Sérine
SHMT, sérine hydroxyméthyltransférase
shRNA, Small hairpin RNA
SLC7A11, solute carrier family 7 member 11

SNP, Single nucleotide polymorphism
SOD, Superoxyde dismutase
SUMO, Small ubiquitin-like modifier 1

T3, hormone thyroïdienne la triiodo-L-thyronine
TAF, TATA-binding protein-associated factor
TBP, TATA- binding protein
TCA, cycle de l'acide tricarboxylique
TEPP-46, thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinones
TFIID, Transcription factor II D
TGF β , Transforming growth factor β
THF, tétrahydrofolate
TIGAR, TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator
TLR, Toll like receptor
TSG101, Tumor susceptibility gene 101
TSP-1, Thrombospondin 1

UB, Ubiquitin
UBE2A, Ubiquitin-conjugating enzyme E2A
UBE4B, Ubiquitin-conjugating enzyme E4B
UTR, Untranslated region
UV, Ultra-violet radiation

VEGF, Vascular endothelial growth factor

XO, xanthine oxydase

INTRODUCTION

I - Le suppresseur de tumeur p53

La transformation maligne des cellules est la cause d'une série d'évènements génétiques et épigénétiques impliquant des altérations au niveau de nombreux oncogène et/ou suppresseur de tumeurs. L'instabilité génomique résultant de l'accumulation de multiples lésions conduit à des changements dans la signalisation cellulaire, la progression du cycle cellulaire et l'expression des gènes aboutissant à une augmentation du potentiel prolifératif des cellules, à la résistance à la mort cellulaire et à la sénescence, à l'augmentation de l'angiogenèse, à l'activation de l'invasion et donc à l'apparition de métastases (**Figure 1**). Ce processus multi-étapes permet à une cellule de devenir maligne (**Figure 2**) (1).

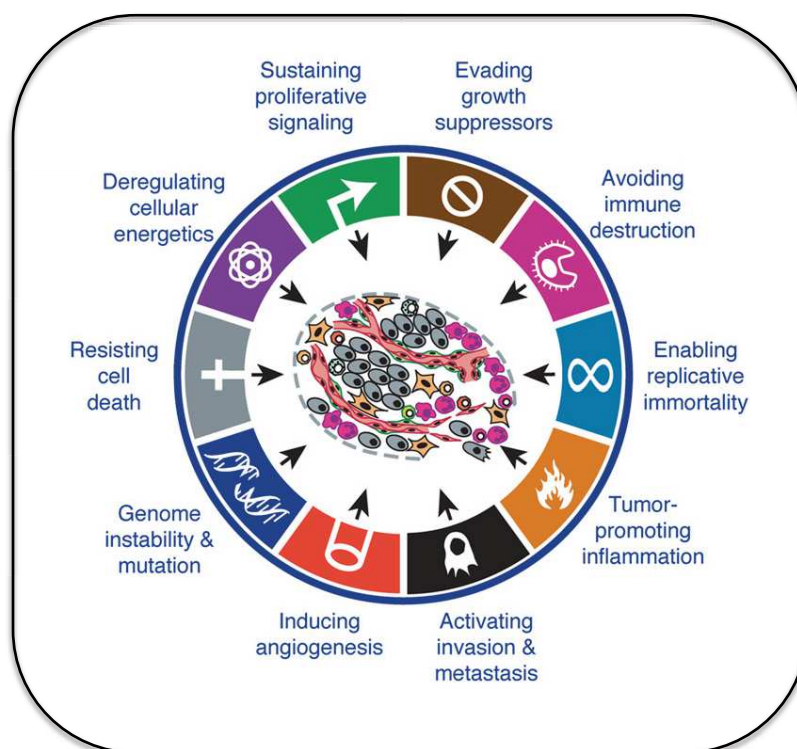


Figure 1: Hallmarks of cancer.

Liste des différentes propriétés des cellules tumorales et des mécanismes d'échappement aux points de contrôle anti-cancéreux mis en place dans la plupart des organismes multicellulaires.

Adaptée de Hallmarks of Cancer: The Next Generation by Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg

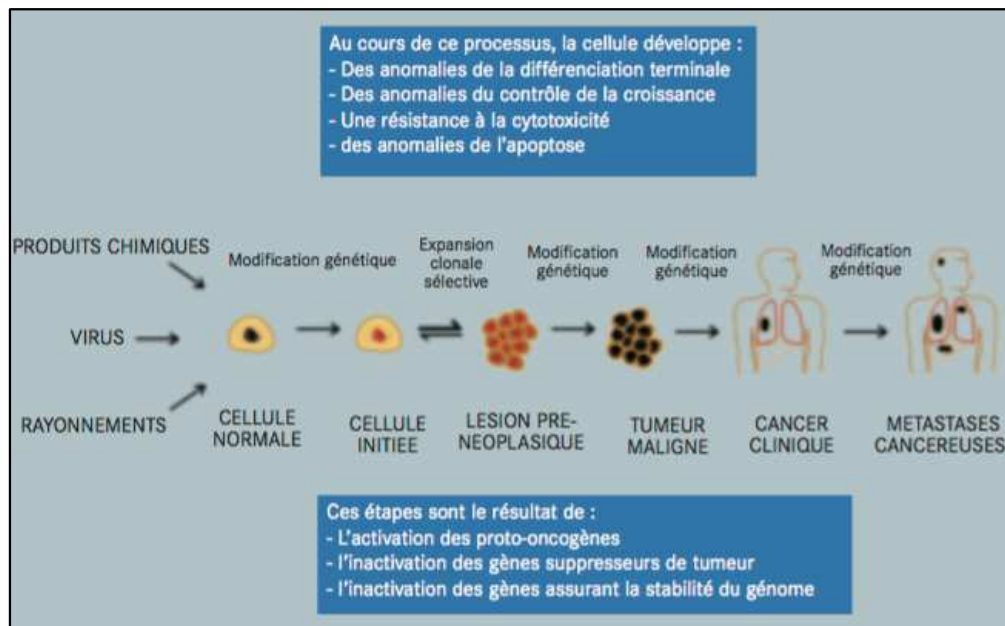


Figure 2: Le processus multi-étape du cancer.

La cancérogenèse est un processus en plusieurs étapes, impliquant un grand nombre d'évènements génétiques et épigénétiques impliquant des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Adaptée du site web IARC: www.iarc.fr

Parmi les gènes suppresseur de tumeurs les plus fréquemment inactivés chez les mammifères, le gène *p53* est probablement un des plus étudiés avec environ 60 000 articles publiés ces 30 dernières années (2). Le gène *TRP53* (*transformation related protein p53*), qui code le suppresseur de tumeurs *p53*, est muté dans environ 50% des cancers humains (3). L'autre moitié des tumeurs humaines présente des altérations génétiques de régulateurs situés en amont ou en aval de *p53*, conduisant, *in fine*, à l'inactivation fonctionnelle de la cascade moléculaire dans laquelle intervient *p53*. De plus, la transmission héréditaire d'un allèle du gène *TRP53* muté prédispose au syndrome cancéreux de Li-Fraumeni qui se manifeste par l'apparition précoce de plusieurs types tumoraux (4). Enfin, l'importance de *p53* dans la tumorigenèse a également été confirmée dans des modèles animaux, puisque la perte ou la mutation de cette protéine entraîne une prédisposition à une large gamme de tumeurs spontanées ou induites (5,6). Il apparaît ainsi que la voie de signalisation *p53* est dérégulée à un niveau ou à un autre dans la majorité des cancers humains.

1) Les fonctions de p53:

Les études aux niveaux structural et fonctionnel de *p53* ont révélé que la fonction majeure de *p53* s'appliquait au travers de son activité de facteur de transcription, capable à la fois de réguler positivement ou négativement l'expression d'une large gamme de gènes cibles (7). *P53* est considéré comme un médiateur essentiel des mécanismes de réponse cellulaire à des stress de natures très variées, tels que les stress génotoxiques, le stress oxydant, l'hypoxie ou encore le stress du réticulum endoplasmique. L'activation de *p53*, dans le contexte de ces stress aigus, conditionne le destin cellulaire et peut conduire, soit à un arrêt transitoire de la prolifération cellulaire afin de réparer les dommages, soit, lorsque ces dommages sont trop importants, à un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire appelé sénescence ou encore à la mort cellulaire (Figure 3) (8, 9, 10). La

multitude d'altérations conduisant à l'activation de p53, incluant la prolifération cellulaire anarchique induite par l'activation d'oncogènes, l'érosion des télomères, la déprivation en nutriments, ou encore l'hypoxie (11), lui confère un rôle bien admis de sentinelle de la stabilité du génome. Ces fonctions lui ont valu d'être surnommé le "gardien du génome".

Il apparaît cependant que si p53 joue un rôle essentiel dans ces situations de stress aigu, cette protéine n'en est pas moins impliquée dans des réponses adaptatrices plus subtiles permettant à la cellule de s'adapter à son environnement, notamment en termes de disponibilité en nutriments. Ainsi, il a été démontré que p53 ciblait l'activation de gènes cibles impliqués dans le métabolisme énergétique (12, 13, 14, 15), l'autophagie (16), la réparation de dommages génotoxiques (17), la survie cellulaire et la régulation du stress oxydatif (18), l'invasion et la motilité (19), la sénescence cellulaire (20), l'angiogénèse (21), ou encore la différenciation (22).

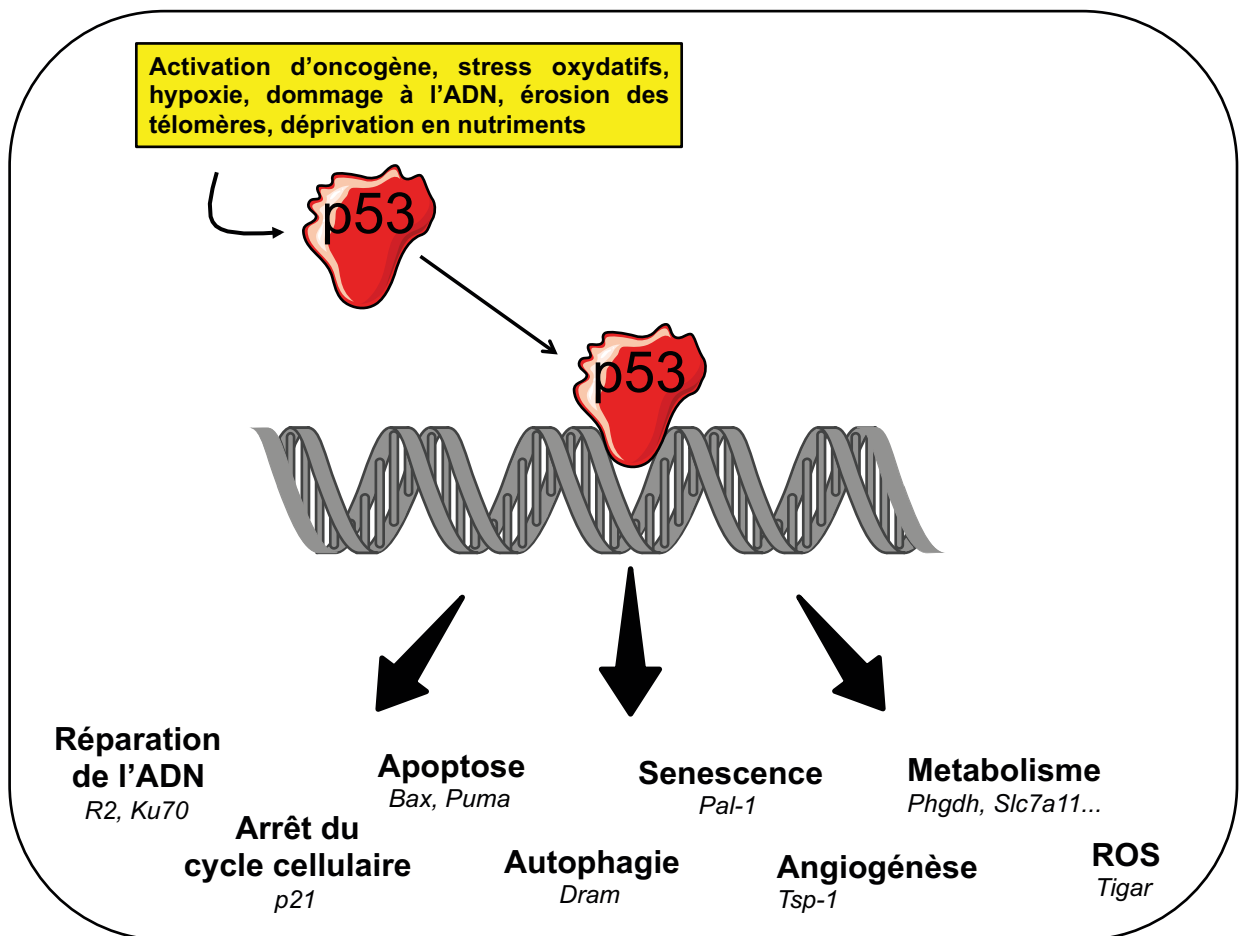


Figure 3: p53 répond à de nombreux signaux de stress et régule diverses réponses.

Plusieurs types de stress activent les fonctions transactivatrices de p53. Liste non exhaustive des gènes cibles de p53 impliqués dans différents destins cellulaire tels que l'autophagie, l'arrêt du cycle cellulaire, etc.

2) Les principaux régulateurs de p53:

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'hétérogénéité de la réponse p53 restent mal compris, mais il est admis qu'ils impliquent notamment de nombreux co-régulateurs protéiques, ainsi que certaines modifications post-traductionnelles de p53. De nombreux mécanismes de régulation contribuent à spécifier la réponse p53, en contrôlant non seulement sa stabilité, mais également sa localisation subcellulaire, et le recrutement sur certains de ses gènes cibles (**23**). A l'instar de la combinatoire des modifications post-traductionnelles des histones qui définissent le "code des histones", les nombreuses modifications post-traductionnelles de p53 définissent, tel un code-barre, le "code p53" et les réponses cellulaires associées (**Figure 4**).

La principale fonction de p53 est de limiter l'émergence de cellules transformées. Dans les cellules normales, p53 est maintenu à des niveaux protéiques bas, un état latent qui permet à la cellule de survivre et de se diviser. Un des régulateurs négatifs principaux de p53 est MDM2 (murine double minute 2) qui joue à travers son activité E3 ligase sur la stabilité et la dégradation de p53 via le système ubiquitine-protéasome (**24**). D'autres ubiquitine E3-ligases capables de dégrader p53 ont été identifiées, parmi lesquelles se trouvent: E6-AP (**25**), Pirh2 (**26**), Cop1 (**27**), les protéines RING associées aux caspases 8/10 (CARPs) (**28**), ou encore Mule/ARF-BP1 (**29**). Cependant, la redondance fonctionnelle de ces E3-ligases vis à vis de la régulation de p53, et les conditions physiologiques pendant lesquelles elles sont activées restent encore largement méconnues. En plus des ubiquitylations, dont certaines ne sont d'ailleurs pas nécessairement associées à sa dégradation (**30**), p53 est soumis à d'autres régulations post-traductionnelles (**31**), impliquant un jeu complexe de phosphorylations, acétylations, méthylations, ribosylations, glycosylations, neddylation, ou encore sumoylation. *In fine*, les différentes combinaisons de ces modifications induisent l'activation ou l'inhibition des fonctions transcriptionnelles de p53.

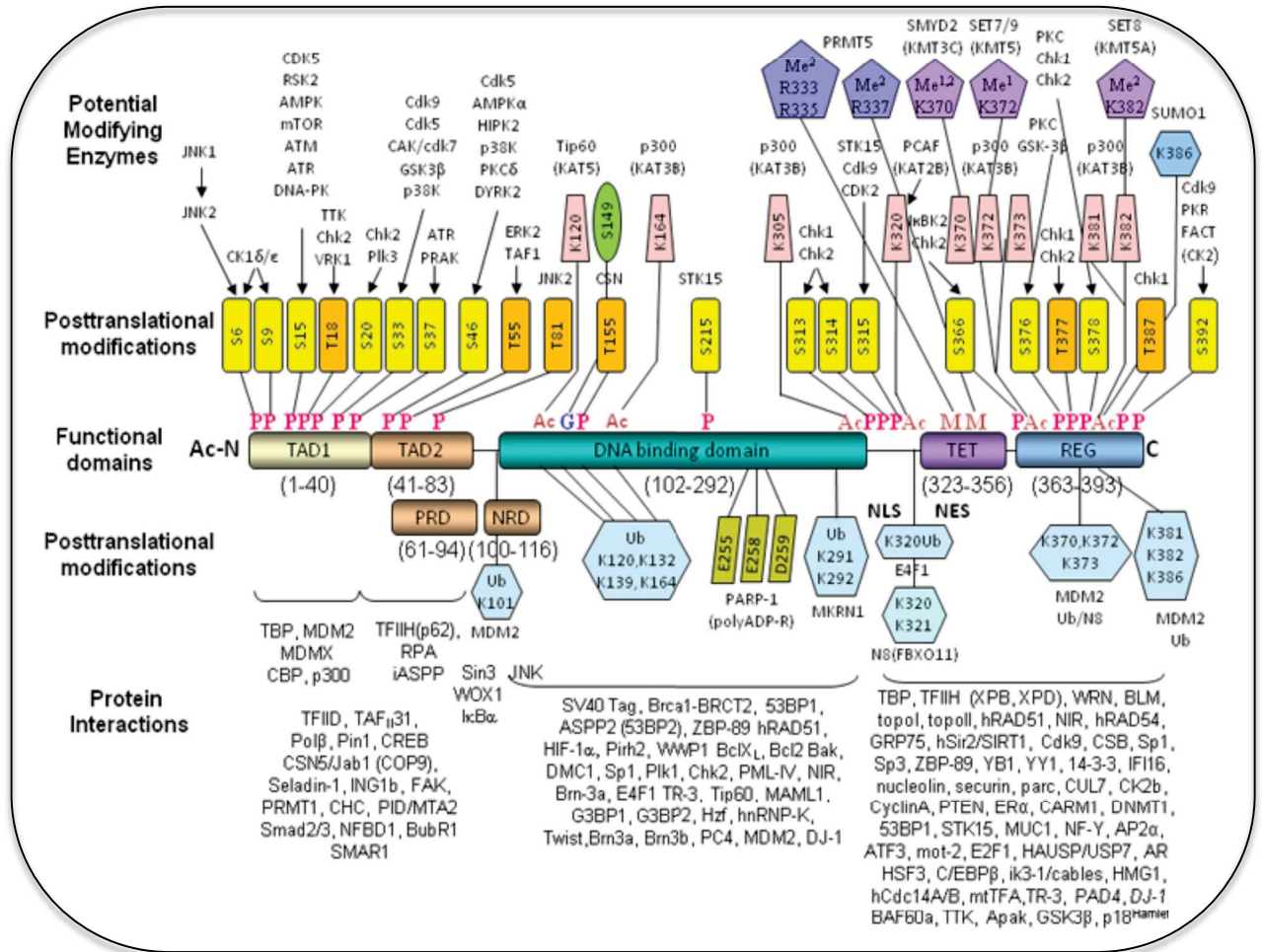


Figure 4: Le code p53.

Description des domaines protéiques, des sites de modifications post-traductionnelles de p53 et de son réseau de régulateurs.

Adaptée à partir de Anderson and Appelle. (2009). Cell Signaling.

Il est clair que p53 peut activer ou réprimer ses gènes cibles et la compréhension de cette régulation fine qui s'opère lors de cette réponse transcriptionnelle continue de croître. Les modifications épigénétiques de son locus, ses modifications post-traductionnelles et ses partenaires d'interactions sont autant d'événements qui fonctionnent en concert afin de déterminer la spécificité de la réponse transcriptionnelle de p53. Intégrer tous ces effets dans un modèle cohérent devrait à terme permettre d'avancer dans la thérapie cancéreuse ou la prévention de désordres physiologiques liés à la dérégulation de p53.

3) p53 et métabolisme:

Des résultats récents suggèrent que les activités de p53 dans la régulation métabolique et ses fonctions antioxydantes pourraient être critiques pour la suppression des tumeurs.

a) p53 régule la phosphorylation oxydative.

p53 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des mitochondries, de la phosphorylation oxydative ainsi que dans la régulation de la glycolyse (**Figure 5**). Plusieurs gènes cibles de p53 ont été identifiées dans le maintien de la phosphorylation oxydative mitochondriale, notamment SCO2 (synthèse de la cytochrome c oxydase 2), AIF (facteur induisant l'apoptose), GLS2 (glutaminase 2). SCO2 est un régulateur clé du complexe cytochrome c oxydase (complexe IV mitochondrial). p53 induit l'expression de SCO2 pour assurer le maintien du complexe cytochrome c oxydase, améliorant ainsi la phosphorylation oxydative (**32**). AIF est nécessaire pour maintenir l'intégrité du complexe mitochondrial I de la chaîne de transport des électrons. p53 induit AIF transcriptionnellement pour promouvoir la phosphorylation oxydative (**33, 34**). GLS2 est une glutaminase mitochondriale qui catalyse l'hydrolyse de la glutamine en glutamate. p53 augmente l'expression de GLS2, ce qui améliore la production de glutamate et de l' α -kétoglutarate dans les cellules, et par conséquent favorise la phosphorylation oxydative et la génération d'ATP (**35, 36**). p53 active également la pyruvate déshydrogénase (PDH) par la répression de la transcription de la pyruvate déshydrogénase kinase-2 (PDK2), qui inhibe la PDH par phosphorylation inhibitrice (**37**). Cette régulation favorise la conversion du pyruvate en acétyl-CoA plutôt qu'en lactate et favorise ainsi la phosphorylation oxydative. En plus de la régulation de la transcription de ses gènes cibles, p53 maintient également la stabilité génétique mitochondriale par son interaction avec la polymérase γ ADNmt en réponse aux dommages de l'ADN mitochondrial (ADNmt) induite par des stress intracellulaires et extracellulaires, y compris les ROS. p53 interagit physiquement avec cette polymérase pour améliorer la réplication de l'ADN. Une perte de p53 augmente la vulnérabilité de l'ADNmt aux dommages, conduisant à une fréquence accrue de mutations de l'ADNmt (**38**). Ces résultats fournissent des preuves solides quant au rôle crucial de p53 dans le maintien de l'intégrité mitochondriale pour favoriser la phosphorylation oxydative.

b) p53 régule la glycolyse:

En plus de favoriser la phosphorylation oxydative mitochondriale, p53 tend à diminuer la glycolyse aérobie *via* la régulation des transporteurs de glucose et des enzymes de la glycolyse (**Figure 5**). p53 réduit l'absorption du glucose par la répression directe de l'expression des gènes des transporteurs de glucose 1 & 4 (GLUT1 et GLUT4) (**39**), et la répression indirecte du transporteur de glucose 3 (GLUT3) (**40**). p53 régule également des enzymes impliquées dans la glycolyse, comme PGAM (phosphoglycérate mutase) et TIGAR (TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator). p53 favorise l'ubiquitinylation et la dégradation des protéines PGAM. La perte de p53 augmente l'expression accrue de PGAM, améliorant ainsi la glycolyse (**41**). TIGAR est une autre cible de p53 pour réguler négativement la glycolyse dans les cellules (**42**). TIGAR fonctionne comme une enzyme qui déphosphoryle le fructose-2,6-bisphosphate en fructose-6-phosphate. Cette activité de TIGAR contrecarre celle de la phosphofructokinase, une enzyme clé dans la régulation de la glycolyse. En abaissant les taux intracellulaires de fructose-2,6-bisphosphate, TIGAR réduit la glycolyse et détourne le catabolisme du glucose vers la voie des pentoses phosphates (PPP). La voie des pentoses phosphates est importante pour le métabolisme du glucose dans les cellules cancéreuses. p53 se lie directement à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), première enzyme limitante dans la voie des pentoses phosphates (**43**). Par inhibition de la voie des pentoses phosphates, p53 empêche la biosynthèse de composés essentiels pour les cellules cancéreuses.

La voie de biosynthèse de la sérine, une autre voie anabolique annexe de la glycolyse, est aussi régulée par p53. La phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) est une enzyme indispensable dans cette biosynthèse. Elle est négativement régulée par p53 conduisant à l'apoptose de ces cellules (44).

De plus p53 peut aussi réguler la glycolyse par les voies de signalisation PI3K/AKT et mTOR. L'activation aberrante de ces deux voies a souvent été observée dans diverses tumeurs pour jouer un rôle important dans la stimulation de la glycolyse afin de maintenir la croissance et la prolifération des cellules tumorales (45, 46). p53 régule négativement ces deux voies par induction d'un groupe de gènes cibles qui agissent comme des régulateurs négatifs de ces deux voies. p53 induit l'IGF-BP3 (facteur de croissance insulino-mimétique de type protéine de liaison 3), qui se lie à l'IGF1 et empêche sa liaison aux récepteurs de l'IGF, ce qui entraîne la régulation à la baisse de la signalisation PI3K/AKT (47, 48). p53 induit également PTEN pour réguler négativement la signalisation PI3K/AKT (49, 50). PTEN déphosphoryle le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3), second messenger produit par la PI3K, et ainsi inhibe la voie de signalisation PI3K/AKT. Enfin l'AMPK est un régulateur négatif important en amont de mTOR. p53 active l'AMPK par son induction de l'AMPK- β et SESTRINES 1/2, ce qui conduit à la régulation négative de l'activité de mTOR (50, 51). p53 induit également TSC2 pour réguler négativement l'activité de mTOR (50, 52). Grâce à la régulation de ses nombreuses cibles, p53 régule négativement les activités de ces deux voies, qui conduisent à l'inhibition de la glycolyse dans les cellules.

c) p53 régule la glutaminolyse et le métabolisme des lipides:

En plus du métabolisme du glucose, p53 régule de nombreux autres aspects du métabolisme cellulaire, y compris la glutaminolyse et l'oxydation des acides gras (Figure 5). Déjà cité, p53 augmente l'expression de GLS2, augmentant la production de glutamate et d' α -kétoglutarate dans les cellules. Dans le même temps, GLS2 augmente les niveaux de glutathion (GSH) en augmentant les taux de glutamate intracellulaire qui est un précurseur essentiel pour la biosynthèse du tri-peptide glutathion et de la lutte antioxydante. De plus, il a été rapporté que les niveaux protéiques de GLS2 sont significativement réduits dans le foie et les tumeurs cérébrales reflétant une réponse anti oxydante médiée par p53 altérée (35, 36, 53).

De nombreuses études montrent également que p53 est impliquée dans le métabolisme des lipides. En réponse à la déprivation nutritionnelle, p53 induit l'oxydation des acides gras pour alimenter le cycle de Krebs afin de fournir l'énergie nécessaire aux cellules pour survivre (Figure 5). La Lipin1 a récemment été identifié comme étant un autre gène cible de p53 impliqué dans l'oxydation des acides gras. Lipin1 est essentiel pour le développement du tissu adipeux normal et est également un régulateur important du métabolisme des acides gras (54, 55, 56).

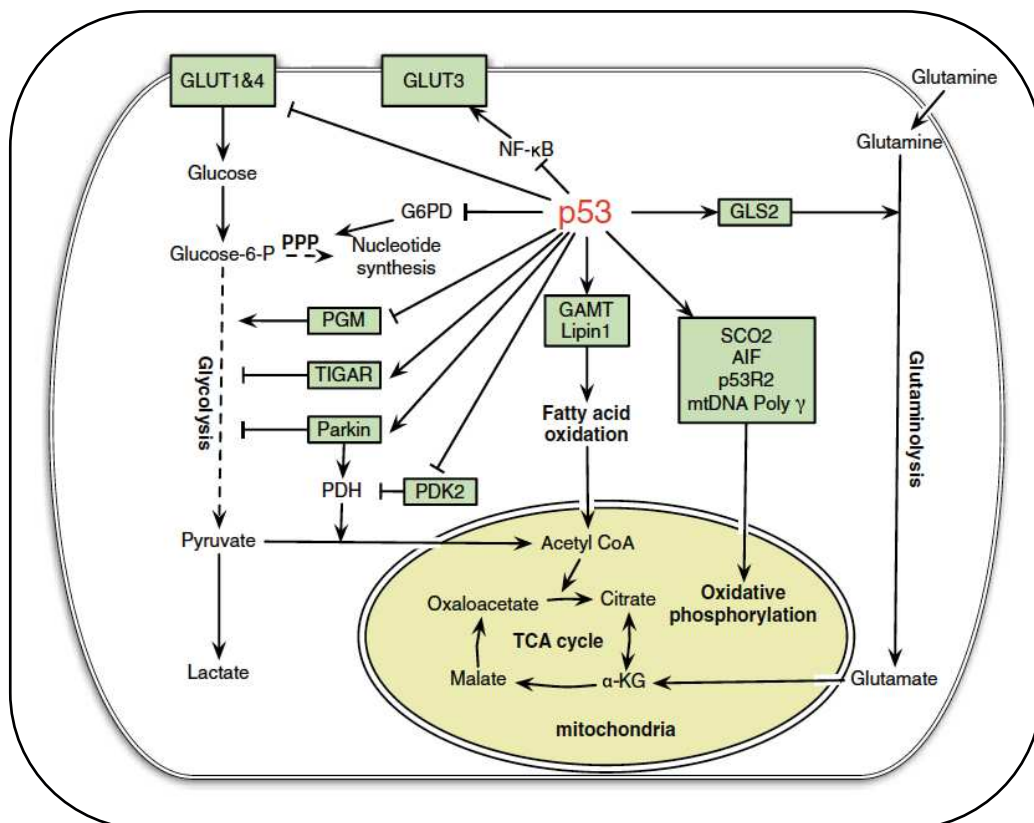


Figure 5: La régulation du métabolisme cellulaire par p53

p53 régule la phosphorylation oxydative, la glycolyse, la glutaminolyse et l'oxydation des acides gras dans les cellules.

Adaptée à partir de Liang Y. et al (2013). Cell and bioscience.

d) p53 régule les défenses anti-oxydantes:

Le stress oxydatif et l'augmentation des niveaux de ROS dans les cellules jouent un rôle important dans la tumorigenèse. Des études récentes ont montré que la réduction des taux de ROS et le renforcement de la défense anti-oxydante sont des mécanismes importants médiés par le suppresseur de tumeur p53. La phosphorylation oxydative mitochondriale est une source principale de ROS endogène dans les cellules. Considérant que p53 favorise la phosphorylation oxydative pour maintenir l'homéostasie du métabolisme énergétique cellulaire, p53 joue également un rôle fondamental dans la réduction des taux de ROS intracellulaires. Pour exercer sa fonction antioxydante, p53 induit un groupe de gènes antioxydants, SESTRINES 1/2, TIGAR, GPX1, ALDH4 et MCG2 pour abaisser les niveaux de ROS et prévenir les dommages à l'ADN (42, 57, 58). GPX1 est une enzyme anti-oxydante primaire qui débarrasse les cellules du peroxyde d'hydrogène ou des hydroperoxydes (57). L'ALDH4 est une enzyme de la matrice mitochondriale dépendante du NAD⁺, qui catalyse la dégradation de la proline dans les mitochondries et réduit ainsi les niveaux de ROS intracellulaires (58). En plus de la régulation de la transcription directe des gènes antioxydants, p53 réduit également les niveaux de ROS dans les cellules en favorisant la stabilisation de NRF2 à travers p21 (59). En tant que facteur de transcription, NRF2 induit plusieurs gènes antioxydants, et joue donc un rôle essentiel dans la défense antioxydante dans les cellules. Dans des conditions basales, NRF2 est en permanence ubiquitinylé par le complexe CUL3-ligase et

Keap1. En réponse au stress oxydatif, l'induction de p21 par p53 inhibe l'interaction entre NRF2 et Keap1, ce qui conduit à l'augmentation de NRF2 (59).

II - L'oncogène *Mdm2*

A l'origine, le gène *Mdm2* a d'abord été identifié comme un gène responsable de la transformation spontanée de lignée cellulaire immortalisée BALB/c3T3. Dans ces cellules, *Mdm2* fut localisé sur des corps nucléaires d'ADN extra chromosomiques et acentromériques, appelés "double minute", qui étaient maintenus dans la cellule uniquement si ils lui conféraient un avantage sélectif, d'où son nom de Murine Double minute 2 (*Mdm2*). Puis des études de culture cellulaire ont démontré que la simple surexpression de MDM2 rendait des fibroblastes tumorigènes chez les souris nues, le plaçant ainsi dans le cercle fermé des oncogènes avérés. Le gène *Mdm2* fût ensuite cloné et cartographié sur le chromosome 12q13-14 (60). Ces travaux ont permis de mettre en évidence que le gène *Mdm2* comprenait deux promoteurs nommés P1 et P2. Le promoteur P1 est connu pour être une cible de la voie PTEN/PI3K/AKT qui lui permet ainsi de moduler la transcription de *Mdm2* indépendamment de p53, alors que le fonctionnement du promoteur P2 est dépendant de p53. Dans des conditions normales, MDM2 est exprimé dans le noyau, mais il transloque vers le cytoplasme pour induire la dégradation de certaines de ses cibles par le protéasome. Le potentiel transformant de MDM2 fut rapidement associé à sa capacité à lier et inhiber le suppresseur de tumeur p53 (61). D'une façon générale, le gène *Mdm2* est amplifié dans 10% des cancers humains avec une fréquence plus élevée dans les tumeurs des tissus mous, les cancers de l'estomac, du foie, et les maladies de Hodgkin (62, 63). Dans les cancers sans amplification apparente de *Mdm2*, il a été montré que le niveau transcriptionnel de l'ARN messager (ARNm) de *Mdm2* pouvait également être augmenté (64, 65). A la même période, des études ont montré que le gène *Mdm2* était amplifié dans plus d'un tiers des sarcomes incluant les cancers des tissus mous. Parmi ces cancers, les liposarcomes (LPS) sont un sous type de tumeurs dérivées du lignage adipocytaire qui sont caractérisées par l'amplification de la région q13-15 du chromosome 12 qui contient le gène *Mdm2*. La fréquence de cette altération cytogénétique dans les LPS (100% pour *Mdm2*) est telle que son amplification est dorénavant utilisée en clinique pour distinguer les LPS des autres types de sarcomes (66). Dans ce type de tumeur, l'amplification génique de *Mdm2* est principalement couplée avec un statut de p53 sauvage. Cette observation confirme le rôle de MDM2 vis à vis de p53 mais pose également des questions intéressantes quant à l'origine de la pression de sélection aboutissant à l'amplification systématique de *Mdm2* dans ce type tumoral.

1) MDM2, d'un point de vue structural:

La protéine MDM2, est une protéine ubiquitaire constituée de 491 acides aminés (489 acides aminés chez la souris), avec un poids moléculaire apparent de 90 kDa. Elle est codée par le gène *Mdm2*, qui est composé de 12 exons pouvant générer plusieurs isoformes provenant d'évènements d'épissages alternatifs et/ou de l'utilisation de promoteurs distincts (Figure 6). Il existe deux promoteurs différents (P1 et P2), dont le second comporte un élément de réponse à p53.

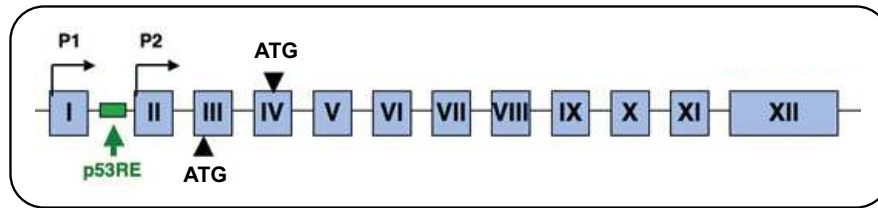


Figure 6: La structure du gène *Mdm2*.

Structure du gène *Mdm2* composé de deux promoteurs et deux codons d'initiation AUG permettant la synthèse de deux protéines MDM2 différentes d'une vingtaine de kilo dalton (Kd).

Adaptée du site internet TP53 www.p53.free.fr.

Ces promoteurs génèrent deux protéines, la protéine entière p90, et une plus courte p76, initiée au niveau d'un codon initiateur ATG interne (67, 68, 69). Il est à noter que p76 ne comporte pas de domaine de liaison à p53, et peut agir comme un inhibiteur dominant négatif de p90, conduisant ainsi à l'activation de p53 (70). Différents évènements d'épissage alternatif du gène *Mdm2* peuvent également générer des petites protéines tronquées qui ont été détectées dans de nombreuses tumeurs humaines ou murines (71, 72). Chez l'homme, Mdm2-A, Mdm2-B et Mdm2-C sont les variants d'épissages majeurs (Figure 7). Aucun de ces produits ne contient le domaine de liaison à p53 mais possèdent encore la partie C terminale contenant le domaine E3 ligase. Ces variants d'épissage sont souvent surexprimés dans les cancers, suggérant qu'ils ont une importance dans la tumorigénèse. En effet une étude sur Mdm2-B montre que ce variant d'épissage est capable d'interagir avec MDM2-FL (« full length ») et inhiber sa fonction de dégradation envers p53. Sachant que de nombreuses tumeurs arborent des mutants de p53 appelés GOF (« gain of function »), l'isoforme Mdm2-B induit une accumulation des formes mutées de p53 et contribue à la progression tumorale et aux métastases (73).

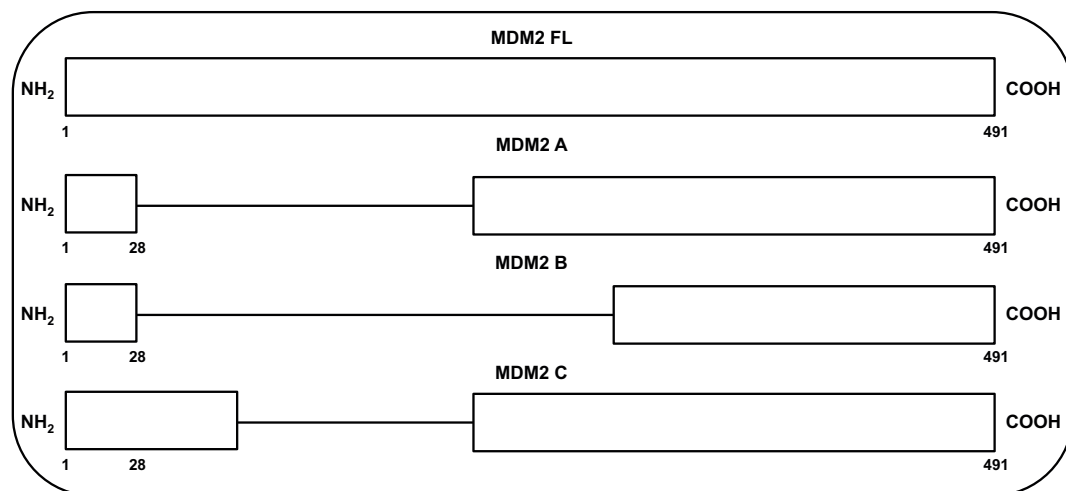


Figure 7: Les principaux variants de MDM2.

Principaux variants de MDM2 retrouvés dans les cancers humains.

2) Les motifs protéiques de MDM2:

Parmi les motifs protéiques caractérisés de MDM2 (**Figure 8**) se trouve le domaine de liaison à p53. Ce domaine est codé par les 100 premiers acides aminés de MDM2, situés dans l'extrémité amino-terminale de la protéine. Ce domaine peut se lier au niveau du domaine de transactivation de p53 et ainsi, par cette simple liaison, empêcher p53 de s'associer avec la machinerie de transcription.

D'autres motifs de MDM2 jouent sur sa localisation subcellulaire. Parmi ces motifs se trouvent un signal de localisation nucléaire NLS (« Nuclear Localization Signal »), et un signal d'export nucléaire NES (« Nuclear Export Signal »). Ces signaux permettent à la protéine d'être localisée dans le cytoplasme ou le noyau, et fournissent un autre mécanisme par lequel l'activité de p53 est étroitement régulée (**74, 75**). MDM2 comporte également une séquence de localisation nucléolaire NoLS (**76**), bien que la relevance physiologique de cette régulation ne soit pas encore connue.

Parmi les autres motifs de MDM2, on retrouve également un domaine acide central, appelé ainsi en raison de sa richesse en acides aminés acides, qui est nécessaire pour l'interaction de MDM2 avec d'autres protéines cellulaires. Il permet notamment l'interaction avec les protéines ribosomales L5 (**77**), L11 (**78**), et L23 (**79**), mais également avec la protéine p300/CBP (CREB-Binding Protein), avec qui MDM2 promeut la poly-ubiquitinylation de p53 (**80, 81**), ou encore avec le suppresseur de tumeur p14^{ARF} (**82, 83, 84**). Enfin, des données récentes suggèrent que ce domaine acide serait également capable de lier p53, et de changer sa conformation, ce qui empêcherait alors sa liaison à l'ADN (**85**). De plus, ce domaine acide serait important pour la dégradation de p53 médiée par MDM2, puisque un mutant de MDM2 comportant une délétion de 100 résidus à l'intérieur du domaine acide bloque la capacité de MDM2 à dégrader p53. Il est décrit que les charges négatives du domaine acide sont indispensables pour l'activation du domaine E3 qui possède des caractéristiques hydrophobiques. Ainsi au travers de la phosphorylation du domaine acide (par la kinase ATM) ou encore par certaines interactions protéiques (comme avec ARF), certains régulateurs de MDM2 jouent négativement sur la conformation de la protéine bloquant l'interaction du domaine acide avec le domaine E3 diminuant ainsi l'efficacité de son activité ligase (**86**).

En aval de ce domaine acide se trouve un domaine en doigt de zinc dont la fonction est encore mal connue. Cependant, des études récentes suggèrent qu'il serait essentiel pour l'interaction avec MDMX et la kinase CK1- α (Casein Kinase 1 alpha) (**87**). Plus récemment, des études *in vitro* ont montré que ce domaine à doigt de zinc de MDM2 pourrait lier l'ADN (**88**). Ces résultats prometteurs restent à être reproduits *in cellulo*, mais permettent d'envisager un possible rôle de MDM2 directement au niveau de l'ADN.

Enfin, la principale fonction de MDM2 implique son domaine RING situé à son extrémité C-terminale, qui lui confère une fonction d'E3-ligase. De plus, l'intégrité du domaine RING est requise pour son homo- ou son hétéro-dimérisation avec MDMX (**89, 90**). Enfin, d'autres études ont montré que le domaine RING serait impliqué dans l'interaction directe avec des ARNs (**91, 92**), au niveau des séquences consensus T7EBSp6 (**93, 94**). De plus, il a été montré que MDM2 est capable d'interagir avec l'ARNm de p53 pour promouvoir sa traduction (**95**). Cependant, une étude a récemment montré que suite à des dommages à l'ADN, cette interaction conduit à une augmentation de la traduction de l'ARNm de p53 (**96**), suggérant que MDM2, en plus de la régulation négative, exerce une régulation positive dans la modulation de l'activité de p53.

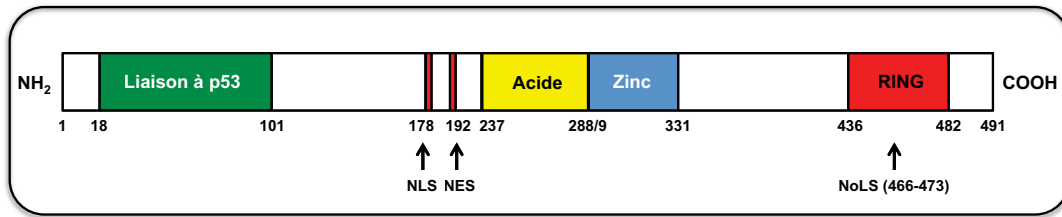


Figure 8: La structure de la protéine MDM2.

Schéma de la structure protéique de MDM2. La protéine MDM2 est constituée de plusieurs domaines essentiels à ses fonctions.

Adapté du site internet TP53 www.p53.free.fr.

3) Activité E3 ligase :

MDM2 appartient à la grande famille des protéines à domaine RING (« Really Interesting Novel Gene »), qui comprend plus de 200 membres, et MDM2 fonctionne principalement, mais non exclusivement, comme une E3-ligase pour l'ubiquitine (97). Le domaine RING de MDM2, responsable de l'ubiquitinylation de ses substrats, dans la partie C terminale de la protéine est fortement conservé parmi les orthologues de MDM2.

De part ce domaine, MDM2 cible de nombreux substrats pour leur mono- et/ou leur poly-ubiquitinylation. Cependant, MDM2 a également été montré capable de sumoyler ou de neddyler certains substrats. Ces modifications post-traductionnelles régulent l'activité de ses cibles, en contrôlant leur interaction avec des partenaires, leur localisation, mais également leur stabilité (l'ubiquitinylation étant généralement un signal de dégradation par le protéasome). L'ubiquitinylation est une série complexe d'étapes qui requiert les actions de trois enzymes. L'enzyme E1 est responsable de l'activation de l'ubiquitine via la liaison thioester entre la glycine C terminale de l'ubiquitine et un résidu cystéine de l'enzyme. L'ubiquitine alors activée est ensuite prise en charge par une enzyme E2 qui va la transférer sur une enzyme E3 ligase. L'E3 ligase apporte la spécificité envers le substrat qui va donc être ubiquitinylé. La coopération entre ces trois enzymes aboutit à la poly-ubiquitinylation du substrat qui est alors reconnu comme prêt à être dégradé par le protéasome 26S (Figure 9).

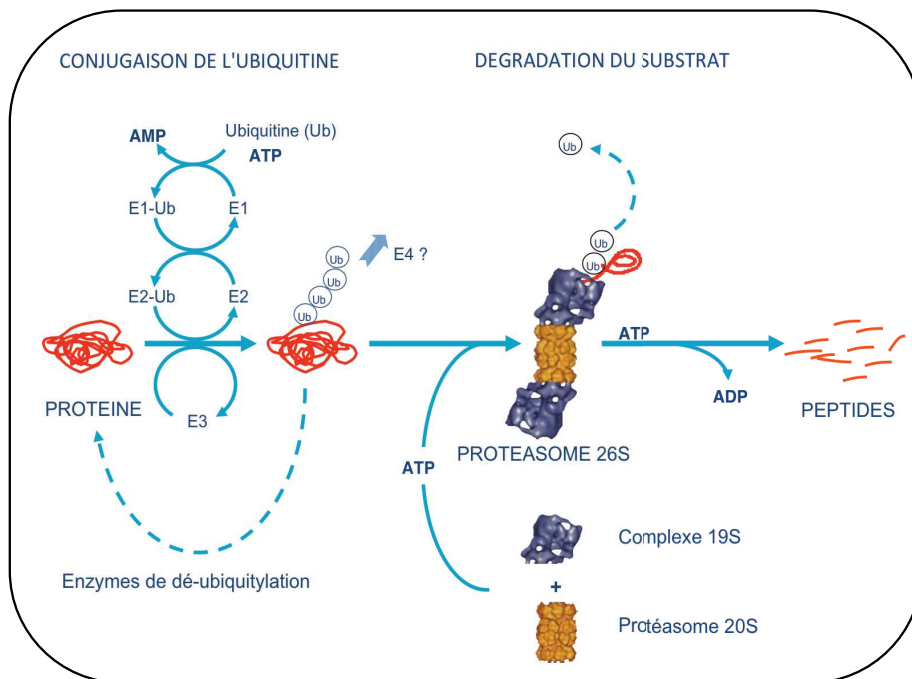


Figure 9: Mode d'action des enzymes qui conduisent à la dégradation protéique.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un système multienzymatique extrêmement complexe, qui fonctionne schématiquement en deux étapes distinctes dans la dégradation régulée des protéines intracellulaires.

Adapté de 'Protéasome, ubiquitine et protéines apparentées à l'ubiquitine' de Oliver Coux

Il est à noter que certains substrats sont uniquement mono-ubiquitinylés. Ce mécanisme est retrouvé lors de l'endocytose de récepteurs, le bourgeonnement viral, la transcription, la réparation de l'ADN, ou encore le recrutement de caspases au cours de l'apoptose, l'exemple type étant l'ubiquitinylation de p53 par E4F1 (98, 99). La monoubiquitylation de p53 par MDM2 sur la lysine K320 semble jouer un rôle sur sa localisation subcellulaire.

Cependant, il est intéressant de noter que les fonctions physiologiques de la poly-ubiquitinylation dépendent de la nature des liaisons entre les ubiquitines de la chaîne. Celle-ci fait intervenir 8 différents types de liaison. Sept d'entre elles se font au travers de la liaison d'une des sept lysines (K) d'une molécule d'ubiquitine (K48, K63, K6, K11, K27, K29 et K33) avec la glycine de l'extrémité C-terminale de la suivante (100, 101). Dans la huitième, la liaison implique un groupement méthionine en position amino-terminale de l'ubiquitine avec une glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine suivante (102). Chaque type de chaînes semble associé à un processus biologique prépondérant. Ainsi, les chaînes de type K48 et K63 sont impliqués respectivement dans la dégradation protéique par la voie du protéasome (103), dans le recrutement des enzymes de réparation de l'ADN, la signalisation cellulaire et l'endocytose (104).

4) MDM2 est le régulateur principal de p53 :

Les travaux les plus complets concernent l'étude du rôle de MDM2 comme régulateur négatif de p53 au travers de son ubiquitinylation (105, 106, 107, 108). L'étroite relation entre p53 et MDM2 a été déterminée lors de la génération de souris knock-out (KO) pour *Mdm2*. L'inactivation homozygote de *Mdm2* conduit à une létalité embryonnaire

précoce (autour de 5.5 jours *post-coitum*), autour du stade de l'implantation. Les études détaillées de différents modèles génétiques (KO constitutifs ou conditionnels pour *Mdm2*) montrent que l'absence de MDM2 conduit à l'induction d'une réponse de mort cellulaire impliquant en grande partie p53 (109, 110, 111, 112, 113, 114). En effet, l'inactivation concomitante de p53 restaure la viabilité des animaux *Mdm2* KO qui ne présentent alors pas d'autres phénotypes majeurs que ceux associés à l'inactivation de p53. Afin d'étudier les contributions physiologiques de MDM2 sur la régulation de p53 à des stades plus tardifs du développement ou chez l'adulte, des KO conditionnels basés sur la technologie Cre/Lox ou des allèles hypomorphes ont été générés. Ainsi pour comprendre comment MDM2 régule l'activité de p53 de façon tissu spécifique ou type cellulaire spécifique, certains laboratoires ont généré des modèles de délétion de *Mdm2* dans le cœur, l'intestin, les testicules, le thymus, la rate, le foie, ou le système hématopoïétique. Dans la majorité des cas cette délétion conduit à une réponse apoptotique impliquant p53 (115, 116). Ces données génétiques très claires tendent à démontrer que la régulation de p53 *in vivo* dépend majoritairement de MDM2. Cependant, des analyses plus poussées des animaux *Mdm2* KO; p53 KO laissent à penser que les fonctions indépendantes de MDM2 ont été sous-estimées (117 et données non publiées de notre laboratoire).

D'un point de vue *in cellulo* p53 est presque non détectable dans les cellules normales car il possède une demi-vie très courte, de l'ordre de 5 à 30 minutes. Ce turnover rapide de la protéine est dû à sa dégradation par le système ubiquitine/protéasome, comme c'est le cas pour 70% des protéines cellulaires. MDM2 est le principal régulateur négatif de p53 et participe activement à sa dégradation. En effet MDM2 est capable d'inhiber l'activité de p53 via deux actions principales. La première étant par interaction directe avec celui-ci, ayant pour cause de masquer son domaine de transactivation et donc d'empêcher le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base. La seconde via régulation de la stabilité et la localisation de p53. Comme rapporté plus haut MDM2 fonctionne comme une E3-ligase en initiant au travers de la mono-ubiquitinylation de p53 la formation de chaînes de poly-ubiquitines au niveau de l'extrémité C-terminale de p53 (sur les résidus lysines K370, K372, K373, K381, K382 et K386). En effet MDM2 est requis mais n'est pas suffisant pour l'ubiquitinylation qui provoque la dégradation de p53. L'ubiquitinylation de p53 ne semble pas être un simple événement qui se déroule en une étape mais doit faire intervenir d'autres acteurs. La distinction entre mono et poly-ubiquitinylation de p53 ajoute une complexité supplémentaire à sa régulation. MDM2 possède une activité E3 ligase et catalyse préférentiellement la mono-ubiquitinylation de p53. Cette mono-ubiquitinylation entraîne l'export nucléaire de p53 (118). Puisqu'une chaîne d'au moins 4 molécules d'ubiquitine est reconnue comme étant nécessaire pour une dégradation efficace par le protéasome (119), d'autres protéines sont donc nécessaires pour aider à la poly-ubiquitinylation de p53. C'est dans le cytoplasme que p53 est poly-ubiquitinylé, signal nécessaire pour être dégradé par le protéasome en absence de stress. Récemment, les protéines CBP et p300, initialement décrites comme des acétyl-transférases, ont été proposées jouer le rôle d'E4 ligases pour favoriser la poly-ubiquitinylation de p53 (120). La réaction de poly-ubiquitinylation de p53 catalysée par CBP et p300 requiert néanmoins l'étape de mono-ubiquitinylation médiée par MDM2. Il est important de noter que l'ubiquitinylation est un processus réversible et HAUSP, une des principales enzymes de dé-ubiquitinylation, enlève l'ubiquitine conjuguée à p53 afin d'induire sa stabilisation (121). Les enzymes de dé-ubiquitinylation, dont HAUSP, ajoutent un nouveau niveau de régulation de p53 en antagonisant sa dégradation initiée par MDM2.

La relation entre MDM2 et p53 n'est pas unidirectionnelle. Malgré la régulation négative de p53 par MDM2, p53 régule positivement MDM2 en agissant en tant que facteur de transcription sur le gène *Mdm2* (Figure 10). Cette relation entre MDM2 et p53 forme une boucle de rétrocontrôle négative qui illustre le côté simple de cette relation qui est incluse

dans un réseau complexe de régulation faisant intervenir de nombreux autres acteurs cellulaires notamment dans le cas de stress cellulaires.

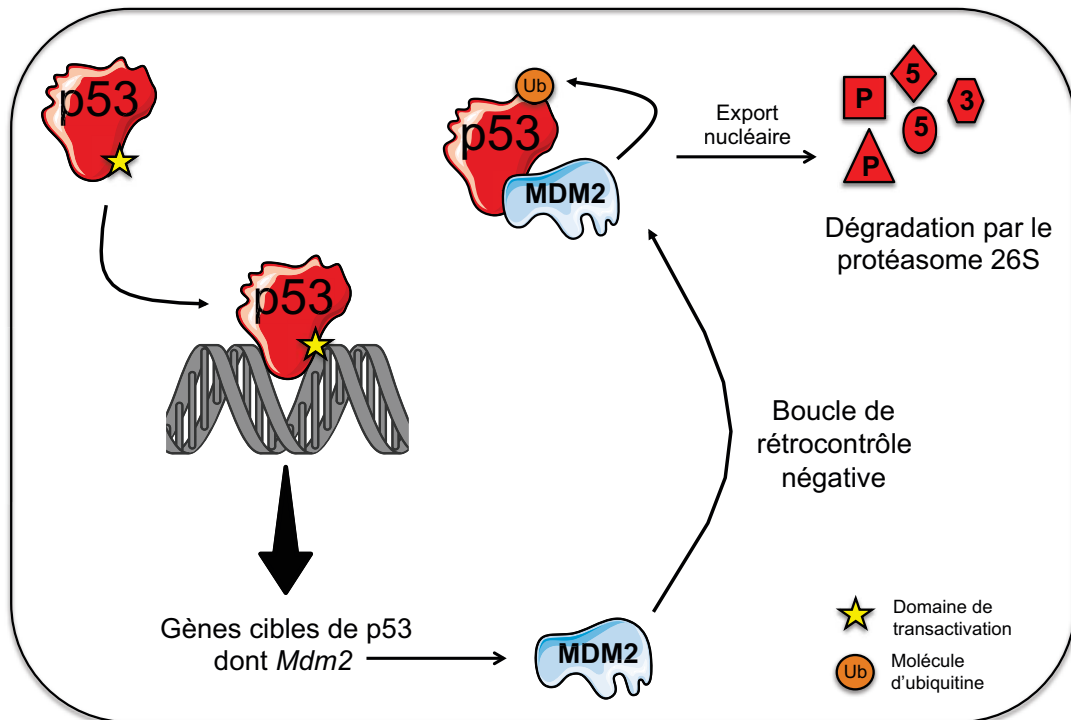


Figure 10: Boucle de rétrocontrôle impliquant p53 et MDM2.

Schéma de la régulation de p53 par MDM2. MDM2 inhibe p53 au travers de différents moyens en vue d'inhiber son action. Lors de stress cellulaire p53 active ses gènes cibles dont Mdm2 lui-même qui va alors agir dans une boucle de rétrocontrôle négatif permettant de limiter la durée d'activation de p53.

Adapté de Chène *et al.* 2003

5) Fonctions de MDM2 indépendantes de p53 :

Malgré le fait que MDM2 ait été caractérisé comme un régulateur essentiel de p53, des données de plus en plus nombreuses soutiennent des fonctions de MDM2 indépendantes de p53. En effet, parmi les nombreuses protéines avec lesquelles MDM2 interagit, la plupart ont des effets sur le contrôle de la prolifération cellulaire, la détermination du destin cellulaire, la réparation de l'ADN, et d'autres processus qui peuvent également contribuer à son potentiel oncogénique (122). Ci-dessous se trouve une liste non exhaustive des principaux partenaires de MDM2 identifiés jusqu'à présent et les fonctions associées (Figure 11).

a) Contrôle du cycle cellulaire :

MDM2 a été décrit comme un régulateur de l'activité de pRB (« Retinoblastoma protein »), un suppresseur de tumeur impliqué dans l'inhibition du cycle cellulaire (123). MDM2 peut former un complexe avec pRB *in vivo*, perturbant ainsi l'arrêt cellulaire en G1 médié par pRB. Mdm2 est également capable d'interagir directement avec une des cibles principales de pRB, le facteur de transcription E2F1/DP1, qui joue un rôle important dans l'entrée en phase S (124, 125).

MDM2 joue également un rôle sur la prolifération cellulaire via son interaction physique avec p21. En effet, MDM2 fonctionne comme un régulateur négatif de p21 en réduisant la stabilité de la protéine via sa dégradation par le protéasome 20S. En effet il a été décrit que p21 se lie à la sous unité C8 du protéasome 20S (corps protéolytique du protéasome 26S), entraînant ainsi sa dégradation (126). De façon intéressante, les effets de MDM2 sur la stabilité de p21 sont indépendants de son activité E3 ligase (127).

Une interaction *in vivo* a aussi été reportée entre MDM2 et le suppresseur de tumeur PML (Promyelocytic Leukemia Protein), une protéine multifonctionnelle capable, entre autre, d'inhiber la prolifération, ou encore d'induire la sénescence ou l'apoptose. MDM2 inhibe PML en l'excluant du noyau, bloquant ainsi son activité (128).

MDM2 interagit et inhibe également MTBP (Mdm2 Binding Protein), empêchant de ce fait l'arrêt du cycle en G1 induit par MTBP (129).

Des études ont également montré que MDM2 était capable d'induire la résistance des cellules au TGF- β (Transforming Growth Factor β), surmontant ainsi l'arrêt du cycle en G1 (130).

Une autre étude a montré que MDM2 interagit et ubiquitinylyle ATF3, conduisant alors à sa dégradation (131). ATF3 est un facteur de transcription de la famille CREB/ATF (132), dont l'expression est fortement induite par une large variété de stress cellulaire, tels que les dommages à l'ADN ou l'hypoxie, et qui est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (133, 134).

Enfin, il a été reporté que MDM2 était capable d'interagir et de réguler les membres de la famille FOXO (Forkhead box), notamment FOXO-1, -3a et -4. MDM2 est une E3-ligase d'ubiquitine pour ces facteurs de transcription conduisant dans le cas de FOXO-1 et -3 à leur poly-ubiquitinylation et leur dégradation (135), et à la mono-ubiquitinylation de FOXO-4, réprimant par ce biais son activité transcriptionnelle (136).

b) Différenciation cellulaire :

Dans un modèle de souris sur exprimant MDM2 sous le contrôle d'un promoteur HCMV, il apparait que MDM2 induit des phénotypes marqués au niveau de la peau avec en particulier un défaut de différenciation, indépendamment de p53 (137). Cependant les mécanismes moléculaires de cette activité sont encore inconnus.

MDM2 semble aussi jouer un rôle dans la différenciation des cellules musculaires. Il a notamment été montré que lorsque *Mdm2* était amplifié dans les rhabdomyosarcomes, un type tumoral issu du lignage musculaire squelettique, il interférait avec l'activité de MyoD et inhibait ainsi la différenciation musculaire (138).

La protéine NUMB fut isolée lors d'un crible destiné à identifier des facteurs qui interagissent avec MDM2 (139). La protéine NUMB est notamment impliquée dans la différenciation des cellules souches neurales. Il a été montré que MDM2 est capable de se lier à NUMB, d'altérer sa localisation nucléaire, et de promouvoir sa dégradation en l'ubiquitinylant (140).

MDM2 a été impliqué dans l'initiation de la différenciation adipocytaire. MDM2 est requis pour l'expression de C/EBP δ en facilitant notamment le recrutement de CREB (cAMP

Regulatory Element-Binding protein) sur son promoteur. Au travers de la régulation de la transactivation dépendante de CREB, MDM2 semble capable de promouvoir l'adipogenèse (**141**).

Pour finir des études récentes montrent que MDM2 supprime l'expression d'un ensemble de gènes associés à la différenciation cellulaire. Cette fonction est requise pour induire la pluripotence, supprimer la différenciation des cellules souches mésenchymateuses multipotentes ostéoblastes et permettre la prolifération des cellules cancéreuses. Le mécanisme clé, en partie, responsable de ces fonctions de MDM2 indépendantes de p53 se fait au travers de son interaction avec le complexe polycomb repressor complex 2 (PRC2). L'interaction de MDM2 avec PRC2 promeut ses effets épigénétiques sur ses gènes cibles qui font intervenir la mono-ubiquitinylation de l'histone H2A sur la lysine 119 (H2AK119) et la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) (**142**).

c) Régulation transcriptionnelle :

Comme évoqué dans les chapitres précédents, MDM2 est capable d'interagir avec certains composants de la machinerie transcriptionnelle. Il a notamment été montré qu'il était capable d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec deux sous unités du complexe TFIID: TBP et TAF_{II}250 (TBP-Associated Factor) (**143**). Par ce biais, MDM2 est ainsi capable d'activer certains gènes spécifiques, tel que la *Cycline A*. Cependant, lorsqu'il est surexprimé, il est observé une répression de ces mêmes gènes, certainement par titration du complexe de transcription.

Enfin, MDM2 a également été reporté comme un inducteur de l'expression de la sous-unité p65 de NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B), au travers d'un effet sur le promoteur de p65 (**144**). Cette induction conduit à l'activation de NF- κ B. Cependant, des études récentes ont montré en revanche, que si la voie NF- κ B était déjà activée dans des cellules, MDM2 induit alors une inhibition de NF- κ B, et une induction de l'apoptose (**145**).

d) Réparation de l'ADN :

Des études précédentes ont montré que Mdm2 pouvait interagir et stimuler l'activité de l'ADN polymérase ϵ (également appelée PolH) à la fois *in vitro* et *in vivo* (**146, 147**) Cette polymérase joue un rôle important dans la réparation de l'ADN, et dans la tolérance aux dommages pendant la réplication de l'ADN. Récemment, il a été reporté que MDM2 était également une E3-ligase pour la polymérase ϵ , et qu'elle conduisait à sa dégradation (**148**), notamment en réponse aux irradiations par les rayons ultra-violet (UV).

MDM2 est également capable de s'associer à NBS1 et ainsi inhiber le complexe de réparation des cassures de l'ADN double brin impliquant MRE11, NBS1, RAD50 (**149**). Ce complexe est notamment impliqué dans la préservation de la stabilité du génome, dans les points de contrôle du cycle cellulaire, et la maintenance des télomères (**150**).

e) Biosynthèse des ribosomes :

Une fonction potentielle de MDM2 dans la biosynthèse des ribosomes, ou dans la régulation de la traduction, a été suggérée au regard de son interaction spécifique avec la nucléostémine (**151**) et les protéines ribosomales L5 (**152**), L11 (**153**), L23 (**154**), L26 (**155**) et S7 (**156**) ce qui semble corrélér avec la relocalisation de MDM2 au niveau du

nucléole, le site de synthèse des pré ribosomes qui composeront ensuite dans le cytoplasme les ribosomes important pour la synthèse protéique.

f) Hypoxie :

Au cours de l'hypoxie dans des cellules tumorales, MDM2 se lie à la sous-unité α de HIF1 (Hypoxia-Inducible Factor 1), un facteur de transcription clé de la réponse à l'hypoxie. MDM2, participe à son activation et l'expression de ses gènes cibles (**157**), contribuant ainsi à la progression tumorale et à l'angiogenèse. Il est intéressant de noter que la présence de p53 affecte cette régulation, puisque dans ce cas, un complexe ternaire peut se former entre p53, MDM2, et HIF-1, et ainsi empêcher la transactivation des gènes cibles de HIF1 (**158, 159**).

g) Dégradation de récepteurs transmembranaires ? :

MDM2 a été montré comme étant un facteur clé de la séquestration à la surface cellulaire du récepteur β 2-AR (β 2-Adrenergic Receptor), au travers de l'interaction et de l'ubiquitinylation de l'arrestine β (**160**), une protéine adaptatrice régulant notamment la désensibilisation et l'internalisation de ce récepteur impliqué dans la relaxation musculaire.

h) Apoptose, et inhibition de croissance :

De façon surprenante, plusieurs études rapportent que MDM2 interviendrait dans l'induction de phénotypes apoptotiques et d'arrêt de prolifération cellulaire, en absence de p53, lorsqu'il est surexprimé, ce qui semble paradoxal étant donné son activité oncogénique établie (**161, 162, 163, 164**).

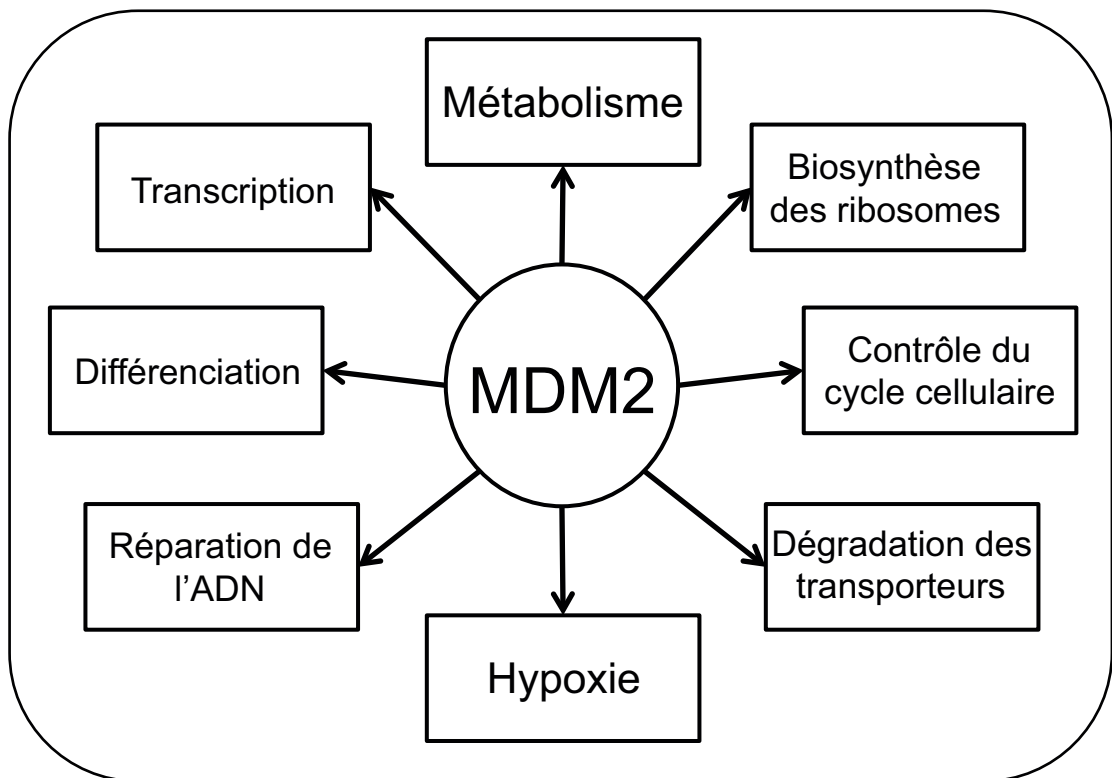


Figure 11: Les différentes fonctions de MDM2.

MDM2 se retrouve impliqué dans un grand nombre de fonctions, au travers de son interaction ou de la régulation de nombreuses protéines, de façon indépendante de p53.

6) Régulations de la protéine MDM2 :

a) Contrôle de la transcription du gène *Mdm2*:

MDM2 peut être régulé transcriptionnellement par de nombreuses voies faisant intervenir des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs. Par exemple MDM2 a été décrit comme la cible transcriptionnelle directe de l'oncogène MYCN. En effet MYCN se lie sur l'E-box du promoteur P2 de MDM2, activant ainsi son expression (165). MDM2 peut aussi être induit par différents facteurs de transcription tels que NFAT1 (nuclear factor of activated T cells 1) ou IRF8 (IFN regulatory factor 8). Ces protéines sont d'ailleurs couramment surexprimées dans de nombreux cancers où elles favorisent la transformation maligne en inhibant ainsi l'activité de p53 (166, 167). Enfin l'expression de MDM2 peut être négativement régulée par PTEN qui est un suppresseur de tumeurs (168).

L'ensemble de ces données montre que la régulation du messenger de MDM2 pourrait être un mécanisme important par lequel les oncogènes favorisent la tumorigenèse et que les suppresseurs de tumeurs empêchent le développement tumoral.

Le niveau d'expression de *Mdm2* peut être modulé transcriptionnellement par certains polymorphismes. L'un d'entre eux, le SNP (single nucleotide polymorphism) en position 309 situé dans le premier intron du gène de MDM2, est associé chez l'homme à une augmentation du risque de cancer lorsqu'il est associé à un T plutôt qu'à un G. Ce polymorphisme augmente la liaison d'un activateur transcriptionnel bien connu, le facteur

SP1, conduisant à une augmentation du niveau d'expression de MDM2 et une diminution de l'activité de p53 (169). Comme décrit plus haut, dans les tumeurs humaines, en plus de la surexpression de la protéine MDM2 entière, on trouve souvent une augmentation de l'expression de certains variants d'épissage de MDM2. Parmi ces variants, les plus fréquemment retrouvés dans les tumeurs humaines sont MDM2-A, -B et -C. L'expression de ces variants est souvent associée à des tumeurs de grade avancé avec un mauvais pronostic (170).

b) Mécanismes de contrôle post-transcriptionnel du gène *Mdm2*:

Dans certaines tumeurs humaines l'augmentation du niveau d'expression de MDM2 peut également provenir de mécanismes de contrôle de la traduction des transcrits *Mdm2*. Ce mécanisme de contrôle implique notamment certains micro ARNs (miRNAs) qui font partie d'un groupe d'ARNs non codants régulant la traduction à travers la région 3'UTR de leurs ARNs cibles. Plusieurs miARNs ciblant MDM2 ont été identifiés incluant miR-143/145, miR-605, miR-25, miR-32, miR-18b et miR-661 (171, 172, 173, 174, 175). En inhibant la traduction de MDM2, ces miARNs augmentent de fait le niveau d'expression de p53 et son activité. La plupart de ces micros ARN exhibent des fonctions suppressives de tumeurs et souvent sont retrouvés sous-exprimés dans les tumeurs humaines. De plus il a été montré que p53 est un répresseur direct de la traduction de MDM2 lors de stress provoqués par le mauvais repliement des protéines. (176)

c) Mécanismes de contrôle post-traductionnel de MDM2:

Les niveaux protéiques et l'activité de MDM2 sont régulés par de nombreux signaux extra et intracellulaires, incluant les stress génotoxiques, l'activation d'oncogènes, ou encore les stress ribosomiaux. Les voies de signalisation activées dans ces situations de stress régulent la capacité de MDM2 à interagir avec p53, son activité E3 ligase ou encore sa localisation subcellulaire.

Phosphorylation:

Les fonctions de MDM2 sont étroitement régulées par des modifications post-traductionnelles, dont la principale est la phosphorylation. MDM2 est une protéine de 491 acides aminés dont 20% sont des sérines ou des thréonines. Les sites de phosphorylation de MDM2 sont nombreux mais se regroupent sur deux principaux domaines. Le premier domaine est le domaine acide en position centrale et le second est la zone dans la partie C terminale située entre le domaine à doigt de zinc et le domaine E3 ligase (**Figure 12**). La phosphorylation de MDM2 module ses fonctions vis à vis de p53. Elle peut inactiver le domaine E3 de MDM2 et ainsi bloquer l'ubiquitinylation de p53, elle peut aussi empêcher l'interaction entre MDM2 et p53 et enfin elle peut restreindre MDM2 à un compartiment subcellulaire pour protéger p53 d'une éventuelle dégradation. De nombreuses protéines sont connues pour réguler MDM2 par phosphorylation et ainsi diminuer son activité de régulateur négatif de p53. Parmi elles on peut noter DNA-PK (DNA activated protein kinase) qui phosphoryle MDM2 sur la sérine 17 (177), ATM (ataxia telangiectasia-mutated) qui cible la sérine 395 empêchant MDM2 de délocaliser p53 du noyau vers le cytoplasme (178). Cette réaction est réversible, en effet WIP1 est une phosphatase capable de déphosphoryler MDM2 sur la sérine 395 et ainsi favoriser la dégradation de p53 (179). WIP1 est considéré comme une oncoprotéine et il n'est pas surprenant qu'on la retrouve

surexprimée dans de nombreux cancers humains (**180**). La thréonine 394 adjacente de la S395 est aussi connue pour être la cible de phosphorylation par la protéine c-Abl. Cette phosphorylation diminue l'interaction entre MDM2 et p53 afin de favoriser une réponse apoptotique (**181**). Le domaine central acide de MDM2 est une zone très déstructurée dont les changements de conformation modulent l'interaction entre MDM2 et ses partenaires. De nombreux sites de phosphorylation ont été identifiés dans ce domaine comme les sérines 240 et 245 qui sont les cibles de la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β). Contrairement aux autres kinases citées précédemment, GSK3 β participe à l'activation de MDM2 de façon à faciliter la dégradation de p53 par le protéasome (**182**). GSK3 β n'est pas la seule protéine à cibler ce domaine acide, il y a aussi la casein kinase 1 (CKI) qui cible un autre cluster de sérines localisé entre la position 240 et 250 et dont le rôle est d'augmenter les fonctions de dégradation de MDM2 (**183**).

Une voie importante dans la tumorigenèse est la voie PI3K-AKT qui permet la prolifération et la survie des cellules. MDM2 a été identifié pour être une cible d'AKT. AKT phosphoryle les sérines 166 et 186 situées proche de la séquence NLS (nuclear localization sequence) afin de localiser MDM2 dans le noyau où il va interagir avec p53 en vue de le réguler négativement (**184**).

Ces différents sites de phosphorylation illustrent la complexité des mécanismes de régulation post-traductionnelle de MDM2.

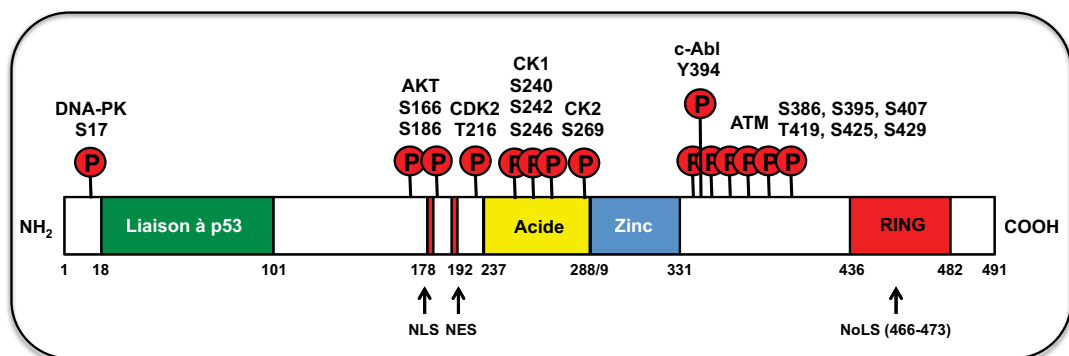


Figure 12: Les sites de phosphorylation de MDM2.

*Représentation schématique de la structure de MDM2 et de ses sites de phosphorylation connus
Adapté de Mark Wade et al.*

Ubiquitylation:

Comme expliqué précédemment, l'auto-ubiquitylation de MDM2 n'est pas requise pour sa dégradation (**185**). La destruction de la protéine doit donc être régulée par d'autres protéines E3-ligases. Plusieurs de ces E3-ligases ont été identifiées, parmi lesquelles : PCAF (p300/CBP-associated factor). Ainsi, en plus de son activité d'acétyltransférase, PCAF possède une activité intrinsèque d'ubiquitylation qui est critique pour le contrôle du niveau d'expression de MDM2, et donc de l'activité de p53 (**186**).

SCF ^{β -TRCP}. En réponse à la fois à des stress génotoxiques, et lors de la progression normale du cycle cellulaire, il a été montré que SCF ^{β -TRCP} pouvait ubiquityler MDM2 et conduire à sa dégradation (**187, 188**).

D'autres protéines sont aussi connues pour augmenter l'ubiquitylation de MDM2, bien que les mécanismes par lesquels elles agissent restent encore mal caractérisés. Parmi ces facteurs, on retrouve par exemple RASSF1A (**189**) ou encore ARF (**190**). A l'inverse

d'autres facteurs empêchent l'ubiquitinylation de MDM2. C'est le cas de TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101), un suppresseur de tumeurs, dont la perte dans des fibroblastes induit la transformation et la formation de métastases chez la souris nue. TSG101 inhibe l'ubiquitinylation et donc la dégradation de MDM2 pour activer la boucle de rétrocontrôle MDM2/p53, et inhiber ainsi p53 (191).

Sumoylation:

MDM2 est sumoylé (SUMO-1) *in vivo* par les SUMO E3-ligase PIAS1, et PIASx β , et peut être également sumoylé *in vitro* par ces mêmes enzymes et RanBP2 (192, 193). Les facteurs conduisant à la sumoylation de MDM2 sont encore peu connus. Cependant une donnée très intéressante suggère que la sumoylation de MDM2 est stimulée par ARF (194, 195). Ceci est particulièrement intéressant étant donné qu'ARF empêche l'ubiquitinylation de p53 par MDM2, suggérant l'idée que les modifications SUMO et ubiquitine peuvent être mutuellement exclusives et/ou antagonistes. En accord avec cette idée, il a été montré qu'un mutant d'UBC9 (l'enzyme E2 de sumoylation) agissant comme dominant négatif conduit à une diminution de la sumoylation de MDM2, par un mécanisme associé à une augmentation de l'ubiquitinylation de MDM2 et une diminution de celle de p53 (196).

Neddylation:

En plus de l'ubiquitine et de SUMO1, NEDD8 est une autre molécule de la famille des molécules apparentées à l'ubiquitine. Si l'ubiquitinylation est majoritairement décrite pour induire la dégradation de ses cibles par le protéasome, la conjugaison des molécules apparentées à l'ubiquitine ont des effets multiples. Il a été montré que MDM2 à travers son domaine E3 ligase est aussi capable d'accepter des molécules de NEDD8 en vue de modifier l'activité de p53 *in vivo* et de s'auto-neddyler. Les rôles de MDM2 à la fois dans la voie de conjugaison de l'ubiquitine et dans celle de NEDD8 suggèrent que les fonctions de MDM2 sont hautement contrôlées et montre la diversité des mécanismes par lesquels les protéines E3 ligase peuvent réguler leurs cibles (197).

d) Régulation de la localisation subcellulaire de MDM2:

L'une des premières protéines découvertes comme interagissant avec MDM2 fût le suppresseur de tumeur p14^{ARF} ("Alternative Reading Frame") (198, 199, 200). Cette protéine est exprimée à partir du locus *Cdkn2A*, qui génère la production de 2 protéines: p16^{INK4a} et p14^{ARF} (p19 chez la souris) grâce à l'utilisation de deux promoteurs indépendants et 2 phases de lecture ouvertes différentes. (201). Cette interaction entre ARF et MDM2 bloque le passage de MDM2 entre le cytoplasme et le noyau en le séquestrant dans le nucléole (202, 203). Comme l'export nucléaire de p53 par MDM2 est nécessaire pour sa dégradation efficace (204, 205), la séquestration de MDM2 dans le nucléole a pour conséquence l'activation de p53. Comme ARF, d'autres protéines nucléolaires peuvent se lier à MDM2 et le séquestrer dans le nucléole, comme par exemple les protéines ribosomales L5, L11, L23, L26, et S7 conduisant alors à une stabilisation de p53 (206, 207, 208).

PKB (Protein Kinase B), plus connue sous le nom d'AKT, est également un régulateur de MDM2 capable de le transloquer dans le noyau par des phosphorylations spécifiques intervenant sur les résidus sérine 166 et 186 (209). AKT est également capable de former un complexe avec MDM2 pour ubiquitinyler et dégrader les récepteurs

androgéniques, dans le but de réguler la croissance et l'apoptose dans les cellules de la prostate.

7) Inhibiteurs pharmacologiques ciblant MDM2:

Ces dernières années, de nombreux efforts ont été engagés pour évaluer l'efficacité clinique d'inhibiteurs pharmacologiques de MDM2 dans le traitement de différents types de cancers. Plusieurs stratégies ont été développées, incluant l'utilisation d'oligonucléotides anti sens, des approches basées sur l'ARN interférence ou encore des composés naturels comme la ginsenoside et le curcumin, capable d'induire l'inhibition de MDM2 (210). Enfin, différents inhibiteurs pharmacologiques de synthèse qui s'insèrent dans la poche impliquée dans l'interaction entre MDM2 et p53 ont été développés. Dans l'immense majorité des cas, les stratégies thérapeutiques basées sur ces agents visent à réactiver la protéine p53 dans des tumeurs exprimant une forme sauvage de p53 ou à rétablir une fonction normale de p53 dans les tumeurs exprimant une forme mutée de p53.

Le premier et le plus connu de ces composés de synthèse est la Nutline, un composé avec un noyau cis-imidazole. Parmi cette classe de composés, la Nutline-3a a montré une forte activité anti-tumorale dans des modèles de xénogreffes chez la souris (211). Cependant, son profil pharmacologique inadéquat limite son intérêt clinique. De cette observation, un composé nommé RG7112 (RO5045337, Roche/Genentech) a été synthétisé. C'est un dérivé similaire à la Nutline-3a qui a été spécialement formulé pour une utilisation clinique. Les études précliniques démontrent que RG7112 est capable d'inhiber l'interaction entre MDM2 et p53, déclenchant ainsi une réponse apoptotique médiée par p53 et une régression tumorale dans des modèles de xénogreffes. L'efficacité de RG7112 est relativement meilleure dans les cellules cancéreuses qui sur expriment MDM2 alors qu'il est inefficace dans les cellules où les membres en amont de la cascade de signalisation impliquant p53 sont inactifs (212). RG7112 a été testé en tant qu'agent simple dans des essais cliniques pour des tumeurs solides et des hémopathies malignes. Son efficacité fût notamment évaluée dans le cadre des liposarcomes, un type tumoral dont le profil cytogénétique (100% d'amplification de *Mdm2*) en fait un cas idéal pour l'utilisation de ces inhibiteurs (213). Cependant, les études cliniques menées jusqu'à présent ont révélé que ces composés avaient des effets secondaires importants avec une toxicité gastro-intestinale (nausées et vomissements) et hématologique (neutropénie et thrombocytopenie) fréquentes, associés à une efficacité relativement modeste. D'autres composés ont fait l'objet d'essais cliniques en vue de cibler l'interaction entre MDM2 et p53 (**Figure 13**).

| Composé | Essai clinique | Fabriquant | Référence |
|------------------------------|----------------|------------|-----------|
| RG7112 | phase I | Roche | 216,217 |
| RG73888 | phase I | Roche | 218, 219 |
| SAR405838 | phase I | Sanofi | 220, 221 |
| AMG232 | phase I | Amgen | 222, 223 |
| AM8553 | phase I | Merck | 224 |
| 1,4 benzodiazepine-2,5-dione | phase I | Novartis | 225, 226 |

Figure 13: Les inhibiteurs de MDM2 utilisés en clinique.

Tableau résumant les principaux inhibiteurs de l'interaction entre MDM2 et p53 actuellement en essai clinique pour le traitement contre le cancer

Adapté de Yujun Zhao et al.

Récemment un composé inhibant l'expression de la protéine MDM2 et non plus l'interaction entre p53 et MDM2 a été développé. SP-141 est un composé qui possède une forte interaction avec MDM2 et montre des résultats encourageants dans des essais menés sur différentes lignées de cancer du sein. Son mécanisme d'action conduit à l'augmentation de l'auto-ubiquitylation de MDM2 et donc sa dégradation par le protéasome. SP-141 diminue la croissance tumorale et les métastases *in vivo*. Ces résultats fournissent une base prometteuse en vue de développer SP-141 comme un nouvel agent thérapeutique dans la lutte contre le cancer du sein (214) et du pancréas (215).

III - MDM4

Cette introduction sur MDM2 serait incomplète sans quelques données sur une protéine structurellement homologue appelée MDM4 (ou encore MDMX). *Mdm4* a été découvert presque 10 ans après *Mdm2*, à partir du criblage d'une banque d'expression d'ADNc visant à identifier des nouveaux partenaires de la protéine p53 (227, 228). Comme MDM2, MDM4 agit également comme un inhibiteur de p53. Rapidement, il fût établi que MDM4 interagissait également avec MDM2 (229, 230), et jouait un rôle dans sa stabilité (231, 232, 233). De façon intéressante, MDM2 et MDM4 présentent une forte homologie de séquence, avec une organisation de leurs domaines protéiques similaires, puisque tous deux contiennent un domaine de liaison à p53, un domaine central acide, un domaine à doigt de zinc, et un domaine RING (Figure 14).

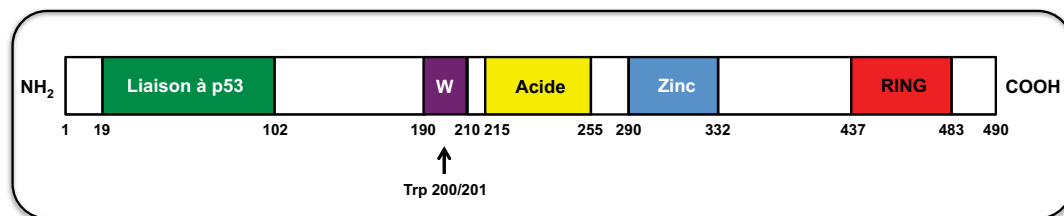


Figure 14: La structure de la protéine MDM4.

Schéma de la structure protéique de MDM4. La protéine MDM4 est constituée de plusieurs domaines essentiels à ses fonctions. Parmi eux le domaine de liaison à p53 qui lui permet d'exercer son rôle de régulateur négatif.

Adapté du site internet TP53 www.p53.free.fr.

Il est à noter cependant que le domaine RING de MDM4 ne lui confère pas d'activité d'ubiquitine E3-ligase intrinsèque *in vitro* (234), contrairement à MDM2. Enfin, il apparaît que MDM4 et MDM2 forment des hétéro-dimères via leurs domaines RING conduisant à la poly-ubiquitinylation de p53 (235). Les expériences les plus convaincantes de l'importance de MDM4 dans l'inhibition de p53 ont été démontrées *in vivo* chez la souris. Les souris *Mdm4* KO meurent au stade embryonnaire (à 10 jours *post coïtum*), et meurent du fait d'un défaut de prolifération (236, 237, 238). Ce phénotype est également totalement surmonté par la délétion concomitante du gène *Tp53*. Par conséquent, la mort embryonnaire est liée à l'induction de la voie p53. A l'inverse de la délétion de *Mdm2* dans le système nerveux central, l'inactivation de *Mdm4* conduit à un arrêt de la prolifération et non pas à la mort cellulaire. Ces données montrent que MDM4 est un autre régulateur critique de p53. Cette notion est appuyée par des données montrant que l'expression de MDM4 est dérégulée dans plusieurs types de cancers (rétinoblastome, cancers du cerveau et du sein, lymphomes du manteau, cancer des testicules, de l'utérus, de l'estomac et dans les mélanomes) qui ne présentent pas d'altération génétique de p53 (239, 240, 241, 242).

D'un point de vue moléculaire, MDM4 coopère avec MDM2 pour inhiber p53. Cependant, en fonction du ratio molaire entre ces deux protéines, l'action sur p53 diffère. Ainsi, quand le ratio MDM4/MDM2 est inférieur à 2:1 la stabilité de p53 est diminuée (243, 244). A l'inverse lorsque les niveaux de MDM4 sont plus élevés, il se produit une augmentation de la stabilité de p53 (245). MDM4 est, à ce jour, dépourvu d'une activité E3-ligase fonctionnelle *in vivo*. Dans ce contexte, son mode d'action consisterait donc simplement, de par sa liaison à p53, d'empêcher la liaison entre MDM2 et p53. Ainsi MDM4 bloque la dégradation de p53 mais inhibe son activité en masquant son domaine de transactivation. Il est également reporté qu'en fonction du ratio MDM4/MDM2, MDM4 empêcherait ou entraînerait la dégradation de MDM2 (246, 247, 248), et donc impacterait la translocation dans le cytoplasme de p53 par MDM2 (249). De plus, les analyses génétiques ont permis de montrer que la perte conditionnelle de *Mdm2* conduisait à une augmentation significative des niveaux protéiques de p53, alors que la délétion conditionnelle de *Mdm4* dans un fond hétérozygote pour *Mdm2* induisait seulement une augmentation modérée des niveaux protéiques de p53. Ces observations ont conduit à la conclusion que MDM2 inhibe p53 principalement au travers de sa dégradation, alors que MDM4 inhibe principalement son activité transcriptionnelle (250). Enfin, étant donné la létalité embryonnaire des animaux *Mdm4* KO, des études *in vivo* utilisant des allèles conditionnels chez la souris ont également été menées pour déterminer l'importance de *Mdm4* chez l'adulte (251, 252, 253, 254). Cependant, à la différence de *Mdm2*, il apparaît que seuls certains types cellulaires présentent des phénotypes visibles en réponse à la perte de *Mdm4*. Comme pour la perte de *Mdm2*, ces phénotypes sont p53-dépendants.

Ces données suggèrent que l'inhibition de p53 par MDM4 n'est requise que dans un nombre limité de types cellulaires, et/ou sous certaines conditions physiologiques. D'ailleurs, il faut noter que la protéine MDM4 est essentiellement exprimée dans les tissus embryonnaires. Son expression dans les tissus adultes est généralement liée à des perturbations pathologiques des mécanismes d'épissage alternatif qui déterminent son niveau d'expression (255). Ainsi, ces deux protéines très proches structurellement agissent en fait de façon différente mais complémentaire à l'égard de l'inhibition de p53.

IV Le métabolisme des cellules tumorales:

Le métabolisme est l'ensemble des transformations moléculaires et des transferts d'énergie qui se déroulent de manière ininterrompue dans la cellule ou l'organisme vivant (Figure 15). C'est un processus ordonné qui fait intervenir des voies de dégradation (catabolisme) et de synthèse organique (anabolisme).

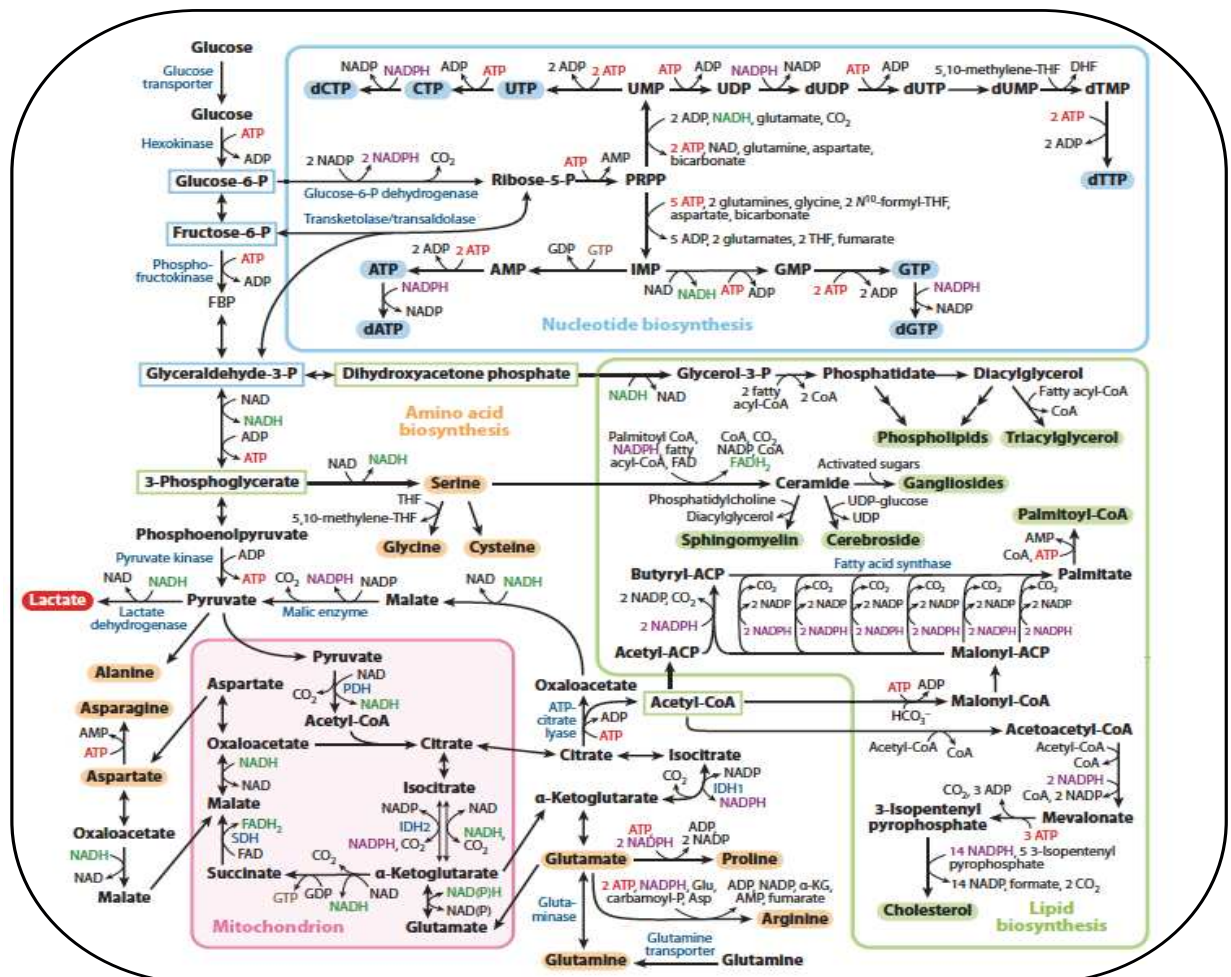


Figure 15: Vue d'ensemble du métabolisme.

Représentation schématique des principales voies métaboliques qui permettent de produire les précurseurs nécessaires pour faire de la biomasse.

Adapté à partir de Lunt and Vander Heiden (2011).

Dans les années 1920, le physiologiste Allemand Otto Warburg reportait que même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses, en comparaison avec les cellules normales, augmentaient leur consommation de glucose et leur production de lactate. Depuis, ce processus fût appelé "EFFET WARBURG" (**Figure 16**) (**256**). Soutenues par les évolutions des techniques de biochimie et de biologie moléculaire, les études du métabolisme des cellules cancéreuses ont amélioré notre compréhension des mécanismes et des conséquences fonctionnelles des altérations métaboliques associées à la transformation cellulaire. Comme l'avait observé Warburg, les cellules cancéreuses doivent augmenter l'import de nutriments à partir du milieu extérieur afin de répondre aux demandes associées à leur prolifération accrue. Deux nutriments principaux supportent la survie et la biosynthèse dans les cellules mammifères: le glucose et la glutamine. A travers le catabolisme du glucose et de la glutamine, la cellule maintient des stocks de divers intermédiaires carbonés qui seront utilisés en tant que briques de construction pour l'assemblage de nombreuses macromolécules. Cette augmentation de la consommation de glucose par les tumeurs comparées aux tissus normaux a été confirmée dans de nombreuses tumeurs, et sont souvent associée à un mauvais pronostic (**257**). Le PET scan (Tomographie par émission de positrons), une technique d'imagerie médicale couramment utilisée pour visualiser la progression tumorale, est basée sur cette augmentation d'assimilation du glucose par les cellules tumorales. Dans ce cas, on mesure la captation du ^{18}F fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG), un analogue radiomarqué du glucose qui n'est pas métabolisé au delà des premières étapes de la glycolyse (**258**). Bien que découvert il y a pratiquement un siècle, le rationnel et les conséquences de l'EFFET WARBURG font toujours débat (**259**).

Les premières études suggèrent que l'augmentation de la glycolyse serait la résultante de mutations ou de défauts dans la respiration mitochondriale et donc constituerait une adaptation métabolique pour favoriser la survie (**260**). Cependant, les découvertes récentes de différents laboratoires indiquent que les mitochondries des cellules cancéreuses sont en réalité parfaitement fonctionnelles (**261**) et mêmes nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses. De fait, c'est à la fois la glycolyse et la respiration mitochondriale qui sont augmentées dans les cellules cancéreuses dans un objectif commun visant à soutenir, en plus de la production d'ATP, toutes les voies de biosynthèse nécessaires à la production de biomasse. La plupart des études se sont focalisées sur des altérations au sein du métabolisme du glucose et de la glutamine, mais les cellules cancéreuses utilisent une multitude d'autre nutriments, parmi lesquels on retrouve les acides aminés (la cystéine, la méthionine, la sérine, la proline...), les lipides et les vitamines pour ne citer que certains d'entre eux.

Ces dernières années, de très nombreuses études ont essayé d'évaluer l'implication de chacun de ces nutriments, et de leurs effets synergiques potentiels, sur le développement tumoral. Ces études sont à l'origine de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses actuellement en évaluation clinique.

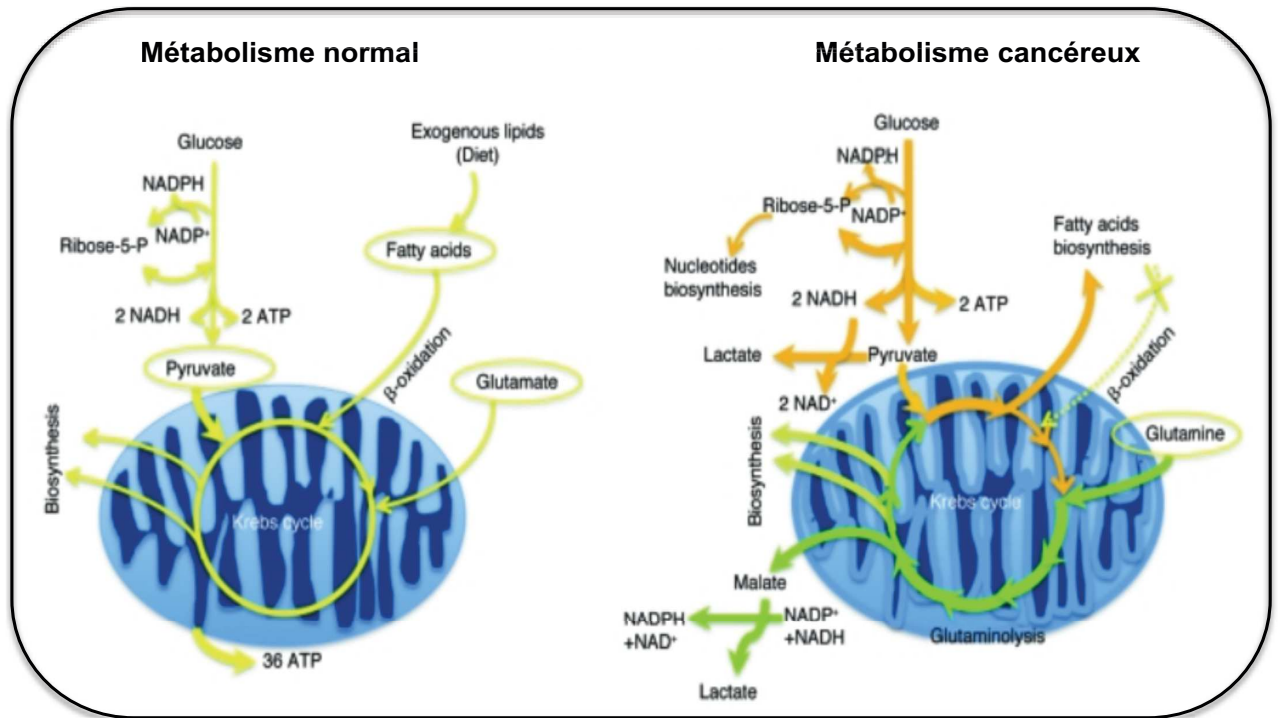


Figure 16: Métabolisme normal vs métabolisme cancéreux.

Comparaison entre le métabolisme des cellules normales et le métabolisme des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses sont dépendantes du glucose afin de produire des intermédiaires biosynthétiques comme les acides nucléiques ou les lipides.
Adaptée de Romero-Garcia et al. (2011).

1) Glycolyse:

La glycolyse est une voie cytoplasmique composée de 10 réactions (**Figure 17**), réparties en deux phases:

- Une phase d'investissement énergétique qui dépense 2 molécules d'ATP par molécule de glucose afin d'obtenir deux trioses phosphate
- Une phase de retour sur investissement qui fabrique 4 molécules d'ATP par molécule de glucose afin d'obtenir deux molécules de pyruvate.

La voie d'Embden Meyerhof-Parnas: la glycolyse

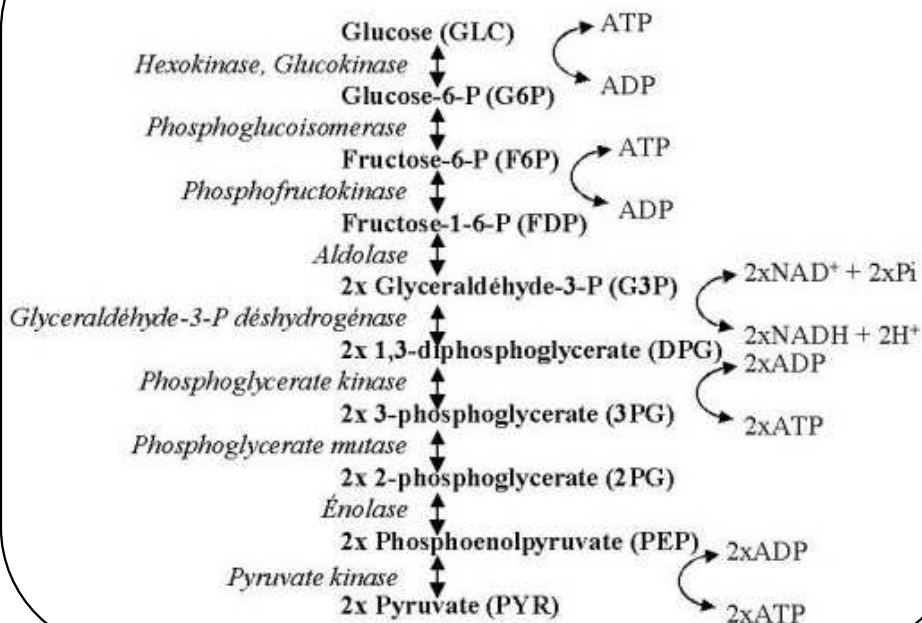


Figure 17: La glycolyse.

Schématisme des différentes étapes de la glycolyse avec les différentes enzymes y contribuant ainsi que les cofacteurs produits et consommés lors de ce processus.

Voici en détail les différentes réactions qui la composent:

Le glucose est importé par les cellules à travers des transporteurs de glucose (GLUTs). Une fois dans le cytoplasme de la cellule il est phosphorylé par l'hexokinase-II (HK-II) pour devenir le glucose 6 phosphate (G6P). Le G6P aura deux alternatives, soit il continue à travers la glycolyse pour donner le fructose 6 phosphate (F6P) par la phosphoglucose isomérase (PGI), soit il emprunte la voie des pentoses phosphates (PPP). Cette entrée dans la PPP est médiée par la glucose 6 phosphate déshydrogénase (G6PDH) et contribue majoritairement à la biosynthèse des nucléotides. En ce qui concerne la partie qui continue au travers de la glycolyse, la phosphofruktokinase-1 (PFK-1) convertira le F6P en fructose-1,6-bisphosphate (F-1,6-BP) qui ensuite sera convertie soit en glyceraldéhyde-3-phosphate (GA3P), soit en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). C'est sous la forme de GA3P que la glycolyse va continuer via la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) pour donner le 1,3-bisphosphoglycérate (1,3-PGA) qui sera à son tour converti en acide 3-phosphoglycérique (3-PGA) par la phosphoglycérate kinase (PGK). Cette réaction génère une molécule d'ATP. Le 3-PGA peut sortir de la glycolyse pour produire des acides aminés tels que la sérine et la glycine ou continuer à travers la glycolyse pour donner l'acide 2-phosphoglycérique (2-PGA) par la phosphoglycérate mutase (PGAM) qui simultanément convertie en phosphoenol pyruvate (PEP) par l'énolase 1 (ENO1). La dernière étape de la glycolyse est médiée par la pyruvate kinase (PK) qui convertit le PEP en pyruvate avec la formation d'une molécule d'ATP. Le bilan énergétique de la glycolyse donne lieu à la formation de deux molécules d'ATP, deux molécules de NADH et deux molécules de pyruvate par molécule de glucose.

La glycolyse de par ses nombreuses réactions faisant intervenir bon nombre d'enzyme est soumise à une étroite régulation à la fois enzymatique (PFK2, PK...), hormonale (insuline, glucagon...) et transcriptionnelle (PK...) (**Figure 18**). Des études de profil d'expression de gènes par « microarray » montrent que de nombreux gènes impliqués dans le transport du

glucose ainsi que dans la glycolyse sont surexprimés dans différents type tumoraux. (262, 263). Il est clair que la surexpression des enzymes métaboliques associées à la glycolyse contribue à la mise en place de l'effet Warburg. Cibler des enzymes comme HK, PFK, PGAM, PK... représente une approche prometteuse dans les traitements anticancéreux (264).

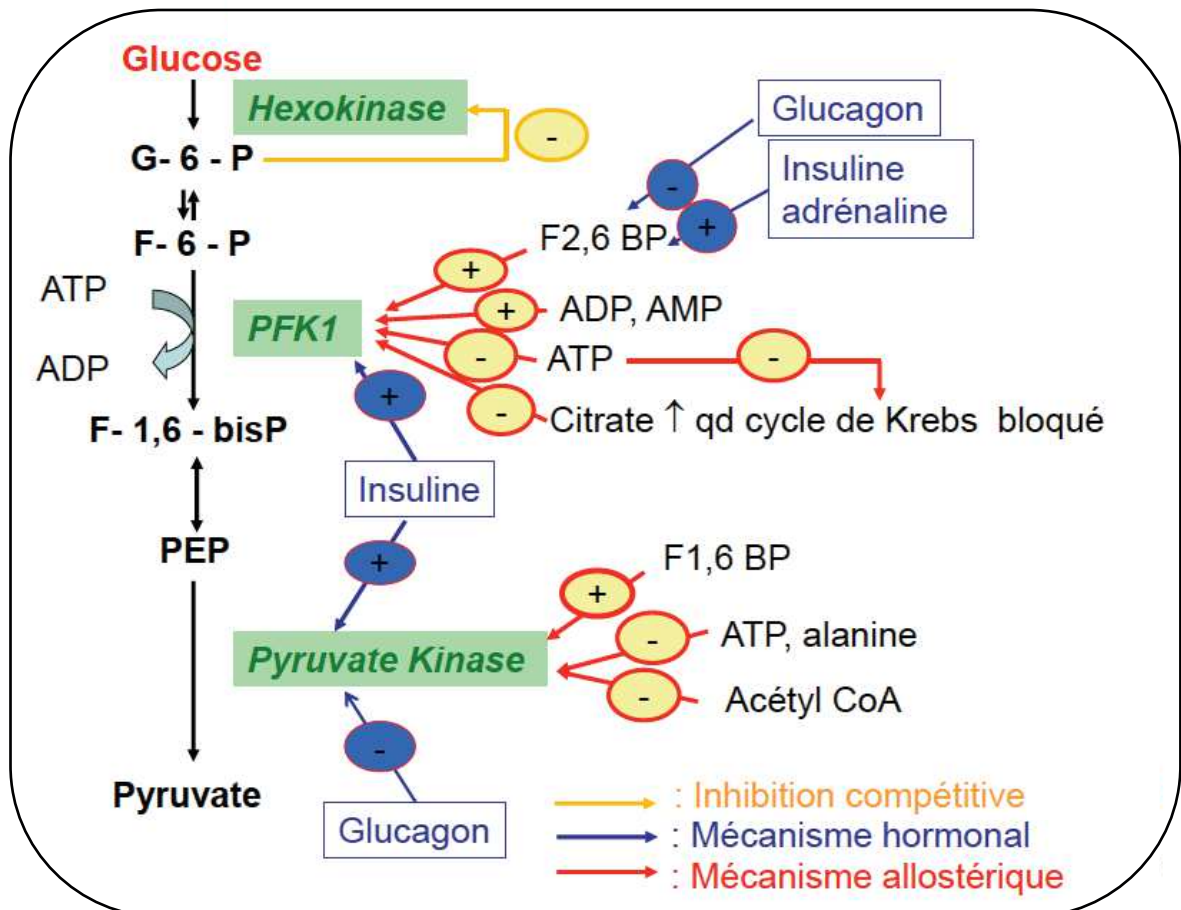


Figure 18: Les principales voies de régulation de la glycolyse.

Aperçu des différentes boucles de régulation qui s'opèrent lors de la glycolyse avec deux principales cibles que sont la phosphofructokinase 1 et la pyruvate kinase.

2) Voie des pentoses phosphates:

La voie des pentoses phosphates, est une voie métabolique du cytoplasme partiellement réversible, permettant l'inter-conversion des hexoses phosphates en pentoses phosphates (**Figure 19**). Cette voie métabolique est située entre deux carrefours métaboliques de la glycolyse: glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate. Cette voie fournit des intermédiaires biosynthétiques clés pour la cellule. Elle est composée de deux branches, une oxydative et l'autre non oxydative (**265**). La branche oxydative commence par l'entrée du G6P via la G6PDH pour donner en produit final le ribose-5-phosphate (R5P) et deux molécules de NADPH. Le R5P est le précurseur de phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) qui est important pour la synthèse des nucléotides alors que le NADPH est utilisé pour son pouvoir réducteur dans la lutte antioxydante et pour la biosynthèse des lipides.

La branche non oxydative produit aussi du R5P mais à partir du F6P ou du G3P. L'avantage de cette branche est qu'elle est réversible. Dans la situation où les cellules cancéreuses nécessitent une grosse quantité de NADPH, le couplage de ces deux branches peut fournir 6 molécules de NADPH à partir d'une seule molécule de glucose (266). Cependant, au contraire des cellules non transformées qui produisent plus de R5P pour la biosynthèse de nucléotides à partir de la branche oxydative, les cellules cancéreuses utilisent la branche non oxydative comme principale source de R5P (267, 268, 269). Deux enzymes importantes de cette branche non oxydative, transcétolase et transaldolase, sont souvent surexprimées dans les cellules tumorales (270). Le rationnel de l'utilisation majoritaire de cette branche par les cellules cancéreuses réside probablement dans le fait qu'elles ont besoin d'une grande quantité de F6P et de GA3P et donc à terme de F-1,6BP qui est connu pour être un régulateur négatif de la G6PDH. Ainsi la dépendance des cellules cancéreuses pour ces enzymes permettant de produire des riboses suggère que ces enzymes peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer.

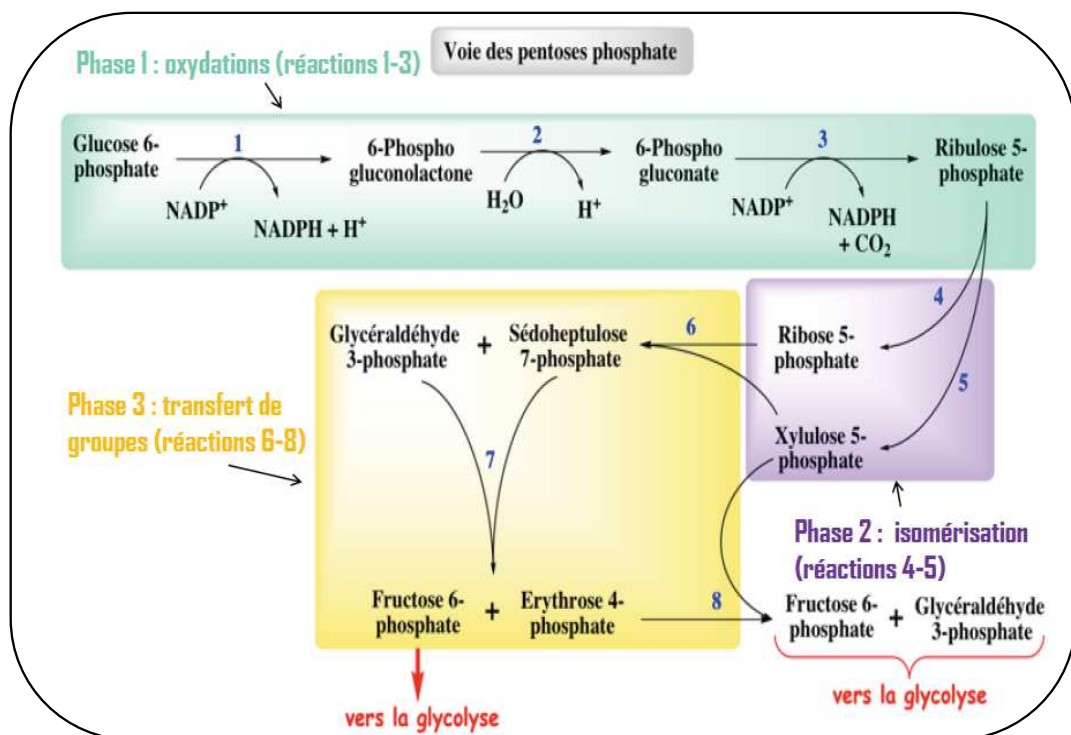


Figure 19: La voie des pentoses phosphates.

Schématization des deux branches de la voie des pentoses phosphates. La branche oxydative composée de la phase 1 d'oxydations (verte) et la branche non oxydative composée de la phase 2 d'isomérisation (violette) et la phase 3 de transfert des unités carbonées (jaune).

3) Métabolisme de la sérine:

Les cellules cancéreuses subissent une reprogrammation métabolique spécifique pour maintenir des niveaux de prolifération et de croissance élevés. En plus des besoins énormes en énergie, les cellules cancéreuses doivent accumuler des composants, nécessaires à la construction de nouvelles biomolécules, comme des acides nucléiques, des acides aminés et des lipides. Le glucose et la glutamine sont les principales sources utilisées pour soutenir l'activité des voies métaboliques essentielles telles que la glycolyse

et le cycle de Krebs. Cependant d'autres voies anaboliques, telles que celle impliquant la sérine et la glycine, sont également essentielles pour la prolifération des cellules cancéreuses.

a) Biosynthèse *de novo* de sérine:

La voie de biosynthèse *de novo* de la sérine représente une sortie possible d'un intermédiaire de la glycolyse, le 2/3PG, permettant de soutenir les pools de sérine et de glycine. On estime qu'environ 10 % du flux glycolytique est redirigé vers cette branche (271). Le 3-PG est alors converti en sérine suivant trois réactions enzymatiques successives (Figure 20). La première étape de cette conversion fait intervenir la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) qui convertit le 3-PG en 3-phosphohydroxypyruvate en utilisant comme cofacteur le NAD⁺ (forme oxydée). Puis l'enzyme phosphosérine transaminase 1 (PSAT1) se charge de la réaction de transamination pour obtenir la phosphosérine. Cette réaction, qui utilise comme cofacteur le glutamate, conduit à la production d'alpha-ceto glutarate. La phosphosérine perd ensuite son phosphate par hydrolyse médiée par la phosphosérine phosphatase (PSPH). La sérine ainsi formée est un acide aminé important pour la synthèse d'autres acides aminés comme la cystéine et la glycine. Cette voie métabolique fournit également des précurseurs pour le cycle des folates et participe à la synthèse de certains phospholipides et des nucléotides.

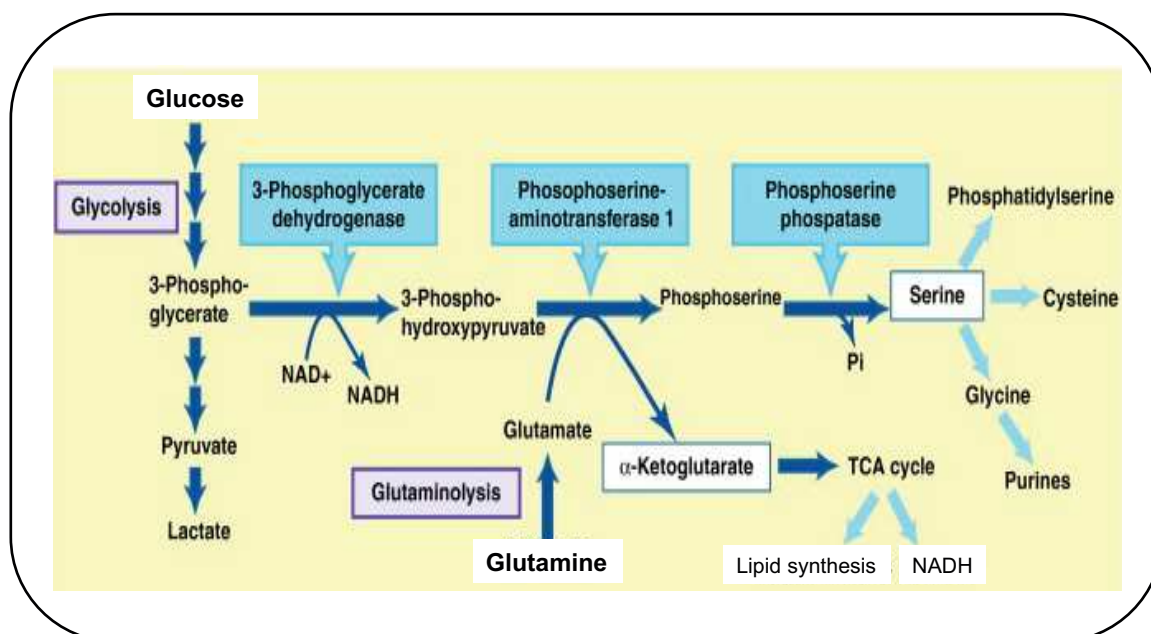


Figure 20: La voie de biosynthèse de la sérine.

Voie de biosynthèse de la sérine à partir du 3-phosphoglycérate. Trois enzymes sont essentielles à cette biosynthèse: la 3 phosphoglycérate déshydrogénase, la phosphosérine aminotransférase et la phosphosérine phosphatase.

Adaptée de Harris et schulze (2011).

Il est à noter que le gène *Phgdh* est considéré comme un véritable oncogène. L'enzyme PHGDH est retrouvée surexprimée dans les cancers du sein triples négatifs et dans les mélanomes (272). Il y a une dépendance vis à vis de cette voie de biosynthèse de la

sérine dans des lignées cellulaires de ces types tumoraux dans lesquelles la déplétion de PHGDH entraîne un arrêt de la prolifération cellulaire.

De plus, on peut noter que lors de la seconde réaction de cette biosynthèse, le glutamate est utilisé par PSAT1 en tant que substrat afin de produire l'alpha-ceto glutarate, composé anaplérotique du cycle de Krebs. Ainsi la formation de sérine permet de fournir des intermédiaires majeurs au cycle de Krebs.

b) Régulation de la voie de synthèse de la Sérine par les membres de la famille p53:

Au delà de ses fonctions dans des voies de réponses à des stress de nature variés, le suppresseur de tumeur p53 est un régulateur important du métabolisme cellulaire. En adaptant le métabolisme cellulaire lors de déficiences en nutriments, p53 est un médiateur clé de certaines réponses métaboliques adaptatrices. Une des situations métaboliques dans laquelle p53 a été impliqué correspond à la carence en sérine et en glycine. En effet, l'équipe du docteur K. Vousden a montré que des cellules déficientes pour p53 n'arrivent pas à surmonter ce type de stress et subissent un arrêt de la prolifération et une diminution de la viabilité cellulaire. Durant la carence en sérine, l'activation de l'axe p53/p21 conduit à un arrêt du cycle cellulaire qui permet alors à la cellule de privilégier l'utilisation le flux de sérine/glycine pour la synthèse du glutathion plutôt que pour la synthèse des nucléotides (**Figure 21**). Cet effet permet aux cellules tumorales de surmonter le stress oxydatif découlant de la carence en sérine mais se fait paradoxalement au détriment de ses capacités prolifératives (273).

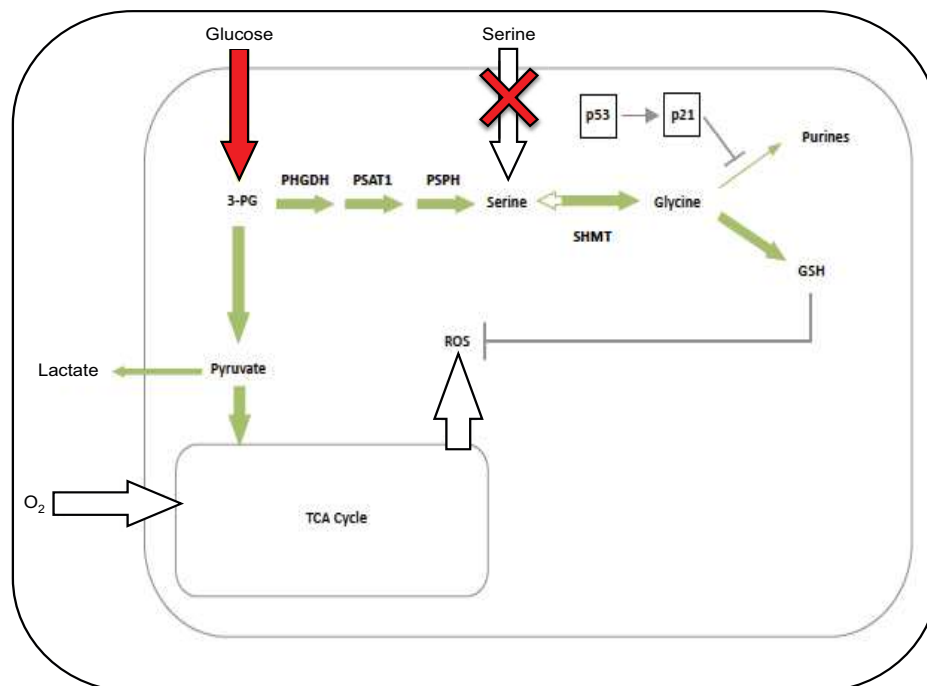


Figure 21: Adaptation des cellules cancéreuses à une carence en sérine.

Représentation schématique de l'adaptation des cellules à l'absence de sérine exogène. L'activation de la voie de biosynthèse de la sérine, accompagnée par une diminution du flux glycolytique vers le lactate, permet de maintenir les pools de sérine et de glycine. p53 active p21 pour bloquer la biosynthèse des purines en bloquant l'arrêt du cycle cellulaire et soutient la synthèse du glutathion pour maintenir le statut redox de ces cellules.

Adaptée de Maddocks ODK et al. (2013).

Récemment, un autre membre de la famille p53, p73, a été reporté comme jouant un rôle dans la biosynthèse de la sérine (274). p53 et p73 semblent tous deux aider les cellules cancéreuses à survivre à l'accumulation des ROS mitochondriaux en l'absence de sérine exogène. Ces données soulignent l'importance d'un contrôle approprié du métabolisme de la sérine.

c) Sérine et pyruvate kinase M2:

On retrouve de nombreuses boucles de rétrocontrôles positifs et négatifs dans la régulation des voies métaboliques. Dans le cadre du métabolisme de la sérine, l'enzyme PKM2 semble jouer un rôle clé dans le métabolisme de la sérine. L'isoforme PKM2 est le variant d'épissage du gène *Pkm* le plus répandu dans les tissus prolifératifs (275). PKM2 catalyse la dernière étape de la glycolyse permettant la conversion du PEP en pyruvate avec production d'une molécule d'ATP. Le rôle de PKM2 est lié au fait qu'en contrôlant la vitesse du flux glycolytique, PKM2 contrôle l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse qui peuvent être redirigés vers les voies anaboliques branchées tel que la voie de biosynthèse de la sérine. Il a été montré que la sérine est un activateur allostérique de PKM2. Cette régulation implique que lorsque la sérine est abondante, PKM2 est totalement activé, permettant la consommation du glucose au travers de la glycolyse aérobie (**Figure 22**). A l'inverse, lors de carence en sérine, l'activité de PKM2 est réduite, les intermédiaires de la glycolyse s'accumulent en vue d'alimenter la biosynthèse de la sérine et maintenir l'état prolifératif des cellules. (276)

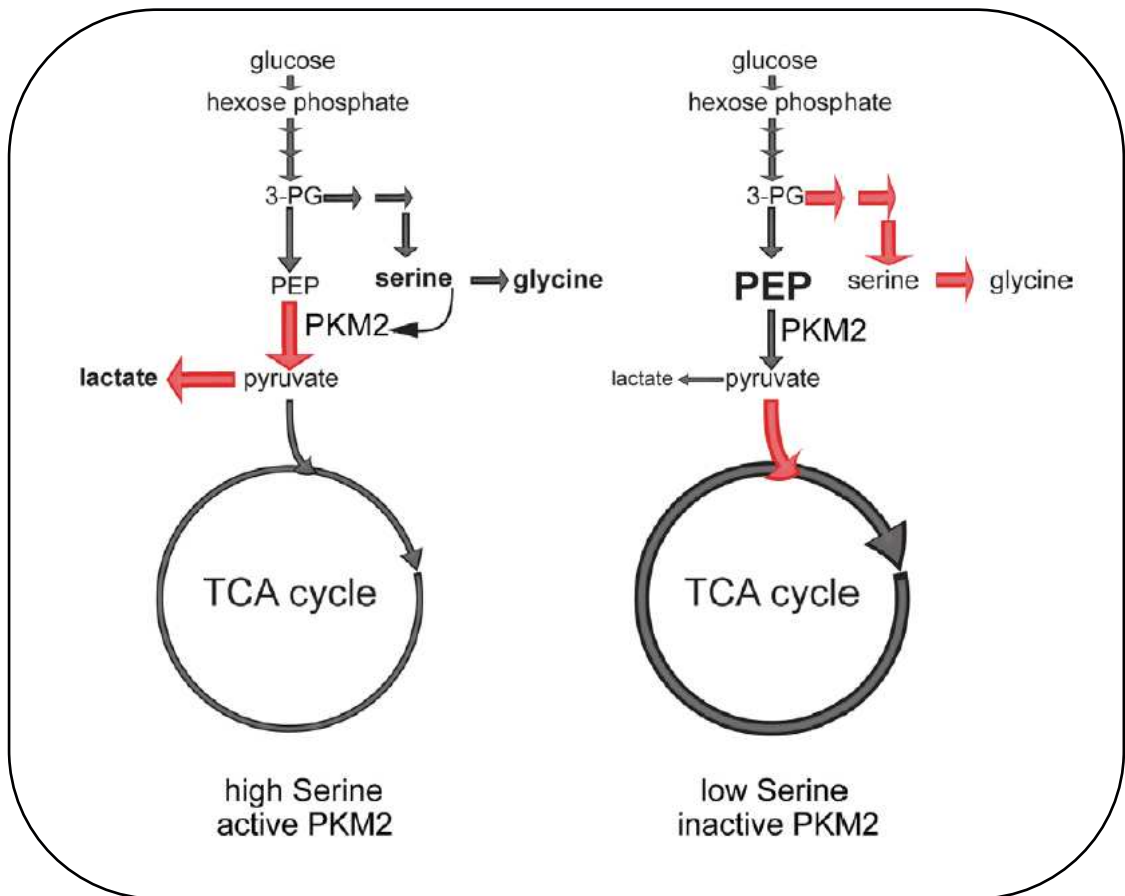


Figure 22: La disponibilité en sérine module l'activité de PKM2.

Représentation schématique du changement de métabolisme des cellules cancéreuses en fonction de la disponibilité en sérine.

d) Sérine principale source de glycine:

Le maintien du potentiel biosynthétique de la cellule ainsi que de son statut redox et épigénétique trouve son origine dans les unités carbonés du folate provenant du métabolisme un carbone (1C). Le rôle clé de ce cycle métabolique dans les cellules cancéreuses commence à devenir clair et une des réactions clé dans cette voie métabolique est la conversion de la sérine en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (**Figure 23**). Cette réaction représente la source majeure de groupement méthyl du métabolisme 1C requis pour la synthèse *de novo* de nucléotides et la méthylation de l'ADN. Dans le génome humain, deux gènes *Shmt1* qui code pour l'enzyme cytoplasmique (SHMT1) et *Shmt2* qui code pour une forme mitochondriale (SHMT2) (**277**). Au delà de l'import de glycine à partir du milieu extracellulaire, il existe plusieurs précurseurs de glycine en plus de la sérine dont la thréonine, la bétaine, et la choline. Le clivage de la glycine par la glycine décarboxylase (GLDC) est une autre voie essentielle pour fournir le métabolisme 1C via le folate. Les pools de folate provenant de la réaction dépendante des SHMTs ainsi que du clivage de la glycine sont importants pour le maintien du pools de précurseurs servant de cofacteurs pour les réactions de méthylation et donc de la stabilité de l'ADN.

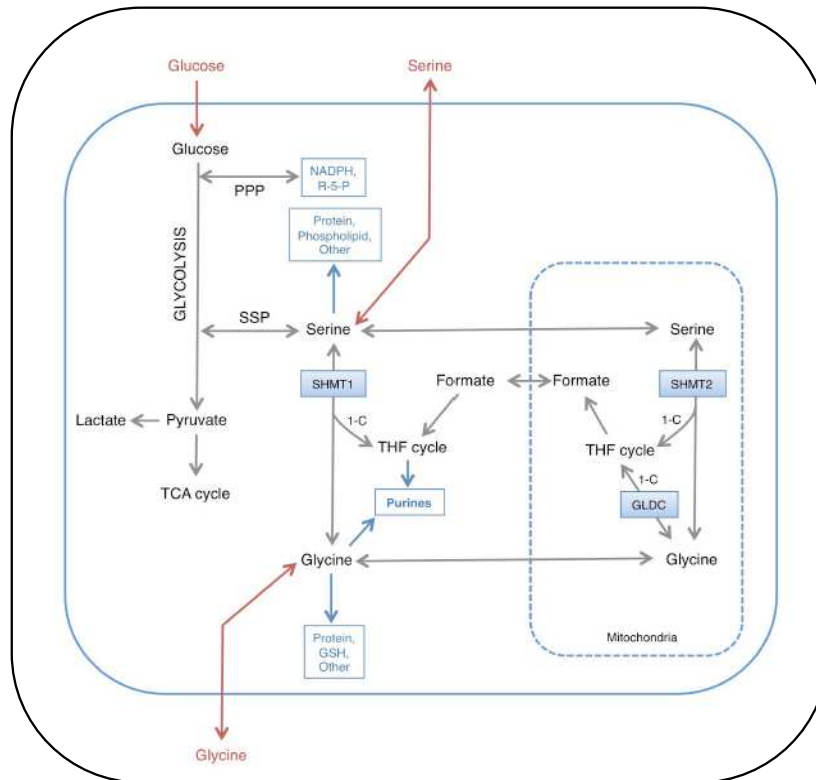


Figure 23: Biosynthèse et devenir de la glycine.

Représentation schématique des différents destins métaboliques de la glycine dans les cellules cancéreuses.

Adaptée de Labuschagne et al. (2014).

La glycine peut aussi directement être importante pour le maintien de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet la glycine participe à la biosynthèse de l'anneau des bases purines de par ses deux atomes de carbone et un atome d'azote. La glycine est aussi un précurseur du glutathion, la principale molécule antioxydante dans la cellule. Ainsi il a été récemment montré que l'import de la glycine et son catabolisme est capable de promouvoir la tumorigenèse suggérant qu'elle pourrait être une cible de premier choix dans les traitements anticancéreux (278).

e) Métabolisme un carbone (1C):

L'aspect central du métabolisme 1C est la transformation du folate vers ses différents destins cellulaires. Dans les cellules, le folate est réduit par une série d'enzyme conduisant à la génération de tétrahydrofolate (THF). Ce cycle est couplé au clivage de la glycine qui va fournir une unité carbonée importante pour la méthylation du THF.

Ce méthyl-THF est un donneur de méthyl impliqué dans la synthèse de dTMP à partir de dUMP via la thymidylate synthase, mais aussi un précurseur de méthionine requise pour la synthèse de protéine, mais aussi pour générer le S-adenosylméthionine (SAM). Le SAM est utilisé en tant que donneur de méthyl dans les réactions de méthylation, que ça soit pour les protéines (notamment les histones), que pour les acides nucléiques (ADN, ARN) (279, 280). De plus une étude récente montre que l'absence de sérine exogène diminue fortement la synthèse du SAM et ainsi la méthylation de l'ADN et l'ARN (281). Ces résultats soulignent le rôle central de la sérine dans ce métabolisme 1C indispensable pour maintenir les besoins en composants cellulaires des cellules cancéreuses.

Ce métabolisme 1C est important dans la synthèse de toutes les macromolécules comme les protéines, nucléotides et lipides (282).

f) Espoir de traitement:

Le challenge actuel dans le domaine de la médecine personnalisée et du traitement du cancer est l'identification de nouveaux outils afin de permettre une meilleure stratification des patients en vue d'interventions thérapeutiques plus ciblées. La classe de médicament la plus utilisée dans l'oncologie médicale est celle des antimétabolites. Parmi eux, le méthotrexate est le principal agent de chimiothérapie utilisé en première ligne pour un bon nombre de cancers incluant lymphome, sein, leucémie. Le méthotrexate est un antifolate qui cible la SHMT (283). L'expression et l'action soutenue des enzymes impliquées dans le métabolisme de la sérine et du folate sont déterminantes dans la réponse au méthotrexate (284). Il est vraisemblable qu'une meilleure connaissance de ces voies métaboliques permettra dans l'avenir de développer des combinaisons d'inhibiteurs qui ciblent ces enzymes métaboliques, avec des effets synergiques vraisemblables permettant d'augmenter leur efficacité clinique. Récemment d'autres approches qui ciblent des voies en amont du métabolisme de la sérine et du folate ont été développées. Des études précliniques sont en cours avec des petites molécules qui ciblent le site catalytique des enzymes impliquées dans la synthèse de novo de la sérine comme la PHGDH (285, 286).

4) La pyruvate kinase M2:

La pyruvate kinase est l'enzyme qui catalyse le transfert direct du phosphate du phosphoénolpyruvate (PEP) vers l'ADP pour former le pyruvate et une molécule d'ATP (287). Dans les années 1980, Eigenbrodt a émis l'hypothèse selon laquelle la pyruvate kinase M2 (PKM2) était phosphorylée et inactivée par de nombreuses protéines kinases incluant la protéine tyrosine kinase Src (288). Il a aussi suggéré que l'inhibition de la pyruvate kinase était nécessaire pour rediriger le flux glycolytique vers les voies anaboliques telles que la voie des pentoses phosphates (289). En plus de ces deux idées, l'attention a été attirée vers PKM2 quand des études ont montré que PKM2 était surexprimé dans tous les cancers humains faisant potentiellement de cette protéine un biomarqueur intéressant (290).

a) Les différentes isoformes de la pyruvate kinase:

Chez les mammifères, on retrouve 4 isoformes de pyruvate kinase (PKM1, PKM2, PKR et PKL) (291). La plupart des tissus adultes expriment PKM2, et l'expression des autres isoformes est réduite à certains tissus et types cellulaires. L'isoforme PKM1 s'exprime dans des tissus à fort catabolisme, tels que les muscles, le coeur et le cerveau. PKL est l'isoforme prédominante dans le foie et inversement dans les reins. L'isoforme PKR est exclusivement retrouvée dans les globules rouges. Quant à PKM2 c'est l'isoforme que l'on retrouve dans les cellules embryonnaires et les cellules cancéreuses (292). PKM2 est aussi exprimé dans les cellules proliférantes normales telles que les lymphocytes et les cellules de l'épithélium intestinal. (293).

b) *Pyruvate kinase M*: gène, structure de la protéine et fonction

Épissage alternatif du gène *Pkm*:

Le gène *Pkm* subit un épissage alternatif afin de générer deux transcrits codant soit pour PKM1 soit pour PKM2 (**Figure 24**). Le gène *Pkm* possède 12 exons (**294**). L'exon 9 et 10 font la même taille et sont spécifiques de certaines isoformes. En effet, l'exon 9 est spécifique de PKM1 et l'exon 10 de PKM2. Afin de maintenir l'isoforme PKM2, l'exclusion de l'exon 9 et l'inclusion du 10 est nécessaire. Trois facteurs d'épissage polypyrimidine tract binding protein (PTB), heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) et A2 (hnRNPA2) agissent en aval des voies de signalisation oncogéniques pour réprimer l'inclusion de l'exon 9. Cependant, le mécanisme qui contrôle l'épissage de l'ARNm pour produire PKM1 reste encore mal compris. Des études montrent que l'inactivation des facteurs d'épissage PTB, hnRNPA1 et hnRNPA2 dans des cellules qui normalement expriment PKM2, favorise l'expression du transcrite de PKM1 suggérant qu'en l'absence des facteurs qui répriment l'inclusion de l'exon 9, PKM1 doit être le transcrite par défaut du gène *Pkm* (**295**).

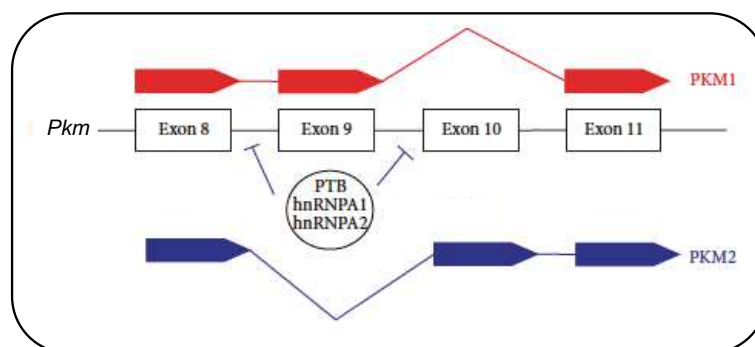


Figure 24: Épissage alternatif du gène *Pkm2* et devenir protéique.

Illustration de l'épissage alternatif de PKM1 et PKM2.

Adaptée de Nicholas Wong et al. (2013).

Structure protéique de PKM2:

La pyruvate kinase est une protéine tétramérique configurée en dimère de dimère. Chaque monomère contient un site actif et est composé de trois principaux domaines: A, B et C plus un petit domaine N-terminal (**296**). Le domaine C des isoformes PKM2, L et R possède une poche de liaison au fructose 1,6 bis phosphate (FBP) (**297**). Les domaines C de chaque monomère forment l'interface qui permet l'association complète du tétramère. De plus, c'est dans ce domaine que les acides aminés diffèrent en fonction de l'isoforme PKM2 et PKM1. Ainsi ces différences sont à l'origine de la liaison du FBP ou non et de la régulation allostérique qu'il exerce sur PKM2 et non sur PKM1.

La pyruvate kinase est plus active sous forme d'un tétramère. PKM1 est un tétramère constitutif alors que PKM2 lui est sujet à une dissociation réversible et à une inactivation en l'absence de FBP (**298**). Ainsi les différentes conformations de PKM2 en présence ou non de FBP permettent une régulation dynamique de son activité enzymatique.

Les effecteurs allostériques de PKM:

Comme énoncé ci dessus, la protéine kinase permet la formation du pyruvate à partir du phosphoénolpyruvate. Cette réaction permet aussi la synthèse d'ATP à partir de l'ADP.

La fixation de l'ADP dans le site catalytique de PKM est de haute affinité et n'est pas soumise à une régulation par des effecteurs allostériques. Par contre la fixation du PEP est dépendante de la présence d'effecteurs. En l'absence d'activateurs allostériques les isoformes PKM2, PKL et PKR ont une faible affinité pour le PEP. Un des activateurs connu pour favoriser cette fixation est le FBP. Le FBP est un intermédiaire glycolytique qui est le principal activateur allostérique de PKM2 (**299**).

En plus du FBP, L'activité de PKM2 est régulée de façon allostérique par de nombreux métabolites et molécules. Cependant certains ont des effets modérés sur PKM2 et uniquement à des fortes concentrations, soulevant la question de leur intérêt lors de la régulation physiologique de PKM2.

Parmi eux les plus efficaces sont :

- La phenylalanine (Phe) est un inhibiteur allostérique qui réduit l'activité de PKM1 et PKM2 en diminuant l'affinité pour le PEP (**300, 301**). La phenylalanine se lie dans une poche indépendante du site de fixation du FBP et du site catalytique, stabilisant PKM en tétramère inactif.

- Cette poche de liaison est aussi connue pour être occupée par l'alanine (Ala) qui est un inhibiteur allostérique de PKM2 mais pas de PKM1 (**302**). Par contre en contraste avec l'inhibition médiée par la phenylalanine, l'alanine entraîne la dissociation du tétramère en dimère qui peut être totalement rétablie par le FBP (**303, 304**).

- Dans cette même poche, un autre acide aminé peut se fixer, la sérine (Ser). Cependant contrairement à la phénylalanine et l'alanine, la sérine est un activateur allostérique de PKM2 (**305**).

- En plus de certains acides aminés une hormone thyroïdienne, la triiodo-L-thyronine (T3) est un inhibiteur allostérique de PKM2 en le gardant dans une conformation de monomère inactif (**306**).

- PKM2 est activé par le succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5' phosphate (SAICAR), un métabolite intermédiaire dans la voie de synthèse *de novo* des purines. Cette activation est spécifique de PKM2 et a d'abord été reportée pour se produire lors de carence en glucose (**307**).

En plus de ces effecteurs allostériques endogènes, un nombre conséquent de petites molécules synthétiques effectrices ont été identifiées à travers un crible de la modulation d'activité de PKM2. Parmi elles, le thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinones (TEPP-46), *N,N'*-diarylsulfonamide (DASA-58) ou encore un composé nommé 9. Ces principales molécules sont des activateurs de PKM2 qui favorisent le flux glycolytique vers la formation de pyruvate, rendant les cellules cancéreuses sensibles à des stress de type carence en sérine. Ces molécules synthétiques ouvrent des opportunités vers des traitements ciblant les vulnérabilités métaboliques de certains types de cancer (**308, 309**).

Régulation de l'activité de PKM2 par les signaux intracellulaires:

L'activité de PKM2 peut être réduite par des tyrosines kinases. En effet, des peptides issus d'une banque de peptide traditionnel contenant une tyrosine phosphorylée induit le relargage de FBP. Cette interaction entre PKM2 et ce type de peptide chargé négativement de par sa tyrosine phosphorylée, se fait grâce à la lysine 433 (K433) un résidu qui se situe dans la poche de liaison au FBP (**310**). Ainsi ce mécanisme d'inhibition de PKM2 participe à la redirection du flux glycolytique vers les voies anaboliques pour promouvoir la croissance cellulaire. Par ailleurs, PKM2 est lui même sujet à des phosphorylations sur ses résidus tyrosines. Parmi elles, la tyrosine 105 qui empêche la formation de tétramères et ainsi favorise l'effet Warburg et la croissance tumorale (**311**).

PKM2 est aussi sujet à d'autres modifications post-traductionnelle qui affectent directement son activité enzymatique. L'acétylation de PKM2 sur les lysines 305 (K305) et 433 (K433) se produit lors de signaux mitogéniques (EGF stimulation) ou encore quand les cellules sont cultivées à forte densité conduisant à une diminution de son affinité pour le PEP. Ce PKM2 dimérique et acétylé se relocalise au noyau, et de nombreuses études montrent que PKM2 peut avoir des fonctions non métaboliques dans le noyau pour réguler la transcription (**312, 313, 314**).

L'activité de PKM2 peut aussi être diminuée lors de stress oxydants qui provoquent l'oxydation de la cystéine 358 (C358), permettant aux cellules de rediriger le flux vers les voies anaboliques et notamment vers la synthèse du glutathion pour contrôler le statut redox des cellules (**315**).

c) PKM2 et cancer:

PKM2 favorise le métabolisme anabolique:

Les cellules proliférantes doivent produire énormément de biomasse pour se dupliquer et continuer à croître. Cela requiert des lipides pour les nouvelles membranes, des acides aminés pour les protéines et des nucléotides pour permettre la réplication de l'ADN. Ce métabolisme anabolique nécessite notamment de rediriger l'utilisation d'intermédiaires de la glycolyse vers les voies de biosynthèses comme la voie des pentoses phosphates et la voie de synthèse de la sérine. En régulant la dernière étape de la glycolyse, PKM2 contrôle un mécanisme clé de l'adaptation métabolique des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses expriment PKM2 majoritairement sous forme de dimère presque inactif (**Figure 25**). Cela semble incohérent avec le fait que dans les cellules cancéreuses la glycolyse fournit une grosse quantité de lactate. Cependant des analyses détaillées révèlent que la faible activité de PKM2 est suffisante pour permettre la glycolyse aérobie et maintenir la prolifération. Cependant la présence de PKM2 n'est pas requise dans tous les types de cellules cancéreuses (**316**). Ainsi la capacité des cellules proliférantes à réguler l'activité de PKM2 en accord avec le statut cellulaire semble être une fonction importante pour la prolifération cellulaire dans différents cancers.

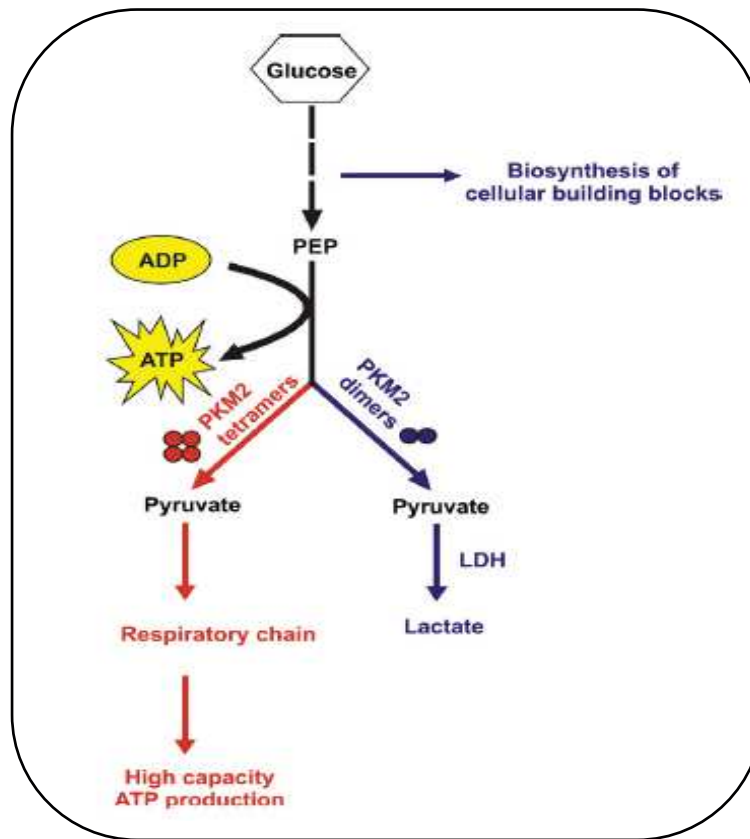


Figure 25: PKM2: un acteur important de la glycolyse aérobie.

Sous forme de tétramères, PKM2 est actif et dirige le flux glycolytique vers la mitochondrie pour soutenir la production d'énergie par la chaîne respiratoire (rouge). Par contre sous forme de dimère PKM2 est moins actif, le pyruvate est alors majoritairement transformé en lactate et le flux glycolytique est redirigé vers les voies de biosynthèses anaboliques.

Adaptée de Nicholas Wong et al. (2013).

Fonctions non canoniques de PKM2:

Des travaux récents ont rapporté que PKM2 avait des fonctions non métaboliques qui servent à réguler l'expression des gènes ou le cycle cellulaire. PKM2 agit à travers son activité de transfert de phosphate ou via l'interaction avec des partenaires. Plusieurs équipes ont attribué à PKM2 un rôle de « protéine kinase » capable de transférer le phosphate du PEP vers un résidu tyrosine (serine ou thréonine) d'une protéine cible (317, 318). Nombreuses cibles de phosphorylation par PKM2 ont fait l'objet d'étude comme l'histone H3 (319), STAT3 (320), MLC2 (321) pour ne citer qu'eux. Cependant il reste à élucider comment l'enzyme accepte une telle variété de substrats protéiques dans un même site et le mécanisme par lequel PKM2 phosphoryle directement ces substrats en utilisant soit le PEP soit l'ATP comme donneur de phosphate. Une étude récente de l'équipe du docteur VanderHeiden au MIT semble contredire ces études et suggère que la fonction « protéine kinase » de PKM2 ne représente qu'un artefact (322). Les rôles multiples de PKM2 sont aussi illustrés par sa capacité à activer l'expression des gènes cibles du facteur de transcription HIF1 α dans les cellules cancéreuses (323) et dans les macrophages activés (324). Pour cela, PKM2 interagit directement avec la sous unité HIF-1 α et entraîne la localisation du complexe associé avec p300 sur des éléments de réponse à l'hypoxie. PKM2 est aussi capable d'interagir avec des protéines comme Oct4 (325) et DAPK (326) afin de moduler leur activité transcriptionnelle. Dans certains cancers présentant une altération de la voie de signalisation impliquant l'EGFR, PKM2 est localisé

dans le noyau où il joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire à travers la transactivation de la β -caténine (327) et la phosphorylation directe de l'histone H3 (319), dans la progression mitotique et la ségrégation chromosomale à travers la phosphorylation directe de BUB3, et dans la cytokinèse à travers la phosphorylation directe de MLC2 (321).

Parmi les 4 isoformes de la pyruvate kinase, PKM2 est la seule associée à un état d'hyperprolifération. PKM2 est exprimé dans de nombreux tissus adultes et dans les cellules cancéreuses. Mais il est intéressant de noter que PKM2 est aussi exprimé dans de nombreux tissus non prolifératifs. Cependant son rôle dans ce contexte est très peu étudié alors qu'il est très sollicité pour son rôle dans la tumorigenèse. Afin de caractériser toutes les facettes de cette protéine kinase, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les fonctions physiologiques normales de PKM2, une nécessité si on souhaite limiter les effets secondaires potentiels d'inhibiteurs pharmacologiques de cette enzyme métabolique prometteuse en tant que cible.

5) Le Lactate:

La plupart des cellules cancéreuses ont été caractérisées par une production augmentée de lactate, qui provient du pyruvate produit principalement par la glycolyse. La production de lactate est l'œuvre d'une famille d'enzymes, les lactates déshydrogénases (LDH), et plus particulièrement la LDH-A qui convertit le pyruvate en lactate et rétablit le pool de NAD⁺ cellulaire nécessaire pour maintenir le flux glycolytique. Une inhibition de la LDH-A par le composé FX11 par exemple, réduit les niveaux d'ATP, augmente le stress oxydant et inhibe la progression tumorale dans un modèle de xénogreffes de cancer du pancréas (328). Le lactate ainsi généré doit aussi être exporté hors de la cellule, conduisant à une acidification du microenvironnement qui favorise l'invasion tumorale et supprime les effecteurs du système immunitaire (329, 330). Les cellules exportent le lactate via un membre des transporteurs de la famille des transporteurs monocarboxylates: MCT4. Ce transporteur est fréquemment surexprimé dans les cancers du rein et son inhibition conduit à une acidification intracellulaire qui aboutit à la mort de la cellule (331). Ce lactate extracellulaire excrété par les cellules glycolytiques peut être capté par des cellules environnantes utilisant majoritairement la phosphorylation oxydative. Un autre membre de la famille des MCTs, MCT1 est à l'origine de ce phénomène. Ce lactate est alors transformé en pyruvate pour approvisionner le cycle de Krebs (332). Le lactate est utilisé comme substrat de la respiration mitochondriale par ces cellules afin d'économiser le glucose qui sera utilisé en priorité par les cellules hypoxiques et glycolytiques (Figure 26). Cette coopération cellulaire permet aux cellules cancéreuses de s'adapter au mieux à leur microenvironnement (333, 334).

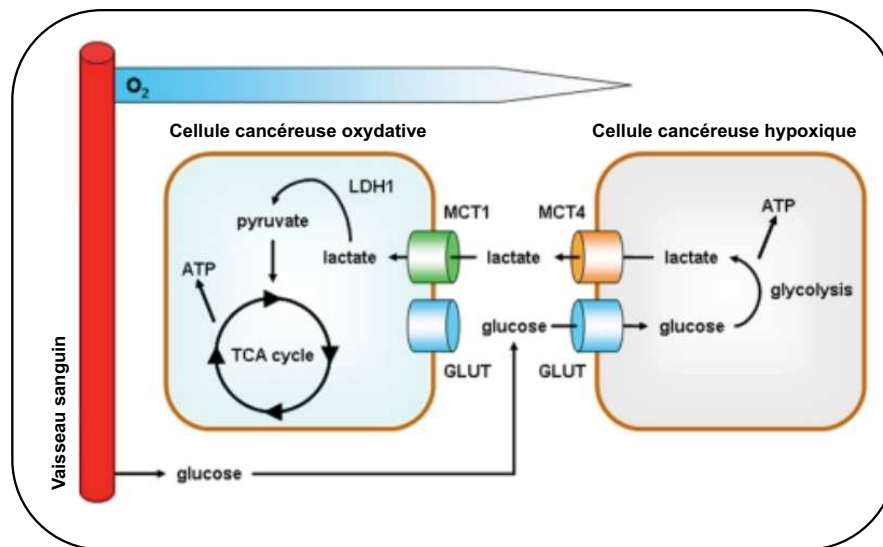


Figure 26: Devenir du lactate entre cellules hypoxiques et oxydatives.

Schéma illustrant le métabolisme dans l'hétérogénéité tumorale. MCT1 est un transporteur adapté pour l'assimilation de lactate. En présence d'oxygène, le lactate est oxydé en pyruvate par la LDH1. Ce pyruvate ainsi formé alimente le cycle de Krebs pour produire de l'ATP. La préférence métabolique des cellules cancéreuses oxydatives pour le lactate permet aux cellules cancéreuses hypoxiques d'avoir accès à de fortes concentrations en glucose. Cette coopération métabolique est clé pour la survie des cellules cancéreuses hypoxiques.

Adaptée de Porporato et al. (2011).

6) Cycle de Krebs:

Dans la plupart des cellules cancéreuses, il apparaît que la majorité du pyruvate produit par la glycolyse est transformé en lactate par la LDH-A. Cependant, une petite partie de ce pyruvate entre dans la mitochondrie et est métabolisé au travers du cycle de Krebs (TCA) afin de fabriquer de l'énergie (ATP) et des précurseurs biosynthétiques comme les acides aminés et les lipides (**Figure 27**).

Dans un premier temps, le pyruvate qui entre dans la mitochondrie peut être soit converti en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase (PC) soit converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Cet acétyl-CoA (Ac-CoA) se condense ensuite avec l'OAA pour produire du citrate. Les cellules qui se comportent de façon "normale" continuent de métaboliser le citrate au travers du TCA, alors que les cellules cancéreuses vont l'exporter hors de la mitochondrie pour participer en particulier à la biosynthèse des acides gras. Ainsi dans le cytosol, le citrate est reconverti en Ac-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY) pour satisfaire les besoins accrus en lipides et acides aminés. Il a été reporté qu'une inhibition de l'ACLY réduisait la contribution du glucose dans la fabrication des lipides et bloquait la prolifération de cellules cancéreuses du pancréas (**335**). Quand il y a un manque au niveau d'un intermédiaire du cycle de Krebs, la cellule utilise des sources alternatives afin de garder ce TCA viable. On parle alors de réaction anaplérotiques. A noter qu'il est possible de synthétiser du pyruvate à partir de l'alanine (Ala) via l'alanine amino transférase (ALAT) qui produit du glutamate et du pyruvate. De plus quand le citrate est converti en acétyl-CoA dans le cytosol, il y a formation d'OAA qui peut entrer dans le TCA sous forme de malate via la malate déshydrogénase (MDH). Ce malate rentre dans le TCA par deux points d'entrée possibles: soit directement sous forme de malate en entrant dans la mitochondrie par la navette malate-aspartate soit sous forme de pyruvate lors de la conversion de ce malate en pyruvate par les enzymes maliques

(ME) (336). En plus du glucose, l'autre source qui alimente le TCA est la glutamine. L'oxydation de la glutamine produit le l' α -kétoglutarate qui est un intermédiaire du TCA (337). Cette source alternative aide à comprendre pourquoi les cellules cancéreuses sont dépendantes de cet acide aminé pour leur prolifération (338).

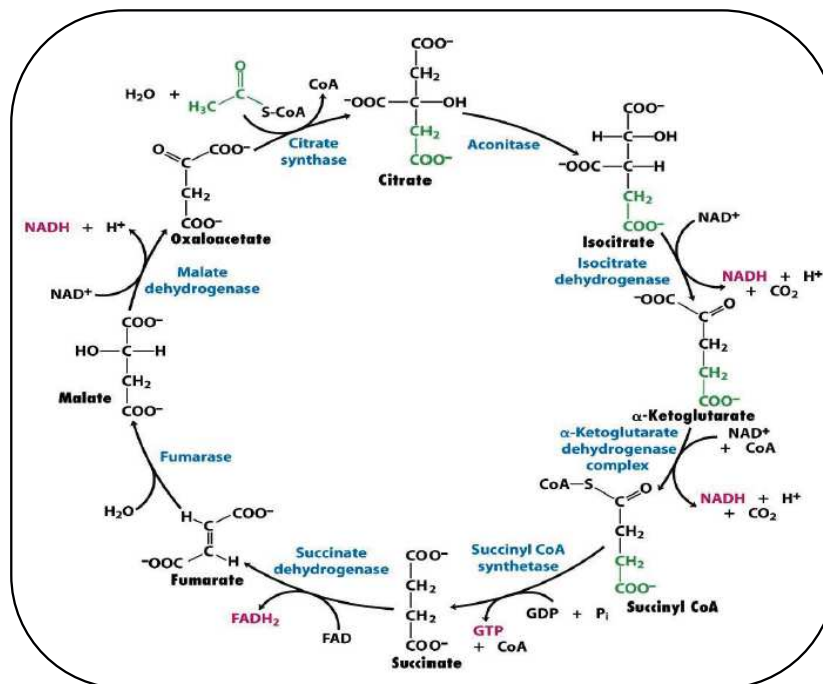


Figure 27: Le cycle de Krebs.

Ensemble des différentes réactions du cycle de Krebs. La décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA ainsi que les réactions du TCA se produisent dans la matrice mitochondriale.

Adaptée de Freeman et al. (2012).

Dans les cellules cancéreuses, l'activité de la PDH, l'enzyme qui convertit le pyruvate en acétyl-CoA, peut aider à comprendre pourquoi les cellules ont besoin de sources alternatives pour faire des intermédiaires du TCA. L'activité de la PDH est contrôlée principalement au niveau post-traductionnel, par 2 classes de kinases (les pyruvate déshydrogénase kinases ou PDKs) et de phosphatases (les pyruvate déshydrogénase phosphatases ou PDPs). Quand la PDK est active, elle phosphoryle la sous unité α de la PDH du complexe E1 entraînant une inhibition de son activité (339). L'activité de la PDK est typiquement plus élevée dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales, suggérant que la conversion du pyruvate en acétyl-CoA est plus faible dans les cellules cancéreuses (340). Par ailleurs, l'activation de PDK1 par le facteur de transcription HIF1a est un mécanisme qui participe à la reprogrammation métabolique des cellules hypoxiques. Des études du laboratoire auxquelles j'ai participé ont également récemment mis en évidence un rôle important du facteur de transcription E4F1 dans le contrôle transcriptionnel d'un groupe de gènes codant pour des sous-unités enzymatiques ou des régulateurs de la PDH (Lacroix, Rodier, Kirsh et al. PNAS et Goguet-Rubio, Seyran et al. PNAS sous presse)

Le cycle de Krebs joue un rôle important dans la production d'intermédiaires pour des voies anaboliques (acides aminés, acides gras, sucres, porphyrine) et possède aussi de nombreuses voies anaplerotiques indispensables pour renouveler ses intermédiaires métaboliques. De plus le cycle de Krebs fournit des nucléotides réduits comme le NADH,

FADH₂ et GTP qui seront pris en charge par la chaîne respiratoire mitochondriale afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

7) Glutaminolyse:

Comme discuté ci dessus, le fait que le pyruvate soit majoritairement converti en lactate dans les cellules cancéreuses plutôt qu'utilisé comme source dans le TCA, les besoins de production en ATP mitochondrial diminuent. Pour compenser ces changements et maintenir un cycle de Krebs fonctionnel, les cellules cancéreuses ont une glutaminolyse plus élevée que les cellules normales (**Figure 28**). La glutamine exogène est transportée à travers la membrane plasmique par des transporteurs comme SLC1A5 ou SLC7A5 avant d'être convertie en glutamate puis en α -kétoglutarate respectivement par la glutaminase (GLS) et la glutamate déshydrogénase (GDH). L' α -kétoglutarate rentre alors dans le cycle de Krebs et va permettre de produire de l'ATP et des carbones dits "anaboliques" qui seront utilisés pour la synthèse de certains acides aminés, nucléotides et lipides (**341**).

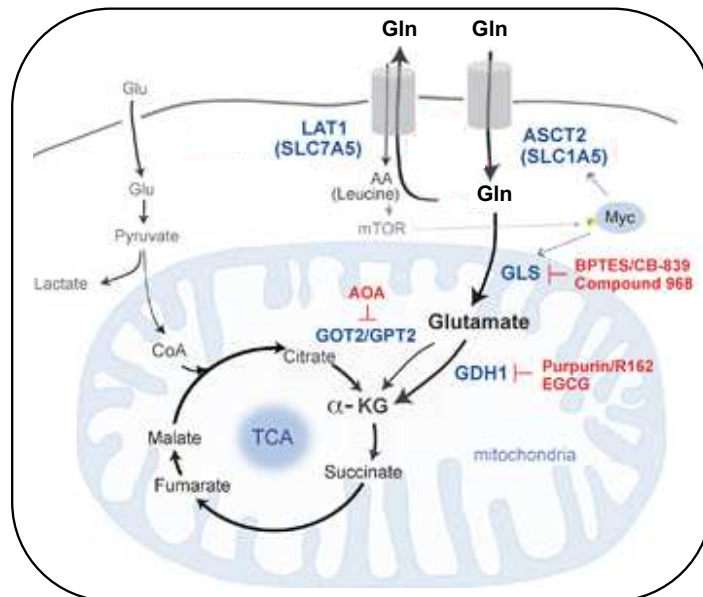


Figure 28: La glutaminolyse.

Représentation schématique de la glutaminolyse dans les cellules cancéreuses. Les enzymes de la glutaminolyse (en bleue) sont des cibles potentielles dans la lutte contre le cancer (inhibiteurs connus en rouge).

V Activating Transcription Factor:

1) Découverte et nomenclature:

Les Activating Transcription Factor (ATF) ont d'abord été référencés comme des protéines qui se lient sur les promoteurs des adénovirus E2, E3 et E4 dont le site de liaison a pour séquence CGTCA (342). En parallèle d'autres études ont mis en évidence des protéines cAMP responsive element binding protein (CREB) qui se lient sur le promoteur de la somatostatine dont le site est un site de liaison cAMP responsive element (CRE) (343). Ces deux sites de liaisons ont été identifiés comme consensus avec une séquence type TGACGT(C/A)(G/A). Cependant le fait de retrouver ces séquences sur des promoteurs viraux et sur des promoteurs cellulaires a poussé de nombreux groupes à purifier l'ensemble des protéines se liant sur cette séquence consensus. Ainsi les clones d'ADN complémentaire (ADNc), codant pour ces protéines qui se lient sur le site ATF/CRE, ont été isolés. Tous les membres de la famille CREB/ATF sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN de type "leucine zipper" (bZip). 20 membres ont été décrits jusqu'à présent: les membres de la sous-famille CREB/CREM, ATF2, ATF3, ATF4, ATF5, ATF6, ATF7 et B-ATF (344).

Lors de mes travaux de thèse, je me suis intéressé plus particulièrement aux facteurs de transcription ATF3 et ATF4.

2) ATF3:

a) ATF3 et réponse au stress:

L'expression d'ATF3 est maintenue à des niveaux faibles voir non détectables dans des conditions de base. La protéine est stabilisée en réponse à différents types de stress parmi lesquels on retrouve l'ischémie, l'hypoxie, les dommages à l'ADN et les agents génotoxiques (344).

Au delà de son rôle dans des voies de réponse au stress, ATF3 peut être induit par les adipokines (345) ou encore par certaines cytokines lors d'une infection. Certains groupes ont également décrits une augmentation du niveau d'ATF3 au cours de la transition G1/S (346). De fait, ses fonctions s'étendent au delà de réponses de stress et Tsonwin Hai a suggéré qu'ATF3 était en réalité un gène de réponses adaptatrices (347). Ainsi ce facteur de transcription clé module l'expression d'un grand nombre de gènes cibles en fonction du type cellulaire et/ou de la nature des stimuli. Le messageur d'ATF3 augmente généralement dans les deux heures qui suivent l'exposition au stress, et la protéine peut agir en tant qu'homo ou hétéro dimère avec des protéines de la famille C/EBP (CCAAT/ enhancer binding protein). Dans ces voies de stress, l'expression d'ATF3 suite aux stress n'est que transitoire. Le retour au niveau de base d'ATF3 peut impliquer l'auto-répression de son propre promoteur qui contient une séquence ATF/CREB et/ou sa dégradation par l'ubiquitine E3 ligase MDM2 (348).

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans l'induction d'ATF3. Parmi elles on retrouve la kinase ATM qui induit la réponse ATF3 suite à un rayonnement ionisant (349), la kinase PERK suite à un stress du réticulum endoplasmique, GCN2 après

une carence en acides aminés (350) et p38 après une blessure épidermique (351). Généralement ces kinases n'agissent pas directement sur ATF3 mais elles agissent sur d'autres membres de la même famille comme ATF4 ou ATF2 qui à leur tour vont transactiver le promoteur d'ATF3. De plus, ATF3 est connu pour être impliqué dans des voies de signalisation incluant TGF β (352), le récepteur Toll Like 4 (TLR4) (353) et la voie p53 (354). Ainsi, il est établi qu'ATF3 joue des rôles importants dans le maintien de l'intégrité génétique et de l'homéostasie cellulaire en condition de stress. ATF3 régule de nombreuses voies cellulaires et ce en fonction du contexte ou du type de tissu dans lequel il est exprimé. Il est clair que dans de nombreux types cellulaires, ATF3 contribue à entraîner un dysfonctionnement. Alors que dans d'autres types de tissu ATF3 apparaît comme bénéfique avec par exemple un rôle anti-apoptotique (355).

b) Les fonctions d'ATF3:

ATF3 est connu pour dimériser avec plusieurs membres de la famille ATF/CREB incluant ATF2, c-JUN, JUN-D et JUN-B. En fonction du contexte, ces hétéro dimères peuvent agir soit en tant que répresseurs soit en tant qu'activateurs transcriptionnels. Il est donc rapporté que la régulation transcriptionnelle médiée par ATF3 est différente en fonction du contexte cellulaire. ATF3 interagit avec de nombreuses protéines afin de modifier leurs fonctions.

En se liant au suppresseur de tumeur p53, ATF3 empêche son ubiquitinylation et favorise ainsi son activation (**Figure 29**) (356).

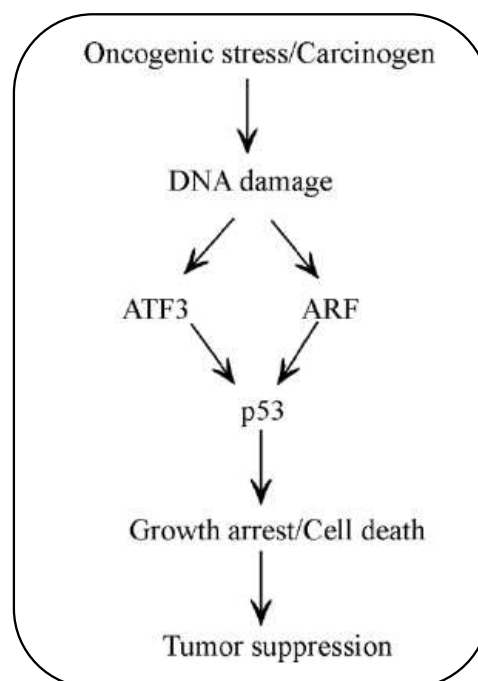


Figure 29: Réponse p53 médiée par les signaux de stress d'ATF3.

*Modèle résumant l'activation de p53 par ATF3 en réponse à des stress génotoxiques
Adaptée de Chunhong Y et al. (2006).*

ATF3 forme un complexe avec SMAD3 en vue de réprimer Id1 (inhibitor of differentiation) dans les cellules épithéliales en réponse à la voie TGF β (357).

ATF3 est aussi impliqué dans la réponse immunitaire. En effet les actions d'ATF3 sur NF- κ B et sur l'histone déacétylase HDAC1 aboutissent à l'inhibition de la transcription des interleukines 6 et 12b via des changements la structure chromatinienne (358).

ATF3 peut avoir des effets opposés lors de nombreux processus biologiques. A titre d'exemple, ATF3 a été montré capable de médier des effets pro- et anti- apoptotiques. Son expression facilite l'action de composés anticancéreux qui induisent l'apoptose (359) suggérant un rôle pro-apoptotique. D'autre part des travaux suggèrent que ATF3 peut avoir des rôles protecteurs notamment dans la protection des neurones vis à vis de la mort apoptotique. ATF3 est aussi un régulateur de la machinerie du cycle cellulaire au cours duquel il peut activer la transcription de la *cycline D1* (360) ou paradoxalement diminuer le passage de la phase G1 à la phase S (361).

c) ATF3 et cancer:

Au vu des multiples rôles d'ATF3 dans des voies de réponse au stress il n'est pas surprenant que des études récentes montrent les rôles d'ATF3 dans les cancers humains (362). Le premier lien entre ATF3 et le cancer provient d'études montrant qu'ATF3 est surexprimé dans des cellules de mélanomes et que cette expression corrèle avec leur capacité métastatique (363). Paradoxalement, une surexpression d'ATF3 dans des cellules de cancer du côlon bloque leur invasion in vitro ainsi que la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe chez la souris nue (364).

Les fonctions paradoxales discutées plus haut d'ATF3 sont aussi retrouvées dans un contexte tumoral. ATF3 joue un rôle dans le cancer car il régule la stabilité de p53, mais peu aussi bloquer la progression tumorale en supprimant l'apparition de métastases. Pour cela ATF3 régule des protéines impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine (365). Il est possible qu'ATF3 joue un rôle différent dans la progression tumorale en fonction du contexte dans lequel il se trouve. Par exemple dans le cancer de la prostate, l'expression d'ATF3 est faible; ici le contexte physiologique tend à réguler négativement l'expression d'ATF3 car il est connu qu'ATF3 régule négativement le récepteur aux androgènes et donc bloque la prolifération et la survie des cellules épithéliales prostatiques (366).

De plus, ATF3 lie des sites du génome associés avec des gènes impliqués dans les réponses aux stress cellulaires. Ces régions sont souvent enrichies de cofacteurs comme p300 et des modifications épigénétiques telle que l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Ac). Cependant lors de stress tel que les dommages à l'ADN, ATF3 colocalise avec p53 afin de participer à la régulation des gènes cibles de p53 et déclencher une réponse au stress dépendante de p53 (367).

Cependant les différents travaux sur ATF3 ne permettent pas de spécifier clairement si ATF3 est bénéfique pour la croissance ou la progression des tumeurs humaines, d'autant plus que des données récentes suggèrent un rôle antagoniste d'ATF3 dans les cancers humains.

Les rôles multiples d'ATF3 au cours de la progression tumorale sont également illustrés par des études de profilage d'expression de cancers du sein (368, 369), du rein (370), du foie (371), du côlon (372) et de la prostate (373). Ces études montrent que le niveau d'expression d'ATF3 baisse dans ces types tumoraux alors que d'autres études montrent que dans le cancer du poumon, une partie des tumeurs ont une amplification du nombre de copie du gène *Atf3* (374). Cette même étude montre que l'autre partie des tumeurs analysées a subi des événements génétiques conduisant à la perte du gène *Atf3*, suggérant que dans ces tumeurs, ATF3 peut jouer le rôle de suppresseur de tumeurs.

3) ATF4:

a) localisation, structure et expression :

D'un point de vue localisation, le gène ATF4 est situé dans la région q13.1 du chromosome 22. La structure de son messager inclut 3 régions de lecture ouverte (uORF) dans la partie 5' UTR qui précède la séquence codante permettant de réguler l'expression du gène (**Figure 30**).

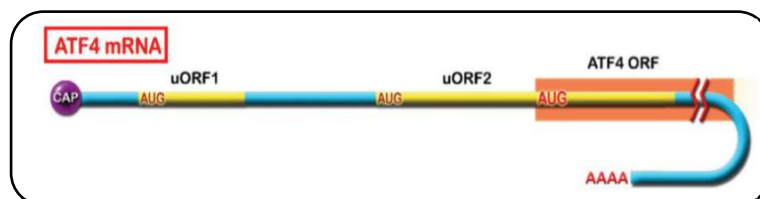


Figure 30: L'ARNm d'ATF4.

Structure de l'ARN messager d'ATF4 illustrant les 3 régions de lecture ouverte
Adaptée de Kilberg M.S. et al. (2009).

ATF4 est un facteur de transcription qui joue un rôle central dans les voies de réponse à certains stress cellulaires, en particulier la réponse aux protéines mal repliées (UPR). Cette voie de stress débute dans le réticulum endoplasmique où le repliement des protéines s'effectue, et conduit à l'activation de la kinase PERK (**375, 376**) qui phosphoryle la sous unité α du facteur d'initiation eucaryote 2 (eIF2 α), une protéine essentielle à la traduction.

Le mauvais repliement des protéines peut intervenir en conditions hypoxiques, lors de la carence en glucose ou encore lorsque les niveaux de calcium sont altérés. A noter que la phosphorylation de eIF2 α peut aussi être induite par 3 autres kinases :

- GCN2 en réponse à une carence en acide aminé, irradiation aux ultraviolets et inhibiteur du protéasome (**377, 378, 379**).
- HRI qui est régulée par les niveaux de stress oxydatif (**380**).
- PKR, le composant majeur de la réponse antivirale stimulée par l'ARN double brin (**381**).

La phosphorylation de eIF2 α sur la sérine 51 conduit à l'inhibition de la synthèse protéique en bloquant la génération de eIF2 α -GTP à partir du eIF2 α -GDP. La forme eIF2 α -GTP est requise pour la liaison de l'ARN de transfert (ARNt) d'initiation sur la petite sous unité ribosomale. Malgré cette inhibition générale de la traduction, la phosphorylation d'eIF2 α permet la traduction d'un groupe spécifique d'ARNm possédant des phases de lecture ouvertes (uORFs) dans leur région 5' non traduite (5'-UTR).

L'ARNm d'ATF4 contient 2 uORFs. Suivant laquelle est utilisée, l'expression de la protéine ATF4 est modulée. Il est clairement établi que l'organisation de ces uORFs en 5'-UTR est essentielle pour la réponse aux stress d'ATF4 (**382, 383**). Quand les niveaux d'eIF2 α -GTP sont élevés, c'est à dire en condition basale où les cellules ne sont pas stressées, les ribosomes traduisent l'uORF1 et l'uORF2. Cette uORF2 interfère alors avec la traduction de l'ORF d'ATF4.

A l'inverse, lorsque les niveaux d'eIF2 α -GTP sont faibles, les kinases activées en réponse aux stress phosphorylent eIF2 α et empêchent cet échange du GDP en GTP. Ainsi la sous

unité ribosomale qui a traduit l'uORF1 a un temps de latence et glisse sur l'uORF2 pour traduire l'ORF ATF4 (**Figure 31**). Cette augmentation de la traduction d'ATF4 lors de stress, induit l'activation transcriptionnelle de gènes cibles spécifiques contenant des éléments de réponse à ATF4 tel que l'élément de réponse aux acides aminés (AARE) dans leur promoteur (**384**).

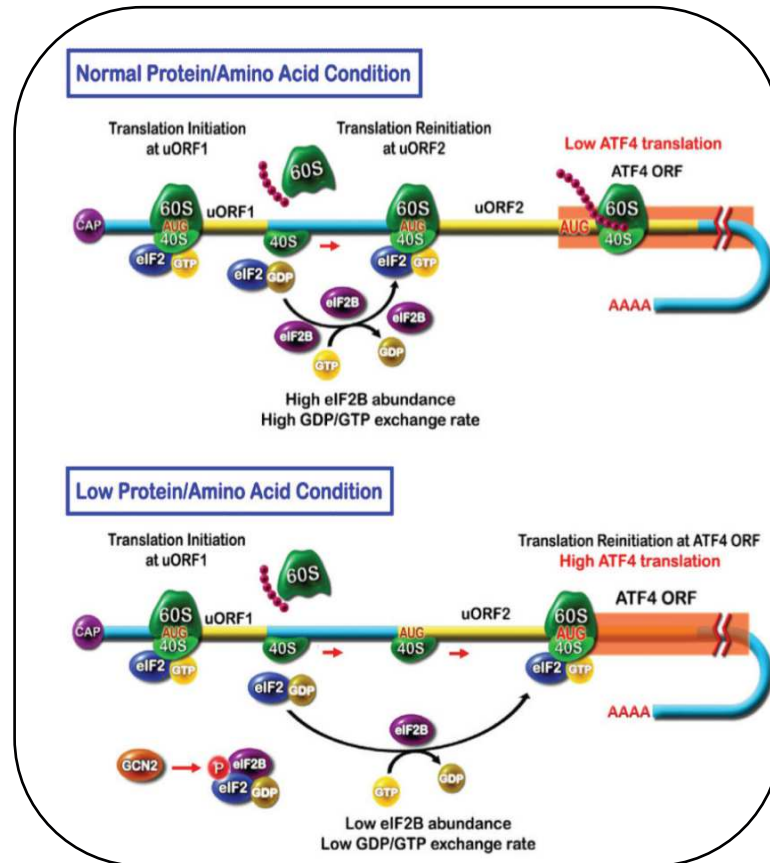


Figure 31: Régulation de la traduction d'ATF4.

Schéma de la traduction de l'ARN messager d'ATF4 en fonction des conditions de stress. Dans des conditions normales, on observe une faible expression d'ATF4 alors que lors de stress la faible abondance de GTP entraîne une forte expression de la protéine ATF4.

Adaptée de Kilberg M.S. et al. (2009).

La protéine ATF4 ainsi traduite est composée de 351 acides aminés et est structurée en plusieurs domaines essentiels pour l'homo/hétéro dimérisation, la liaison à l'ADN et la régulation de la stabilité d'ATF4. Le principal domaine d'ATF4 est son domaine d'activation transcriptionnelle situé dans sa partie N terminale (**385**).

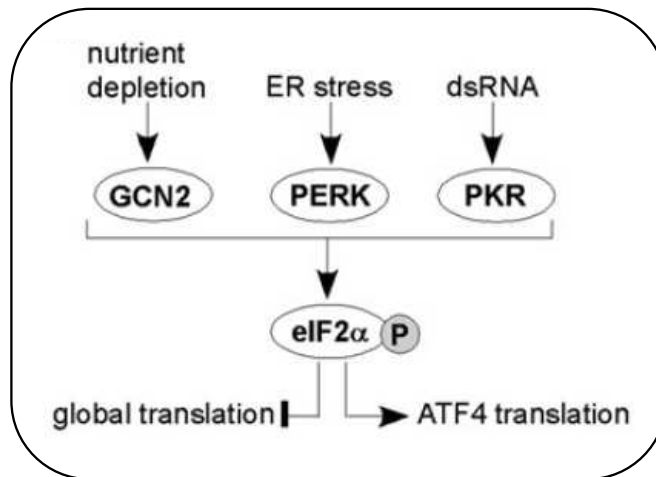


Figure 32: Les différentes kinases qui permettent la réponse ATF4 classique.

Illustration des différentes voies de stress conduisant à la traduction d'ATF4 au détriment de la traduction de base.

Adaptée de Qing G. et al. (2012).

b) Synthèse et dégradation :

ATF4 est un gène de réponse aux stress qui est régulé par de nombreux facteurs incluant la carence en oxygène (386), la carence en acide aminé, le stress oxydant et le stress du RE (387). Ces différents stress permettent l'induction d'ATF4 via sa traduction dépendante de la phosphorylation d'eIF2 α comme discuté précédemment. Par ailleurs, deux mécanismes ont été décrits pour impacter la stabilité de la protéine ATF4. Cette stabilité est modulée par l'ubiquitine ligase SCF ^{β TrCP} et par l'histone acétyltransférase p300. En effet l'interaction avec SCF ^{β TrCP} provoque son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome 26S (388). A l'inverse, l'interaction avec p300 bloque le recrutement de la ligase SCF ^{β TrCP} et donc stabilise ATF4 (389).

c) Fonctions biologiques :

ATF4 peut fonctionner comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel. C'est aussi un gène de protection des cellules qui régule leur capacité d'adaptation à des facteurs de stress comme les stress ER ou oxydatifs. A l'origine décrit comme un répresseur transcriptionnel sur le promoteur de l'encéphaline (390), ATF4 est aussi un activateur transcriptionnel comme en témoignent ces travaux sur les gènes *Rankl* (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), *Ostéocalcine* (391), *E sélectine* (392), *Vegf* (393), *Asparagine synthase* (394, 395) ainsi que de nombreux gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales, le métabolisme des acide aminés et le potentiel redox (396).

Par ailleurs, ATF4 joue un rôle clé dans la réponse à une carence en acide aminé (397, 398). Plusieurs études très récentes illustrent le rôle d'ATF4 dans le métabolisme des acides aminés et plus particulièrement dans celui de la sérine. KDM4C, une déméthylase d'histone, a été montré comme essentielle dans l'expression d'ATF4 et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la sérine tels que *Phgdh* et *Psat1* (399). En condition de carence en sérine, KDM4C est recruté, avec ATF4, sur le promoteur de ces gènes afin de favoriser la monométhylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me1), une marque épigénétique associée à l'activation de la transcription. Cette marque épigénétique semble jouer un rôle particulier dans le métabolisme de la sérine car d'autres travaux

montrent également le rôle de l'histone méthyl transférase G9A, une enzyme qui triméthyle H3K9 (H3K9me3), dans la transcription de ces gènes impliqués dans la biosynthèse de la sérine (400). Enfin, des études portant sur NRF2, un partenaire et régulateur connu d'ATF4 en réponse à un stress oxydant (401, 402), montrent que NRF2 régule la biosynthèse de la sérine via une réponse ATF4 dépendante (403). L'ensemble de ces études, ainsi que mes propres travaux décrits plus en détails dans la partie résultat de ce manuscrit, placent ATF4 au coeur du métabolisme des acides aminés et plus précisément celui de la sérine. Ils positionnent de fait ATF4 comme un gène essentiel pour la survie des cellules cancéreuses soumis à une carence en acide aminés et lors d'un stress oxydatif.

En plus du métabolisme des acides aminés, une étude récente souligne le rôle d'ATF4 dans la synthèse de novo des nucléotides. En effet, ATF4 est capable de se lier sur le promoteur de la méthylentetrahydrofolate déshydrogénase 2 (MTHFD2), une enzyme importante du cycle des folates. ATF4 permet l'expression de MTHFD2 afin de réguler la production de formate, indispensable pour la voie de synthèse *de novo* des purines. La régulation de cette voie par ATF4 n'est pas la résultante des voies classiques d'activation (réponse au stress) mais provient de l'activation d'une voie non canonique de réponse aux signaux de croissance médiée par mTORC1 (404).

VI Le stress oxydatif:

1) Introduction:

Les ROS sont des molécules hautement réactives qui proviennent à l'origine de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (ETC) mais peuvent aussi provenir d'autres voies comme les effets d'un dommage aux radiations ionisantes ou les produits de nombreuses enzymes cellulaires incluant la NADPH oxydase (Nox), la xanthine oxydase (XO)... (405). Le premier article publié à propos des espèces réactives oxygénées (ROS) date de 1945. Depuis de nombreux travaux lient les ROS avec de nombreuses pathologies telles que le cancer, le diabète, le vieillissement ou encore les maladies cardiovasculaires. Cependant d'autres travaux lient également les ROS à de nombreux processus physiologiques comme la transduction du signal, les défenses immunitaires... Il est donc maintenant clair que pour maintenir l'homéostasie, les organismes vivants ont tout intérêt à garder sous étroit contrôle ces molécules réactives. Le niveau de ROS dépend d'une balance fine entre les mécanismes de production de ROS et les systèmes de défense antioxydant.

2) ROS et processus physiologiques normaux:

Les ROS ont été plus particulièrement connues pour leurs effets délétères, mais de nombreuses évidences s'accumulent quant à leurs rôles dans la régulation et le maintien de processus normaux dans les organismes vivants. Les ROS et les systèmes de protection contre ces mêmes ROS travaillent en coordination pour contrôler le statut redox de la cellule. Parmi les rôles physiologiques des ROS, on trouve notamment:

- la régulation du diamètre des vaisseaux sanguins par des niveaux modérés de ROS (406)
- la réponse à l'hypoxie. Quand les cellules sont en manque d'oxygène, la mitochondrie libère un excès de ROS. Cette augmentation est requise pour l'activation de HIF-1 (407) qui à son tour va permettre une réponse métabolique adaptative.
- La réponse immunitaire innée et adaptative. Dans ce cas, les ROS sont impliquées lors de l'exposition à des pathogènes. La libération d'un excès de ROS par les macrophages représente une des premières étapes dans la défense contre les pathogènes. Cet excès de ROS est aussi responsable de l'activation des lymphocytes T en marge de la réponse adaptative (408).
- L'inflammation. L'exposition des cellules à des excès de ROS conduit à des modifications post-traductionnelles sur des protéines clés impliquées dans des processus vitaux comme l'inflammation ou les maladies liées à l'âge comme le cancer, etc. (409).

3) ROS et cancer:

Au-delà de ses fonctions physiologiques, le stress oxydatif chez l'homme est connu pour jouer un rôle dans le développement de nombreuses pathologies, ou dans l'exacerbation de leurs symptômes. Plus de 200 maladies liées à la génération de ROS ont été reportées dans la littérature. Parmi ces pathologies, se trouvent : le cancer (410), la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer (411), la crise cardiaque (412), l'infarctus du myocarde (413), la schizophrénie (414), les troubles bipolaires (385), le syndrome du X fragile (415), la drépanocytose (416), le lichen plan (417), le vitiligo (418), l'autisme (419), le diabète (420), ou encore le syndrome de fatigue chronique (421).

a) Les ROS: acteurs de la tumorigenèse:

De nombreux travaux montrent que les ROS sont des acteurs clés de la formation et de la progression tumorale avec souvent des effets paradoxaux selon les contextes expérimentaux ou le type/stade tumoral. Tout d'abord, les ROS peuvent être impliquées dans les phases d'initiation de la tumorigenèse. En effet, les cellules cancéreuses présentent des niveaux de ROS intracellulaires beaucoup plus importants que les cellules normales, en partie à cause de la stimulation oncogénique, l'augmentation de l'activité métabolique, et des dérèglements de certaines activités mitochondriales (393). Cette augmentation du stress oxydant peut alors provoquer une altération du matériel génétique, induisant des mutations de l'ADN, et ainsi participer à la tumorigenèse. L'altération d'autres processus biologiques associés à l'oncogenèse par les ROS ont été décrits, tels que le blocage ou l'induction de la transcription, des erreurs de réplication, la dérégulation de certaines voies de transduction du signal, ou encore de l'instabilité génomique (422).

De plus, les ROS peuvent agir sur des voies de signalisation oncogéniques, telles que celles impliquant le suppresseur de tumeur p53. Les ROS peuvent réguler l'activité de p53, mais la production de ROS peut également être une conséquence de l'activation de p53 (423). Le statut redox, et par conséquent les fonctions de p53, peuvent également être affectés par des molécules anti ou pro oxydantes tels que le glutathion, la thiorédoxine, ou encore les dérivés nitrosylés. Ainsi, la S-glutathionylation ou l'oxydation de résidus cystéines de p53 ont été associées à une perte de fonction de p53 (424). A l'inverse, la thiorédoxine réduit les formes oxydées de p53, ce qui va augmenter sa liaison à l'ADN, son activité transcriptionnelle (425) et conduire à l'apoptose. Le facteur de transcription p53 peut également influencer les niveaux de ROS en régulant l'expression de gènes pro-oxydants ou antioxydants. Il peut ainsi augmenter spécifiquement la

transcription de la GPX, de PIGs (p53-Induced Genes), de la glutaredoxine 3, et réprimer celle de la cyclo-oxygénase 2, et de NOS2. Enfin, au travers de la modulation de la respiration mitochondriale, p53 peut également jouer sur la production de ROS endogènes (426). Il apparaît donc que les interconnexions entre p53 et les ROS jouent un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. De façon intéressante, p53 possède à la fois des fonctions pro-oxydantes, impliquées dans l'induction de la mort cellulaire ou la sénescence (427, 428), et des fonctions antioxydantes qui vont protéger la cellule des dégâts du stress oxydatif (429). Ce potentiel antioxydant a notamment été démontré dans des carcinomes de poumon dans lesquels la déplétion de p53, par shRNA, ou la surexpression de mutants oncogéniques dominants négatifs, provoquent une augmentation des niveaux de ROS intracellulaires (430). L'ensemble de ces observations a conduit à la question de savoir dans quelles conditions p53 agit comme un pro-oxydant ou comme un antioxydant. La réponse à cette question est déterminée par la concentration de p53. Dans des conditions physiologiques, les faibles niveaux de p53 bloquent les ROS, tandis que de fortes quantités de p53 induisent l'accumulation de ROS en réponse aux stress cellulaires (431). De fait, p53 joue un rôle critique dans le statut redox cellulaire, qui peut être régulé par le degré de stress, sa localisation subcellulaire, ses modifications, et ses partenaires protéiques (432). En revanche, peu d'informations décrivent le rôle de MDM2 dans des conditions de stress oxydatif, notamment lorsque ses fonctions ne font pas intervenir p53. Il apparaît néanmoins que MDM2 est induit au niveau transcriptionnel en présence de stress oxydatif dans des cellules musculaires cardiaques au travers d'effets médiés par un complexe de la famille AP-1 qui agit sur le promoteur P2 de *Mdm2* (433). Par ailleurs, au niveau post-traductionnel, MDM2 est phosphorylé sur sa sérine 166 en réponse à l'activation de la voie ERK $\frac{1}{2}$ (434), et enfin en réponse à un stress oxydant, MDM2 induit la monoubiquitinylation de FOXO4 et l'inhibition de ses gènes cibles (435).

Il est à noter, qu'en plus de cette régulation de p53, les ROS ont également été impliqués dans le contrôle de l'expression de deux autres suppresseurs de tumeurs: pRB et PTEN (436).

Le métabolisme énergétique serait une cible de l'activité des ROS. Il a notamment été montré que la cellule cancéreuse pouvait sécréter des ROS (tel que l' H_2O_2), induisant de ce fait des niveaux élevés de stress oxydatifs dans les cellules fibroblastiques du stroma environnant, conduisant à l'autophagie, la mitophagie, et une stimulation de la glycolyse aérobie dans ces cellules (437). Ce couplage métabolique parasite, appelé « effet Warburg inversé » permet de convertir le stroma en une usine à nutriments qui permet d'alimenter la cellule cancéreuse.

L'angiogenèse est un autre facteur important pour la croissance tumorale et la formation de métastases. La NADPH oxydase, appartenant à la famille des enzymes générant des ROS, joue un rôle important dans la signalisation redox des cellules tumorales, endothéliales, et immunes au travers de la production d'anions super oxyde pour permettre l'angiogenèse tumorale (438).

Comme c'est le cas des cellules souches hématopoïétiques, les ROS semblent également impliqués dans la régulation des cellules souches cancéreuses. Ces cellules font parties intégrales des mécanismes physiopathologiques de la progression tumorale, des métastases, et de la chimio/radio résistance. Il a été montré que ces cellules résident dans des niches caractérisées par des niveaux faibles de ROS qui est un facteur critique pour conserver les propriétés propres aux cellules souches telles que l'auto-renouvellement. Cependant, ces résultats intéressants restent assez peu caractérisés et nécessitent des investigations plus poussées (439).

b) Rôle bénéfique potentiel des ROS dans le cancer:

Les ROS jouent un double-rôle dans les cancers. Ils peuvent contribuer à leur développement, mais paradoxalement, différentes études ont montré que les ROS peuvent également inhiber la prolifération tumorale dans différentes cellules cancéreuses (440, 441). Cette dualité peut se retrouver dans les voies de signalisation qui sont activées au cours de la progression tumorale. Par exemple, les ROS participent à l'activation à la fois de la voie Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 et de la voie p38MAPK, qui ont des effets opposés dans la tumorigenèse. La première est impliquée dans la promotion du cancer, alors que la deuxième est associée à une variété de réponses telles que la sénescence (induite et répliquative), l'inhibition de contact, et la réponse aux dommages à l'ADN.

De plus, il a également été montré que de fortes quantités de ROS pouvaient également activer plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire, telles que p16^{INK4A}, pRb, ou encore PKC δ (442, 443, 444), conduisant alors à la sénescence des cellules cancéreuses.

Enfin, des essais cliniques chez l'homme ont montré que le traitement, randomisé et en double aveugle, de patients fumeurs, par des antioxydants (β -carotènes), ont conduit à une augmentation du risque de cancer du poumon (445, 446). Ces résultats renforcent la notion selon laquelle les ROS contribuent à la suppression de tumeurs.

Il semble que finalement, la concentration de ces réactifs oxygénés soit la clé de cette double activité. Alors qu'une quantité modérée de ROS est nécessaire à la tumorigenèse, des niveaux excessifs conduisent à la suppression de tumeurs (447). Cependant, les effets des ROS ne peuvent être analysés comme un phénomène général, puisqu'ils constituent plusieurs entités moléculaires, chacune d'entre elles pouvant générer des effets différents. Une régulation fine des niveaux de pro-oxydants et d'antioxydants pourrait donc servir en tant que nouvelles stratégies anticancéreuses. Ainsi, à la fois des agents pro-oxydants, et antioxydants ont été développés pour la prévention et la thérapie cancéreuse. Il a notamment été montré que les cellules normales avaient une plus haute résistance à l'induction de stress oxydant que les cellules cancéreuses. Par conséquent il est possible d'accumuler des ROS dans les cellules cancéreuses, et de les tuer sélectivement (448, 449). Cependant, ces traitements peuvent induire la résistance de certaines cellules cancéreuses les rendant encore plus agressives. De nouvelles thérapies anticancéreuses ont donc été développées à partir de molécules, les nutraceutiques, capables d'être pro-oxydantes et anti oxydantes, en fonction de leur concentration et du type de cancer. L'efficacité dans la prévention et le traitement de ces nouvelles stratégies contre les ROS, pourrait faire des ROS le talon d'Achille de la cellule cancéreuse (450).

4) Les défenses cellulaires contre les ROS:

Pour empêcher ces dommages cellulaires, ou les limiter, les organismes ont développé des systèmes de défense antioxydants très complexes faisant intervenir des systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

a) Les systèmes non-enzymatiques:

Les principaux anti oxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Dans cette partie seul le glutathion, principal antioxydant cellulaire, sera introduit.

Glutathion:

γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine plus communément connu sous le nom de glutathion (GSH) est requis lors de nombreux processus cellulaires pour la maintenance et la régulation du statut redox des cellules. On le retrouve principalement dans le cytosol où a lieu sa synthèse puis est redistribué dans les différentes organelles cellulaires tels que la mitochondrie, le noyau et le réticulum endoplasmique (451). Dans ces organelles le GSH est principalement sous la forme réduite mis à part dans le réticulum endoplasmique où il prédomine sous la forme oxydée, indispensable pour le repliement correct des protéines (452). Le GSH est l'antioxydant cellulaire majeur qui protège les cellules contre les toxines endogènes et exogènes, incluant les espèces réactives oxygénées (ROS) et nitrogénées (NOS) (453). Le GSH est synthétisé *in vivo*, par l'action consécutive de deux enzymes ATP-dépendantes et à partir de trois acides aminés: la cystéine, l'acide glutamique et la glycine (Figure 33). La première enzyme, la glutamate-cystéine ligase (GCL) permet la formation du dipeptide entre le glutamate et la cystéine, se servant de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (454). La seconde enzyme requise pour cette synthèse *de novo* est la glutathione synthase (GS). Celle-ci catalyse l'addition de glycine au dipeptide formé précédemment par la GCL pour ainsi former le GSH. Cette réaction utilise aussi l'hydrolyse de l'ATP.

Comme cité précédemment, le glutathion libre est principalement sous sa forme réduite (GSH) qui peut être convertie sous la forme oxydée (GSSG) lors d'un stress oxydatif. Le statut redox des cellules dépend de la quantité relative de la forme réduite et de la forme oxydée du glutathion (GSH/GSSG). Ce ratio semble être un point critique et décisif pour le bien être de la cellule.

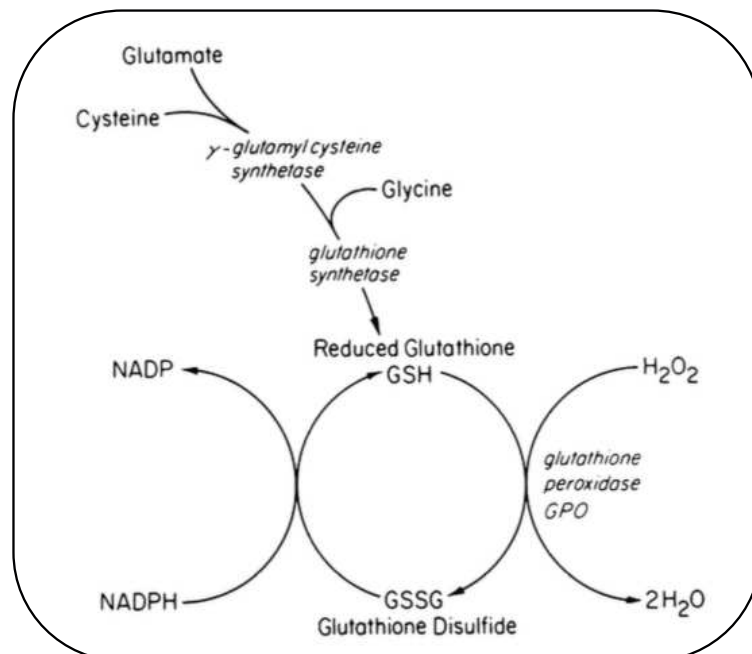


Figure 33: Cycle du glutathion.

Illustration des étapes de formation du glutathion faisant intervenir les acides aminés Glutamate, Cystéine et Glycine, et du cycle permettant de détoxifier la cellule des ROS à partir du GSH.

Adaptée de Harlan et al. (1984).

b) Les systèmes enzymatiques:

Les principales enzymes anti oxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST). Ce sont des enzymes qui agissent de manière coordonnée.

La superoxyde dismutase ou SOD (**455**) est une metalloprotéine. Elle existe sous plusieurs formes qui diffèrent par le métal contenu dans leur site actif et leur localisation cellulaire. La SOD accélère la dismutation du radical O_2^- en H_2O_2 permettant ainsi à l'organisme de contrôler le taux de radicaux libres intracellulaires.

La catalase ou CAT est une enzyme tétramérique contenant un groupe hème qui catalyse la décomposition du H_2O_2 en O_2 . De hauts niveaux de H_2O_2 intracellulaires activent CAD (**456**).

La glutathion peroxydase ou GPX est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. Les GPX permettent la décomposition de H_2O_2 par l'oxydation de son co-substrat le GSH en GSSG.

La glutathion réductase ou GR n'est pas une enzyme antioxydante à proprement parler dans le sens où elle n'a pas d'action directe sur les ROS. Elle permet de régénérer le glutathion sous sa forme réduite via la consommation de NADPH, évitant ainsi la synthèse *de novo* de glutathion qui présente un coût énergétique élevé, dû à la consommation d'ATP.

La glutathion S-transférase ou GST (**457**) a également une action indirecte sur la détoxification des ROS puisqu'elle permet le transport du GSH vers les compartiments cellulaires subissant des dommages oxydatifs.

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme rapporté en introduction, l'oncogène MDM2 est connu pour être le principal régulateur négatif de p53, dont la fonction d'ubiquitylation et de dégradation de p53 par la voie impliquant le protéasome est essentielle pour la survie des cellules normales. Lorsque j'ai débuté ma thèse des données du laboratoire venaient de mettre à jour que MDM2 pouvait être relocalisé au niveau de la chromatine de façon indépendante de p53 en réponse à des stress de types oxydatifs. Si ces travaux ont permis d'observer MDM2 à la chromatine, les principaux objectifs de ma thèse étaient de mettre en évidence les fonctions de MDM2 à la chromatine ainsi que les mécanismes responsables de cette relocalisation.

Ainsi lors de ma thèse j'ai cherché à identifier :

- les mécanismes de recrutement de MDM2 à la chromatine.
- les membres du complexe associé à MDM2 notamment les facteurs d'ancrage à la chromatine.
- les rôles de ce complexe à la chromatine.

Autant de questions en suspens qui permettraient de comprendre le rôle de ce complexe nouvellement identifié à la chromatine indépendamment de p53.

RESULTATS

Article:

Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53.

Romain Riscal, Emilie Schrepfer, Giuseppe Arena, Madi Y. Cissé, Floriant Bellvert, Maud Heuillet, Florian Rambow, Eric Bonneil,1 Frédérique Sabourdy, Charles Vincent, Imade Ait-Arsa, Thierry Levade, Pierre Thibaut, Jean-Christophe Marine, Jean-Charles Portais, Jean-Emmanuel Sarry, Laurent Le Cam and Laetitia K. Linares.

Molecular Cell (2016), 62, 1–13, June 16

Introduction article:

L'oncoprotéine MDM2 est connue pour être le principal régulateur négatif du suppresseur de tumeur p53. De plus, MDM2 est fréquemment retrouvé surexprimé dans un très grand nombre de cancers. Cependant, des études récentes montrent que MDM2 peut avoir des fonctions cellulaires indépendantes de p53, notamment au travers de son activité E3 ligase. De plus la surexpression de MDM2 dans des souris aux fonds génétiques p53 KO ont une tendance à développer plus de sarcomes que des souris p53 KO. Les rôles de MDM2 indépendamment de p53 sont trop peu étudiés dans le développement des cancers.

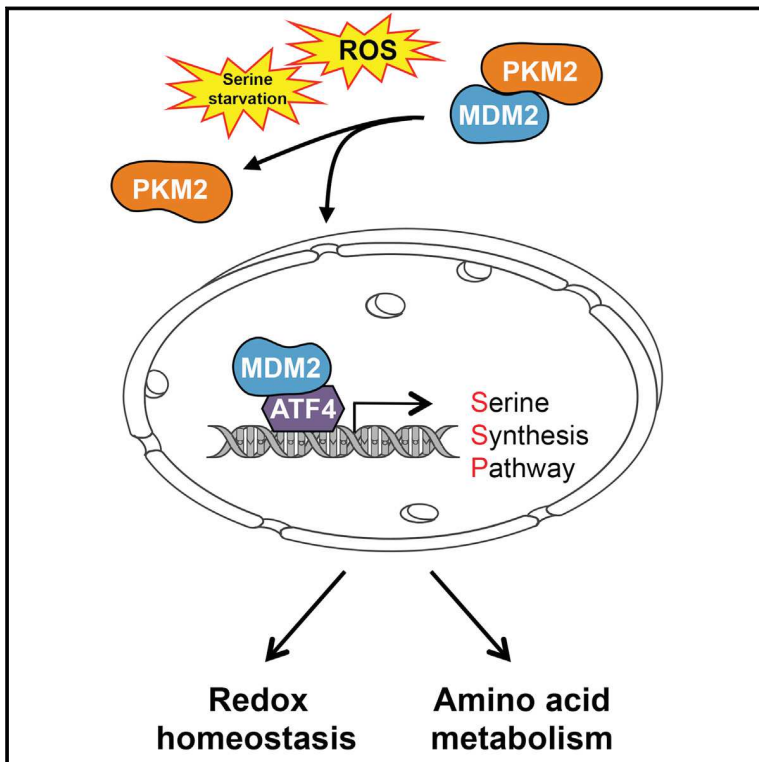
L'importance du métabolisme dans le cancer a ravivé l'enthousiasme pour comprendre la façon dont ces voies sont contrôlées, révélant ainsi quelques contributions intéressantes d'oncoprotéines et de protéines suppresseurs de tumeurs bien connues. Parmi ceux-ci, p53, l'un des défenseurs les plus importants contre le développement tumoral, est un acteur important dans la réponse et la régulation du stress métabolique. Par rapport à nos connaissances des fonctions de p53 dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose, ceci est une nouvelle zone d'influence pour p53 qui est en plein essor. En outre, il est clair que le rôle de p53 dans le métabolisme aura des conséquences dans la mise en place et la progression de la maladie.

Cependant la possibilité que des régulateurs en amont de p53 puissent jouer un rôle dans le métabolisme reste trop peu étudié. L'article qui suit fait l'objet d'études sur un nouveau rôle de MDM2 à la chromatine régulant un programme transcriptionnel complexe impliqué dans le métabolisme des acides aminés et le contrôle de l'état redox des cellules cancéreuses.

Molecular Cell

Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53

Graphical Abstract



Authors

Romain Riscal, Emilie Schrepfer, Giuseppe Arena, ..., Jean-Emmanuel Sarry, Laurent Le Cam, Laetitia K. Linares

Correspondence

laurent.lecam@inserm.fr (L.L.C.),
laetitia.linares@inserm.fr (L.K.L.)

In Brief

Riscal et al. show that the proto-oncogene MDM2 is recruited to chromatin through direct binding to ATF4 but independently of its well-known partner, p53. Chromatin-bound MDM2 regulates a transcriptional program involved in amino acid metabolism and redox homeostasis that contributes to cancer cell proliferation and tumor growth.

Highlights

- MDM2 is recruited to chromatin independently of p53
- Chromatin-bound MDM2 regulates amino acid metabolism and redox homeostasis
- PKM2 modulates MDM2 phosphorylation and its recruitment to chromatin
- Metabolic functions of MDM2 contribute to cancer cell proliferation

Accession Numbers

GSE64439



Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53

Romain Riscal,^{1,2,3,4} Emilie Schrepfer,^{1,2,3,4} Giuseppe Arena,^{1,2,3,4} Madi Y. Cissé,^{1,2,3,4} Floriant Bellvert,^{5,6,7} Maud Heuillet,^{5,6,7} Florian Rambow,^{8,9} Eric Bonnell,¹⁰ Frédérique Sabourdy,^{11,12} Charles Vincent,^{1,2,3,4} Imade Ait-Arsa,^{1,2,3,4} Thierry Levade,^{11,12} Pierre Thibaut,^{10,13} Jean-Christophe Marine,^{8,9} Jean-Charles Portais,^{5,6,7} Jean-Emmanuel Sarry,¹² Laurent Le Cam,^{1,2,3,4,14,*} and Laetitia K. Linares^{1,2,3,4,14,*}

¹IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, 34298 Montpellier, France

²INSERM, U1194, 34298 Montpellier, France

³Université de Montpellier, 34298 Montpellier, France

⁴Institut Régional du Cancer Montpellier, 34298 Montpellier, France

⁵INSA, UPS, INP, Université de Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, 31 077 Toulouse, France

⁶INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, 31400 Toulouse, France

⁷CNRS, UMR5504, 31400 Toulouse, France

⁸Laboratory for Molecular Cancer Biology, Center for the Biology of Disease, VIB, 3000 Leuven, Belgium

⁹Laboratory for Molecular Cancer Biology, Center for Human Genetics, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

¹⁰Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, P.O. Box 6128 Station Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

¹¹Laboratoire de Biochimie Métabolique, IFB, CHU Purpan, 31059 Toulouse, France

¹²INSERM UMR 1037, CRCT, Université Paul Sabatier Toulouse-III, 31062 Toulouse, France

¹³Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128 Station Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

¹⁴Co-senior author

*Correspondence: laurent.lecam@inserm.fr (L.L.C.), laetitia.linares@inserm.fr (L.K.L.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.033>

SUMMARY

The mouse double minute 2 (MDM2) oncoprotein is recognized as a major negative regulator of the p53 tumor suppressor, but growing evidence indicates that its oncogenic activities extend beyond p53. Here, we show that MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 to regulate a transcriptional program implicated in amino acid metabolism and redox homeostasis. Identification of MDM2 target genes at the whole-genome level highlights an important role for ATF3/4 transcription factors in tethering MDM2 to chromatin. MDM2 recruitment to chromatin is a tightly regulated process that occurs during oxidative stress and serine/glycine deprivation and is modulated by the pyruvate kinase M2 (PKM2) metabolic enzyme. Depletion of endogenous MDM2 in p53-deficient cells impairs serine/glycine metabolism, the NAD⁺/NADH ratio, and glutathione (GSH) recycling, impacting their redox state and tumorigenic potential. Collectively, our data illustrate a previously unsuspected function of chromatin-bound MDM2 in cancer cell metabolism.

INTRODUCTION

The MDM2 oncoprotein is an essential component of the p53 pathway that is frequently overexpressed in several types of human cancers (Biderman et al., 2012; Wade et al., 2013). The

antagonistic actions of MDM2 toward p53 are mediated by its E3 ligase activity that targets p53 protein for proteasome-mediated degradation, the control of its subcellular localization, and through direct inhibition of p53 transactivation domains. The critical role of MDM2 in p53 regulation was genetically demonstrated by the rescue of the embryonic lethality of *Mdm2*-deficient mice by the concomitant inactivation of *p53* (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995). Mutations of the p53 tumor suppressor are usually mutually exclusive with other cancer-promoting genetic hits leading to MDM2 deregulation. This genetic feature of most human cancers has provided a rationale for the development of therapeutic strategies aimed at reactivating the cytotoxic functions of p53 by pharmacological agents targeting the MDM2-p53 interaction in tumors bearing wild-type p53 (Khoo et al., 2014; Li and Lozano, 2013; Saiki et al., 2015). However, evidence in both human tumors and mouse models supports the notion that MDM2 oncogenic functions extend beyond p53 regulation. Thus, some human tumors harbor both MDM2 overexpression and p53 mutations (Cordon-Cardo et al., 1994; Watanabe et al., 1994), and MDM2-overexpressing mice in a p53-null background exhibit an increased incidence of sarcomas relative to p53 knockout (KO) mice (Jones et al., 1998). These p53-independent functions of MDM2 remain poorly characterized, but several proteins with known links to cancer development have been identified as direct interactors or substrates of its E3 ligase activity (Bohlmann and Manfredi, 2014; Marine and Lozano, 2010).

The mechanisms by which the p53 pathway suppresses tumorigenesis have been mainly attributed to its ability to control genome integrity and induce cell death, cell-cycle arrest, or cellular senescence (Toledo and Wahl, 2006). However, growing evidence supports the notion that the implication of p53 in

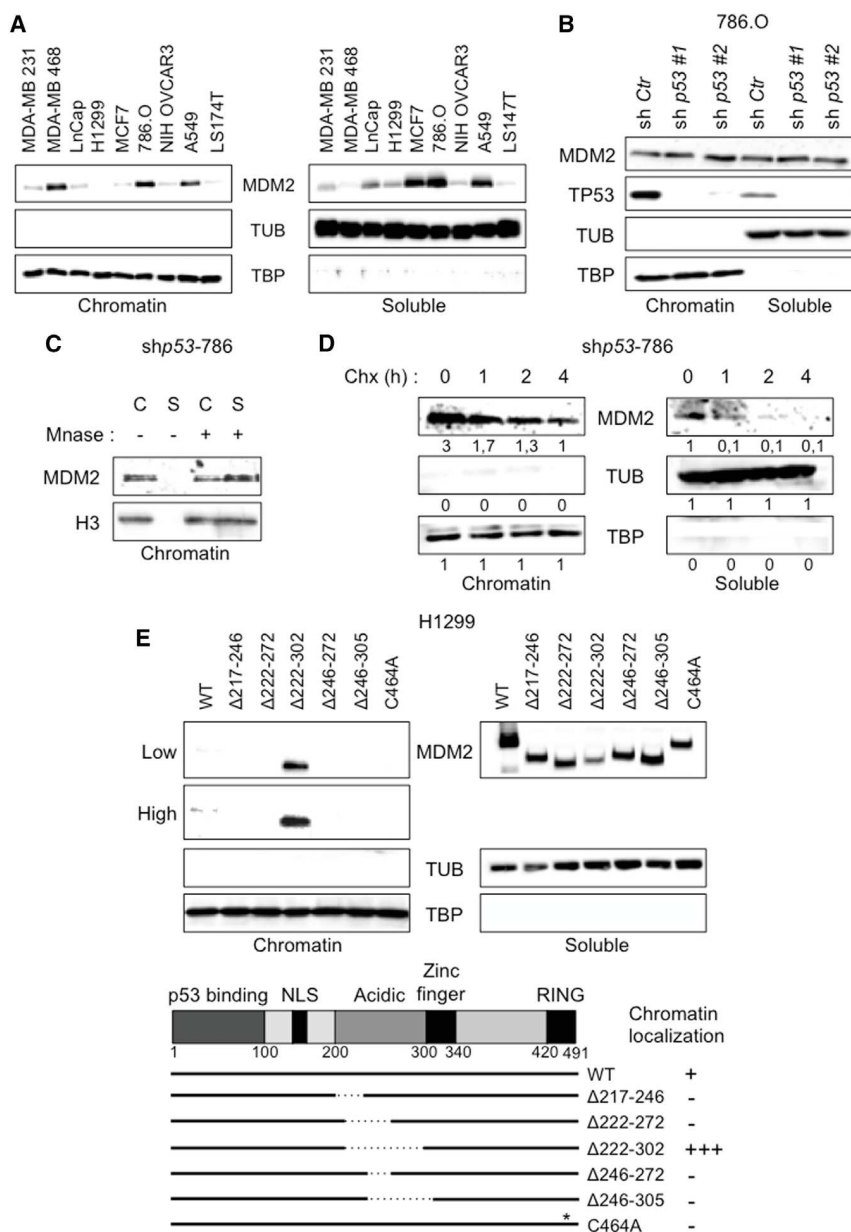


Figure 1. Mdm2 Is Localized in Chromatin Independently of p53

(A) Localization of endogenous MDM2 was assessed in different cancer cell lines by cellular fractionation methods. Fractions enriched in chromatin-associated proteins (chromatin) were separated from pooled fractions containing nucleo- and cytosoluble proteins (soluble) and analyzed by immunoblotting. The quality of the fractionation and equal loading was verified by Tata binding protein (TBP) and Tubulin (TUB) levels.

(B) Immunoblot analyses of the indicated proteins in 786.0 cells expressing a control- or p53-(shp53-786) shRNAs after chromatin fractionation assays.

(C) Chromatin-bound MDM2 was solubilized after digestion of DNA of the chromatin fraction (C) by micrococcal nuclease (Mnase; 10 min) and recovered in the supernatant (S). Release of Histone H3 from chromatin was used as a control of Mnase efficiency.

(D) Half-life of endogenous chromatin-bound or soluble MDM2 was determined by quantitative immunoblotting in shp53-786 cells after incubation with cycloheximide (CHX) for the indicated time.

(E) Localization of the indicated MDM2 mutants after ectopic expression in H1299 cells. Low and high exposures of the MDM2 immunoblots are shown.

See also Figure S1.

play an important role in cancer cell proliferation and tumor growth.

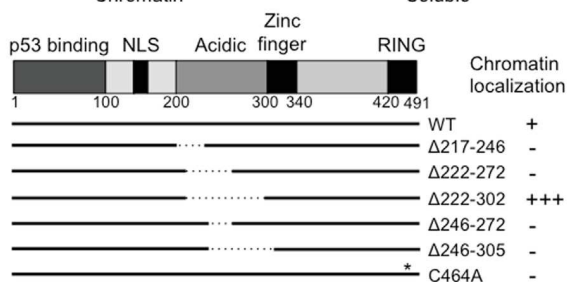
RESULTS

MDM2 Is Localized in Chromatin Independently of p53

To gain insights into MDM2 oncogenic functions, we assessed MDM2 localization in a panel of cancer cell lines following biochemical fractionation of various cellular compartments. Consistent with its role as an E3 ligase, endogenous MDM2 was localized in the cyto-

and nucleosoluble fractions in most of these cell lines. However, we also detected by immunoblotting a variable but significant amount of MDM2 in the chromatin-enriched fraction, ranging from 20% to 80% of the total amount of MDM2 (Figures 1A and S1A). Interestingly, the amount of chromatin-bound MDM2 did not correlate with the p53 status of these cell lines, and this recruitment was also detected in the p53-null H1299 lung cancer cell line. Consistent with the notion that MDM2 was recruited to chromatin independently of p53, small hairpin RNA (shRNA)-mediated depletion of p53 in 786.0 renal cancer cells or in MDA-MB468 breast cancer cells (hereinafter referred to as shp53-786 and shp53-MDA468 cells, respectively) did not alter MDM2 localization in the chromatin-enriched fraction (Figures 1B, S1B, and S1C). Digestion of DNA in the chromatin-enriched

metabolism is essential for its tumor-suppressive activities (Li et al., 2012). Loss of p53 has been proposed to directly contribute to the metabolic reprogramming of cancer cells (Berkers et al., 2013; Liu et al., 2015). Besides its role in glycolysis and oxidative phosphorylation, the complexity of the metabolic network controlled by p53 is illustrated by its role in lipid and amino acid metabolism (Goldstein and Rotter, 2012; Jiang et al., 2015; Maddocks et al., 2013). However, the possibility that upstream regulators of p53 play important roles in metabolism remains poorly investigated. Here, we demonstrate that MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 to regulate a transcriptional program involved in amino acid metabolism and the control of the redox state of cancer cells. Furthermore, we show that these previously undescribed functions of MDM2



fraction prepared from *shp53-786* or *shp53-MDA468* cells by micrococcal nuclease re-solubilized MDM2, confirming the presence of endogenous MDM2 in chromatin (Figures 1C and S1D). Next, we assessed in *shp53-786* cells the protein half-life of chromatin-associated and soluble MDM2 upon treatment with cycloheximide. While cyto- and nucleosoluble endogenous MDM2 protein appeared very unstable with a half-life of ~20 min, chromatin-bound MDM2 displayed increased stability with a half-life longer than 3 hr (Figure 1D).

To identify the domains involved in MDM2 recruitment to chromatin, we ectopically expressed wild-type (WT) and various MDM2 deletion mutants in H1299 cells. In line with our finding that a minor fraction of endogenous MDM2 localizes to chromatin in H1299 cells, ectopic WT MDM2 was detected in the fraction enriched in chromatin-bound proteins but mainly localized in the fraction containing soluble proteins in these cells. Strikingly, a MDM2 mutant lacking the central acidic domain (MDM2 Δ 222–302, hereinafter referred to as MDM2 Δ AD) was predominantly detected in the chromatin-enriched fraction (Figures 1E and S1E). Chromatin recruitment of a MDM2 Δ AD mutant harboring an additional point mutation in the RING domain of MDM2 that abolishes its E3 ligase activity (MDM2 Δ AD-C464A) was comparable to that of the MDM2 Δ AD mutant, indicating that the E3 ligase function of MDM2 was dispensable for its recruitment to chromatin (Figures S1F and S1G).

Collectively, these data indicate that MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 and that its central acidic domain negatively controls this recruitment.

Chromatin-Bound MDM2 Regulates an ATF-Dependent Transcriptional Program

To further characterize the roles of chromatin-bound MDM2, we then performed genome-wide chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments combined with next generation sequencing (ChIP-seq) using an anti-MDM2 antibody. To identify the full repertoire of p53-independent MDM2 binding sites on the genome, these ChIP-seq experiments were performed in parallel in H1299 cells transduced with a retrovirus encoding a shRNA targeting human *Mdm2* or a control shRNA and in cells expressing the chromatin-bound MDM2 Δ AD mutant. The gene expression profile of H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant was also compared to that of control cells by microarrays covering 35,775 human genes. Computational analyses of these datasets identified an overlay of 159 genes that were bound by MDM2 and displayed deregulated mRNA level upon increased recruitment of MDM2 to chromatin (Figure 2A; Tables S1 and S2). We confirmed in *shp53-MDA468* cells the direct binding of endogenous MDM2 to several of these identified MDM2 target genes by quantitative ChIP-qPCR (qChIP), including asparagine synthetase (*Asns*), phosphoserine aminotransferase 1 (*Psat1*), and Dickkopf Wnt signaling pathway inhibitor 1 (*Dkk1*) (Figure 2B). The specificity of MDM2 qChIP signal was verified in *shp53-MDA468* cells expressing a *Mdm2*-shRNA (Figures 2B and S2A). In H1299 cells, the MDM2- Δ AD and MDM2- Δ AD-C464A mutants were equally recruited to *Asns* and *Psat1* promoters and were both capable of increasing the mRNA levels of *Asns*, *Pck2*, and *Chac1*, indicating that MDM2-mediated regulation of its target genes occurs independently of its E3 ligase

activity (Figures 2C, S2B, and S2C). Consistent with its role as a transcriptional activator, knockdown of MDM2 in H1299 cells decreased expression of this representative panel of MDM2-target genes (Figure 2C).

Bioinformatic analysis of MDM2-ChIP-seq data with two different software programs, MEME and iRegulon, revealed a statistically significant enrichment of activating transcription factor 3 and 4 (ATF3/4) motif within the chromatin fragments immunoprecipitated with MDM2 antibody, defining a subgroup of 26 out of 159 MDM2-direct target genes that were potentially co-regulated by ATFs and MDM2 ($p = 1.23E-07$) (Figures 2D and 2E). Moreover, although not performed in the same cells, we compared ATF3 and ATF4-ChIP-seq data available in ENCODE to our MDM2-ChIP-seq and microarray datasets. These comparisons identified a significant overlap between MDM2 and ATF3/4 target genes that varies from one cell type to another (Figures S2J–S2M). We experimentally confirmed in a subset of these MDM2 direct target genes (*Asns*, *Ddit4*, and *Trib3*) that they were controlled by ATF3/4, as shown by qChIP and qRT-PCR analyses performed in H1299 cells expressing ATF3/4 shRNAs (Figure S2D). To further decipher the functional relationship between chromatin-bound MDM2 and ATF3/4, we evaluated whether MDM2 and ATF4 proteins interacted using co-immunoprecipitation and GST pull-down assays. Consistent with their respective subcellular localization, endogenous ATF4 co-immunoprecipitated more efficiently with MDM2 Δ AD than with WT MDM2 in H1299 cells (Figures 2F and S2H). In line with this result, in-vitro-translated ATF4 directly interacted with bacterially produced GST-MDM2 Δ AD but weakly with WT GST-MDM2, as shown by GST pull-down experiments (Figure 2G). Furthermore, depletion of ATF3/4 in *shp53-MDA468* cells impacted the recruitment of endogenous MDM2 and of the MDM2 Δ AD mutant to chromatin and to *Asns* and *Psat1* promoters (Figures 2H, 2I, and S2E–S2I).

Altogether, these results indicate that chromatin-bound MDM2 is involved in the transcriptional activation of a subset of ATF target genes independently of p53.

A Subgroup of MDM2-Target Genes Is Involved in Serine/Glycine Metabolism

Functional classification of the biological processes regulated by chromatin-bound MDM2 highlighted a potential role in amino acid metabolism and transport (Figures 3A and S3; Table S2). More specifically, MDM2 target genes were significantly enriched in genes involved in serine/glycine, glutamine, and cysteine metabolism. Since the p53 pathway was recently linked to serine and glycine metabolism (Maddocks et al., 2013), we initially focused on this class of MDM2-target genes. Serine and glycine, which are inter-converted through the activity of serine hydroxymethyltransferases (SHMTs), are two non-essential amino acids that provide anabolic precursors for the biosynthesis of macromolecules such as proteins, nucleic acids, and lipids and are also involved in redox homeostasis through the biosynthesis of glutathione. Intracellular levels of serine and glycine are maintained through uptake of exogenous pools and by de novo synthesis from the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate (3PG) (Locasale, 2013). MDM2-responsive genes involved in serine metabolism included genes encoding the

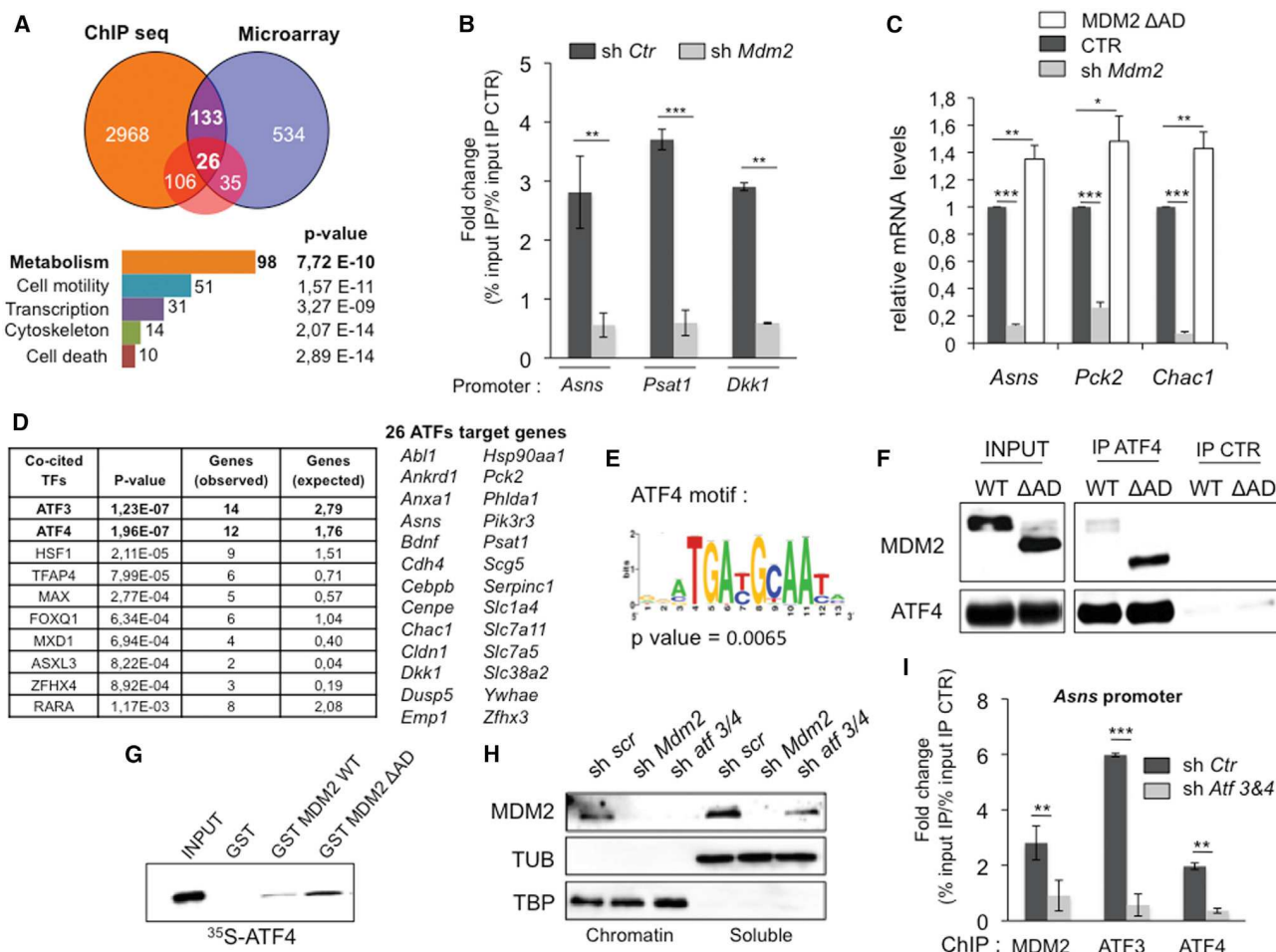


Figure 2. Chromatin-Bound MDM2 Regulates an ATF-Dependent Transcriptional Program

(A) Venn diagram illustrating the number of MDM2 target genes identified by MDM2 ChIP-seq and gene expression profiling of H1299 cells expressing the MDM2ΔAD mutant. MDM2 binding sites were identified by ChIP-seq performed in H1299 cells using MACS with a $p = 5 \cdot 10^{-5}$ by subtracting peaks identified in *Mdm2*-shRNA-treated cells to those identified in control-shRNA treated cells and cells expressing the MDM2ΔAD mutant. This gene list was intersected with the list of transcripts identified by microarray showing differential expression between cells expressing MDM2-ΔAD and control cells transfected with the empty vector ($p \leq 0.001$). The number of MDM2 target genes known to be regulated by ATFs is indicated in red in the Venn diagram. Bottom: functional annotation of this restricted list of 159 MDM2 direct target genes. The numbers of MDM2 target genes for each Gene Ontology (GO) category and the associated p value (Fisher exact test) are indicated.

(B) qChIP experiments showing the relative recruitment of endogenous MDM2 on the *Asns*, *Psat1*, and *Dkk1* loci in shp53-MDA468 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with MDM2 antibody and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; $n = 3$ independent experiments).

(C) Relative mRNA levels of a representative panel of ATF target genes (*Asns*, *Pck2*, and *Chac1*) in H1299 cells, 48 hr after knockdown of MDM2 (sh*Mdm2*) (mean \pm SD; $n = 3$), or 48 hr after expression of the MDM2ΔAD mutant (mean \pm SD; $n = 8$). mRNA levels were determined by qRT-PCR and normalized to the corresponding control samples prepared from H1299 cells transduced with a lentivirus expressing a control-shRNA or cells transfected with an empty vector.

(D) Gene to transcription factor associations within MDM2 target genes showing significant enrichment in ATF3/4 target genes.

(E) Representation of the ATF4 motif significantly enriched in the genomic regions bound by MDM2, as determined using MEME software.

(F) Co-immunoprecipitation assays in H1999 cells showing interaction between ectopic WT MDM2 or the MDM2ΔAD mutant and endogenous ATF4 proteins. ATF4 or control immunoprecipitates were resolved on SDS-PAGE and immunoprobed with anti-MDM2 or anti-ATF4 antibodies.

(G) GST pull-down assays performed with in vitro translated [³⁵S]-methionine-radiolabeled ATF4 and GST, GST-MDM2-WT, or GST-MDM2ΔAD.

(H) Immunoblot analyses showing the level of endogenous MDM2, TBP, and TUB in shp53-MDA468 cells expressing control or a combination of *Atf3*- and *Atf4*-shRNAs, in fractions enriched in chromatin-associated (chromatin) or nucleolar- and cytosoluble (soluble) proteins.

(I) qChIP experiments showing the relative recruitment of MDM2, ATF3, and ATF4 on the *Asns* locus in shp53-MDA468 cells expressing control shRNA or a combination of *Atf3*- and *Atf4*-shRNAs (mean \pm SEM; $n = 3$ independent experiments).

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. See also Figure S2.

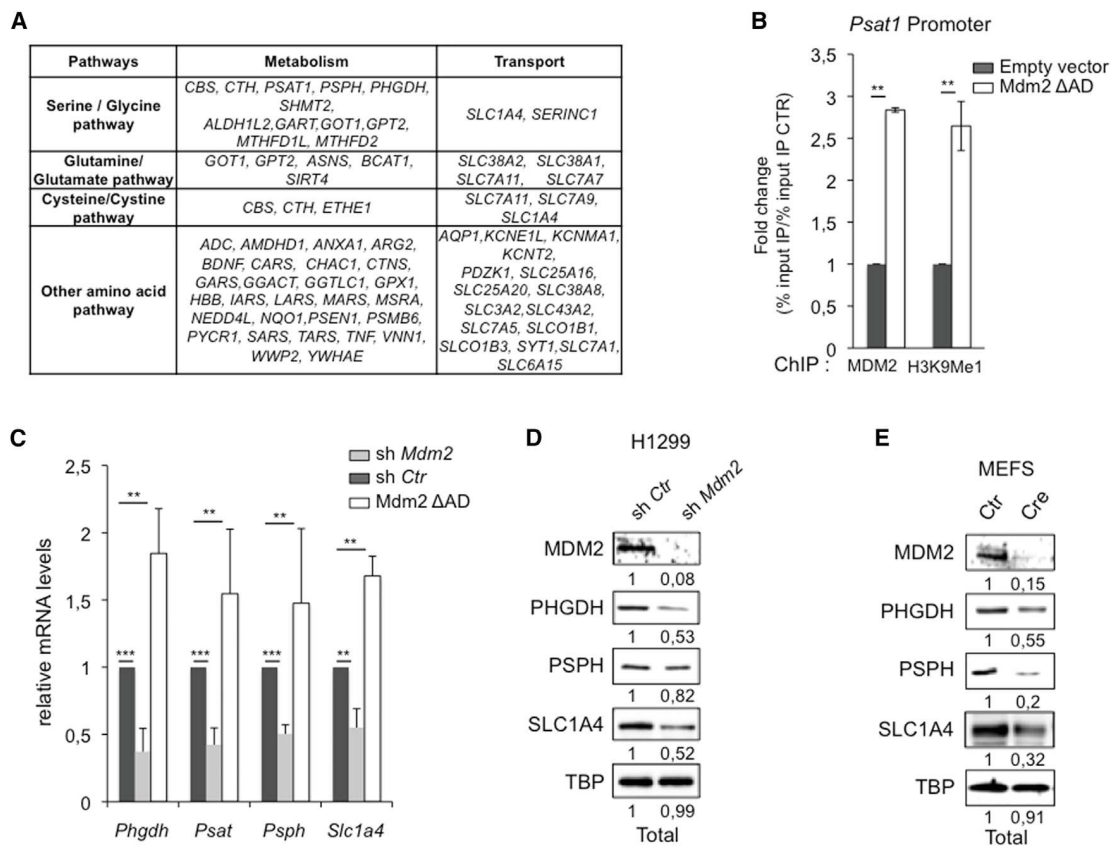


Figure 3. Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism

(A) Gene set enrichment analysis (GSEA) of MDM2 responsive genes determined by gene expression profiling of H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant ($p \leq 0.005$). Subclasses within the amino acid transport and metabolism category highlighted serine/glycine, glutamine/glutamate, and cysteine metabolism. (B) qChIP experiments showing the relative amounts of chromatin-associated MDM2 and of mono-methylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9Me1) on the *Psat1* promoter in control or H1299 cells expressing the MDM2- Δ AD mutant. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; $n = 4$ independent experiments).

(C) Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PspH*, *Psat*, *Phgdh*, and *Slc1a4* in H1299 cells 48 hr after shRNA-mediated depletion of MDM2 (sh*Mdm2*) or 48 hr after expression of the MDM2 Δ AD mutant. mRNA levels were determined by qRT-PCR and normalized to the corresponding control samples prepared from H1299 cells transfected with a lentivirus expressing a control shRNA (mean \pm SD; $n = 3$) or cells transfected with an empty vector (mean \pm SD; $n = 8$).

(D) Protein levels of PSPH, PHGDH, and SLC1A4 were determined by quantitative immunoblotting of whole-cell extracts prepared from H1299 cells, 48 hr after transduction with a lentivirus encoding a control or *Mdm2* shRNA.

(E) Protein levels of PSPH, PHGDH, and SLC1A4 in whole-cell extracts prepared from *Mdm2*^{fllox/fllox}; *p53*^{-/-} MEFs 48 hr after transduction with an empty control or a Cre-encoding retrovirus.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. See also Figure S3.

3 rate limiting enzymes involved in de novo serine synthesis, phosphoglycerate dehydrogenase (*Phgdh*), *Psat1*, and phosphoserine phosphatase (*PspH*), as well as the neutral amino acid transporter *Slc1a4*. Binding of endogenous MDM2 on *Psat1* promoter was confirmed by qChIP in shp53-MDA468 cells (Figure 2B). Furthermore, and consistent with reports showing that the serine-glycine synthesis pathway is regulated at the epigenetic level through methylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) (Ding et al., 2013; Zhao et al., 2016), the relative level of the monomethylation of H3K9 (H3K9Me1) activation mark increased upon expression of the MDM2 Δ AD mutant in H1299 cells (Figure 3B). qRT-PCR analyses indicated that the mRNA levels of *Phgdh*, *Psat1*, *PspH*, and *Slc1a4* decreased in H1299

cells expressing *Mdm2*-shRNA, while they increased upon ectopic expression of the MDM2 Δ AD mutant (Figure 3C). Finally, immunoblotting also showed that MDM2-deficient H1299 cells as well as *Mdm2* KO; *p53* KO murine embryonic fibroblasts (MEFs) displayed lower amounts of PHGDH, PSPH, and SLC1A4 proteins relative to control cells (Figures 3D and 3E), confirming the role of endogenous MDM2 in the regulation of this metabolic program involved in serine/glycine metabolism.

Serine and Glycine Deprivation Regulates MDM2 Recruitment to Chromatin

Interestingly, the amount of chromatin-associated MDM2 increased when H1299 cells were shifted from a complete medium

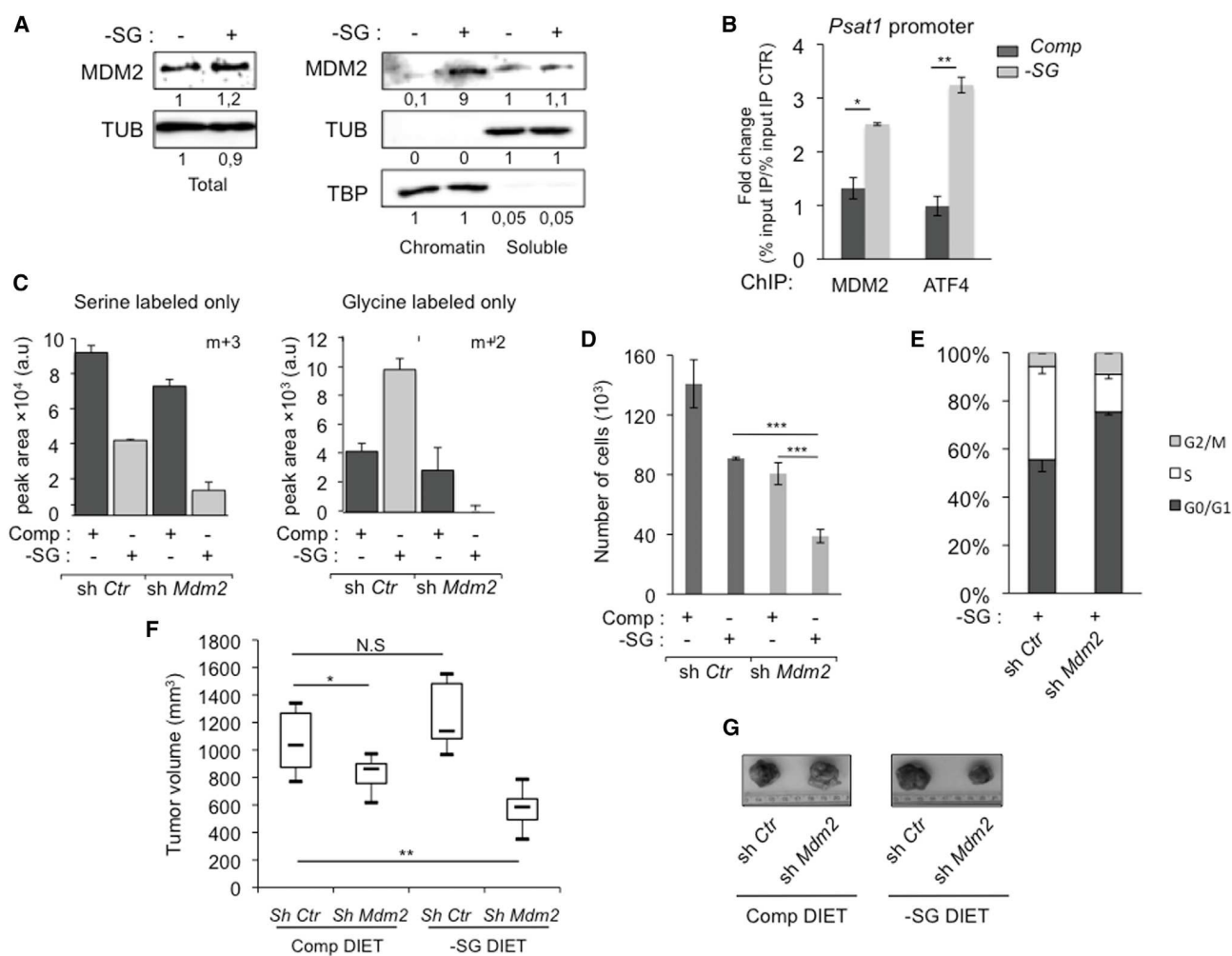


Figure 4. Serine/Glycine Deprivation Regulates MDM2 Recruitment to Chromatin

(A) Serine/glycine deprivation increases MDM2 recruitment to chromatin. Quantitative immunoblotting of MDM2, TBP, and tubulin (TUB) in whole-cell extracts (Total) or in fractions enriched in chromatin-associated (chromatin) or nucleo- and cytosoluble (soluble) proteins prepared from H1299 cells cultured in complete (Comp) or serine and glycine deprived medium (–SG). For quantification, the level of MDM2 protein detected in the soluble fraction prepared from H1299 cells cultured in Comp medium was considered as the reference level.

(B) qChIP experiments showing the relative recruitment of MDM2 and ATF4 on the *Psat1* promoter in H1299 cells cultured in Comp medium or in –SG medium. Results are represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; n = 3 independent experiments).

(C) Stable isotope tracing experiments. H1299 cells expressing a control or *Mdm2*-shRNA were cultured in Comp or –SG medium for 24 hr, in the presence of uniformly labeled [^{13}C]glucose for the final hour. LC-MS was used to detect the relative intracellular levels of ^{13}C -labeled (m+3) serine (left) or (m+2) glycine (right). Histograms represent the mean value of the peak area \pm SD (arbitrary unit) corresponding to the serine and glycine peaks on the MS chromatogram. The experiment was performed in triplicate.

(D) Histograms represent the number of cells in control- or *Mdm2*-shRNA-treated H1299 cells cultured for 4 days in Comp medium changed every 24 hr or in –SG medium (mean \pm SD; n = 3 independent experiments performed in triplicate).

(E) FACS analysis of the cell-cycle profile of H1299 cells expressing control or *Mdm2* shRNAs after 4 days of culture in –SG medium (mean \pm SEM; n = 3 independent experiments).

(F) Nude mice were subcutaneously xenografted with H1299 cells stably expressing control- or *Mdm2*-shRNAs and fed with a complete or a serine- and glycine-deprived diet (–SG). Box and whisker plots represent the tumor volume (mean \pm SD, n = 7 tumors per group) in each experimental group measured when one animal reached the ethical endpoint.

(G) Microphotograph of a representative tumor for each experimental group is shown.

*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, and ***p \leq 0.001 indicate statistical significance of the observed differences. NS, not significant. See also Figures S4 and S5.

to the same medium lacking serine and glycine (Figure 4A). Moreover, the level of chromatin-bound MDM2 also increased as cells progressively exhausted the exogenous pool of serine during

in vitro culture, an effect that was abolished when the culture medium was replenished every 12 hr with fresh serine (Figure S4A). The recruitment of endogenous MDM2 paralleled that of ATF4

on *Asns* and *Psat1* promoters upon serine and glycine deprivation (Figures 4B and S4C). In this experimental condition, we detected a mild increase in the total level of MDM2 protein (Figure 4A) but no induction of *Mdm2* transcription (Figure S4B), suggesting that the recruitment of MDM2 to chromatin was regulated at the post-transcriptional level.

To investigate whether perturbation of this MDM2-controlled program affects the channeling of glucose-derived carbon sources into serine/glycine biosynthesis, we performed stable isotope tracing experiments. H1299 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs were incubated with uniformly labeled [^{13}C] glucose for the last hour of culture and ^{13}C -labeled intracellular metabolites were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). When cultured in complete medium, H1299 cells expressing *Mdm2* shRNA showed a slight decrease of the total amounts (unlabeled and labeled) of intracellular serine and glycine relative to control cells (Figures S4D–S4F). Consistent with the role of MDM2 in de novo serine synthesis, the amounts of glucose-derived ^{13}C -labeled serine and glycine were further reduced when MDM2-depleted H1299 cells were cultured in serine/glycine-deprived medium (Figure 4C).

Because some cancer cells are highly dependent on serine/glycine metabolism for proliferation (Jain et al., 2012; Locasale et al., 2011; Possemato et al., 2011), we hypothesized that interfering with this MDM2-regulated metabolic program would impact the growth of serine/glycine-deprived cells. Accordingly, the growth defect of MDM2-depleted H1299 cells was enhanced when these cells were cultured in serine/glycine-deprived medium (Figures 4D, S5A, and S5B). A comparable effect was observed in HCT116 *p53*KO and *shp53-786* cells (Figures S5C–S5F). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of the cell-cycle profile of MDM2-deficient H1299 cells indicated that these cells underwent a potent arrest in the G1 phase of the cell cycle when cultured in a serine/glycine-deprived medium (Figure 4E). Next, we evaluated the impact of MDM2-mediated control of serine/glycine metabolism on tumor growth in vivo. H1299 cells stably expressing control or *Mdm2* shRNAs were subcutaneously injected in nude mice that were fed with a normal diet or a serine/glycine deprived diet of equivalent caloric value and equal content in total amino acids. Strikingly, the lack of diet-derived serine and glycine impaired the tumorigenic potential of MDM2-depleted H1299 cells, with no or little impact on that of control H1299 cells (Figures 4F, 4G, and S5G–S5I).

Thus, these data indicate that serine/glycine deprivation triggers MDM2 recruitment to chromatin to activate a transcriptional program that sustains serine synthesis and tumor growth.

MDM2 Regulates Redox Homeostasis in Cancer Cells Independently of p53

Notably, genes implicated in redox homeostasis were also statistically overrepresented among MDM2 target genes. This category contained genes controlling glutathione (GSH) synthesis and recycling, as well as genes involved in anti-oxidant defenses (Figure 5A; Table S2). The mRNA levels of genes of this category decreased upon MDM2-depletion in H1299, as exemplified by glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*), NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (*Nqo1*), and pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (*Pycr1*) (Figure 5B).

To study the role of MDM2 in redox homeostasis, we investigated how chromatin-bound MDM2 impinged on GSH metabolism, on the NAD^+/NADH ratio, and on the level of reactive oxygen species (ROS). In H1299 cells cultured in complete medium, the level of reduced GSH increased moderately in MDM2-depleted cells, whereas it decreased in cells expressing the MDM2 Δ AD mutant. The amount of oxidized glutathione (GSSG) strongly decreased in MDM2-depleted H1299 cells (Figure 5C), suggesting that MDM2 deficiency did not impair GSH synthesis in those fed conditions but rather impacted on the GSH-GSSG cycle. Then, we evaluated whether MDM2 also influenced the NAD^+/NADH ratio. In H1299 cells, the NAD^+/NADH ratio dropped upon MDM2 depletion (Figure 5D). To further illustrate the role of MDM2 on redox homeostasis, we measured the intracellular ROS levels by flow cytometry using the CM-H2DCFDA probe and by immunoblot detection of carbonyl groups introduced into proteins by oxidative reactions (Oxyblot). MDM2 depletion resulted in increased ROS levels, whereas ectopic expression of the MDM2 Δ AD mutant reduced ROS levels in H1299 cells (Figure 5E). The increased ROS levels in MDM2-depleted H1299 cells were partly rescued upon ectopic expression of a shRNA-resistant WT-MDM2 protein (Figure S6F). Moreover, ROS levels in H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD and the MDM2 Δ AD-C464A mutants were comparable (data not shown), indicating that MDM2 function in redox homeostasis was independent of its E3 ligase activity. Protein carbonylation correlated with these changes in ROS levels. Thus, MDM2-depleted cells displayed uncompensated oxidative damages to proteins, whereas cells expressing the MDM2- Δ AD mutant exhibited the opposite profile (Figure 5F).

Next, we evaluated whether the role of MDM2 in redox homeostasis influenced cell growth. Consistent with their imbalanced redox status, we found that the ROS scavenger *N*-acetylcysteine (NAC) partly rescued the growth of MDM2-depleted H1299 cells in vitro as well as their tumorigenic potential in vivo under serine/glycine-deprived conditions (Figures 5G, 5H, S6A, and S6B). These data indicated that increased ROS production partly contributed to the growth defect of MDM2-depleted H1299 cells. We also addressed the impact of the altered NAD^+/NADH ratio on the proliferation rate of these cells by providing an exogenous source of pyruvate to MDM2-depleted H1299 cells. Pyruvate has several metabolic fates, both in the mitochondria and in the cytosol. Cytosolic pyruvate can generate NAD^+ through the lactate dehydrogenase (LDH)-driven reaction (Sullivan et al., 2015). Strikingly, pyruvate addition potently rescued the growth of MDM2-depleted H1299 cells under serine/glycine deprivation (Figures 5I and S6D). We excluded that pyruvate restored cell growth of MDM2-depleted cells by fueling mitochondria, since a comparable rescue was observed upon concomitant addition of a pharmacological inhibitor of the mitochondrial pyruvate transporter MPC1 (Halestrap, 1975) (Figure S6C). Addition in the culture medium of alpha-ketobutyrate (AKB), an electron acceptor that can act as an alternative substrate for LDH, also partly restored the proliferation of MDM2-depleted cells under serine/glycine deprivation (Figure S6E). Hence, these data demonstrate that the p53-independent role of MDM2 on redox homeostasis is important for cell growth of cancer cells.

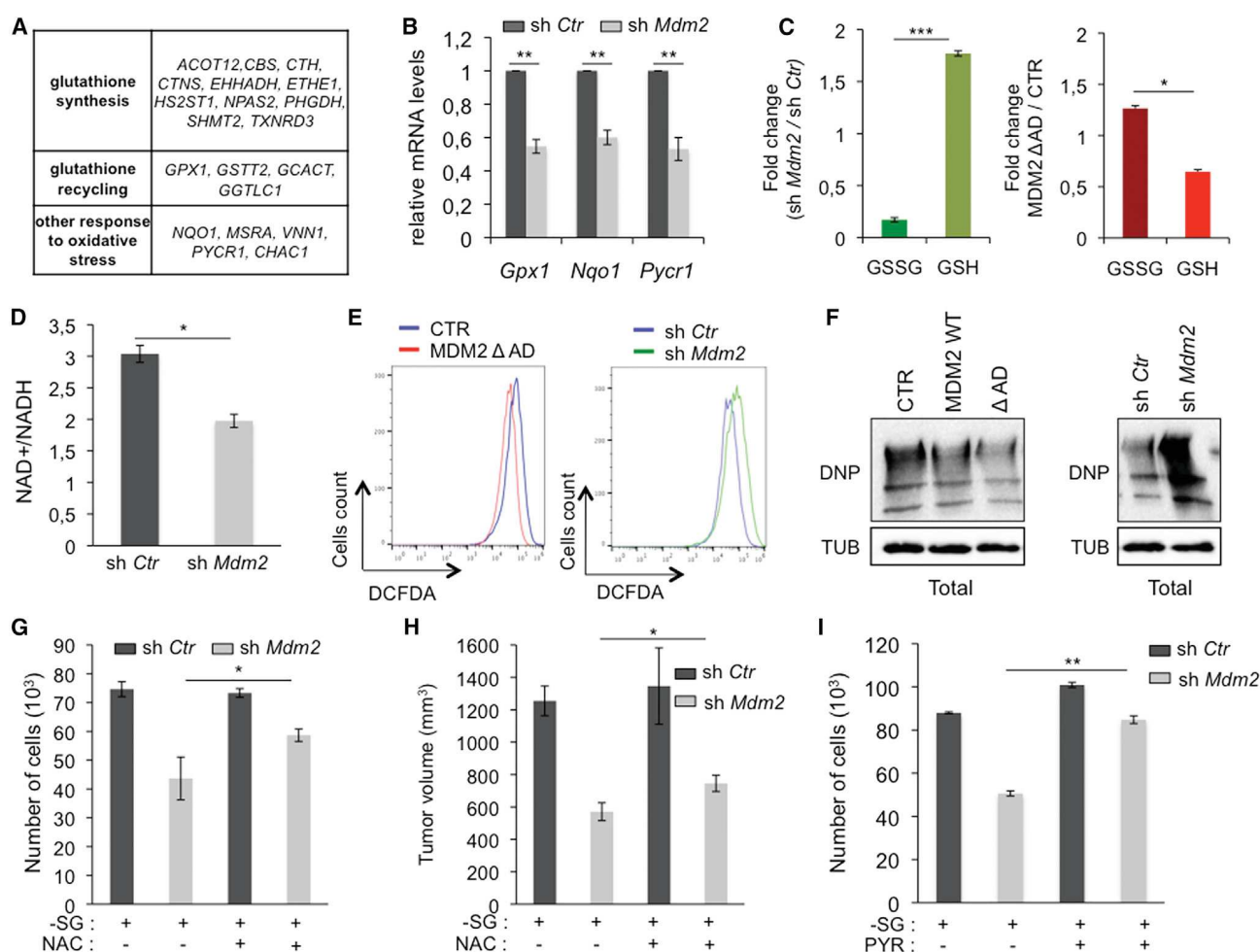


Figure 5. MDM2 Regulates Redox Homeostasis

(A) Gene list of MDM2 target genes implicated in glutathione metabolism and oxidative stress determined by gene expression profiling of H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant ($p \leq 0.005$).

(B) qRT-PCR analysis of *Gpx1*, *Nqo1*, and *Pycr1* mRNA levels in H1299 cells expressing control or *Mdm2* shRNAs cultured in complete medium (mean \pm SD of $n = 3$ independent experiments).

(C) Relative levels of oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione in H1299 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs (left) or in H1299 cells transfected with an empty vector or expressing the MDM2 Δ AD mutant (right) (mean \pm SD, $n = 3$).

(D) NAD⁺/NADH ratio in H1299 cells expressing control- or *Mdm2*-shRNAs.

(E) Left: ROS levels in H1299 cells transfected with an empty vector or with the MDM2 Δ AD mutant determined by flow cytometry using the fluorophore dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) probe. Right: ROS levels in H1299 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs. Data are representative of four independent experiments.

(F) Immunoblot analyses of the levels of protein carbonylation (DNP) in control H1299 cells or cells expressing ectopic WT MDM2 or the MDM2 Δ AD mutant (left) or in H1299 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs (right panel).

(G) The ROS scavenger NAC partly rescues the growth of MDM2-deficient H1299 cells cultured in serine/glycine-deprived medium (–SG). Histograms represent the number of cells after 4 days of culture in the indicated conditions (mean \pm SD; $n = 3$ independent experiments performed in triplicates).

(H) NAC treatment partly rescues tumor growth of MDM2-deficient H1299 cells in nude mice fed with a serine- and glycine-deprived (–SG) diet. Box and whisker plots representing the tumor volume (mean \pm SD, $n = 7$ tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical endpoint.

(I) Pyruvate (PYR) partly rescues the growth of MDM2-deficient H1299 cells cultured in –SG medium. Histograms represent the number of cells after 4 days of culture in the indicated conditions (mean \pm SD; $n = 3$ independent experiments performed in triplicate).

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. See also Figure S6.

PKM2 and Oxidative Stress Control MDM2 Recruitment to Chromatin

In order to gain insights into the molecular mechanisms underlying MDM2 recruitment to DNA, we monitored MDM2 localization

in p53-deficient H1299, HCT116 p53KO cells and p53^{–/–} MEFs exposed to various stress conditions. Addition of pro-oxidant molecules including menadione or hydrogen peroxide (H₂O₂), but not genotoxic stress induced by 5-fluoro-uracil (5FU), UV,

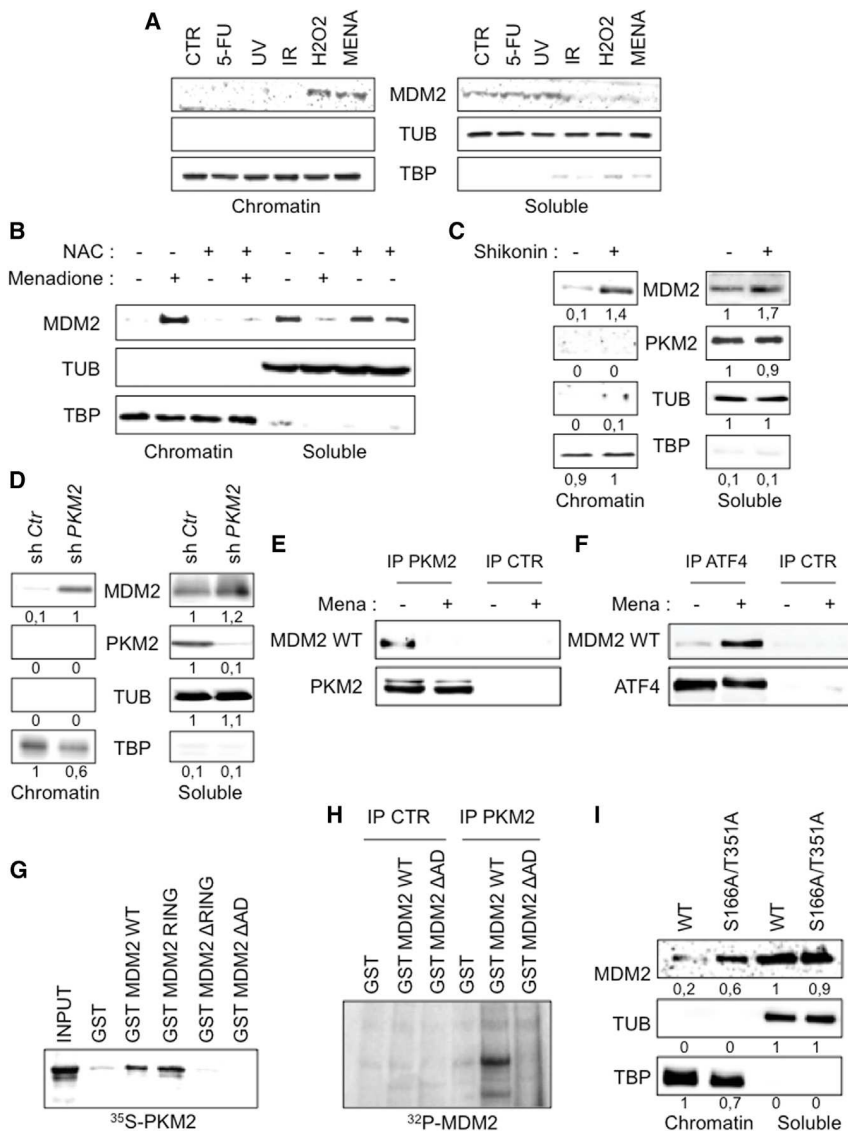


Figure 6. PKM2 and Oxidative Stress Control MDM2 Recruitment to Chromatin

(A) Quantitative immunoblotting of MDM2, TBP, and tubulin (TUB) in fractions enriched in chromatin-associated (chromatin) or nucleolar and cytosoluble (soluble) proteins prepared from H1299 cells after DNA damage (5-fluorouracil [5FU], UV, or ionizing radiation [IR]) or after treatment with pro-oxidants (H₂O₂, menadione [MENA]).

(B) The levels of chromatin-bound or soluble endogenous MDM2 were determined in H1299 cells upon menadione-induced oxidative stress in the presence or absence of NAC.

(C and D) PKM2 activity influences MDM2 recruitment to chromatin. The level of chromatin-bound MDM2 was evaluated by quantitative immunoblotting in mock-treated H1299 cells or in cells treated with the pharmacological PKM2 inhibitor shikonin (C) or in cells expressing *Pkm2* shRNA (D). For quantification, the level of MDM2 protein detected in the soluble fraction prepared from control H1299 cells was considered as the reference level.

(E and F) Protein-protein interactions between ectopic WT-MDM2 and endogenous ATF4 or endogenous PKM2 under oxidative stress were evaluated in H1299 cells by co-immunoprecipitation assays. 48 hr after transfection, H1299 cells expressing WT-MDM2 were treated for 1 hr with menadione (MENA) before being processed for immunoprecipitation using anti-PKM2 (E) or anti-ATF4 (F) antibodies. Immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting with anti-MDM2, anti-PKM2, or anti-ATF4 antibodies.

(G) GST pull-down assays performed with in-vitro-translated [³⁵S]-methionine-radiolabeled PKM2 and GST or GST-tagged WT-MDM2, MDM2ΔAD, MDM2ΔRING, and the RING domain of MDM2 alone (MDM2 RING).

(H) In vitro kinase assays performed with a control immunoprecipitation (IP CTR) or immunoprecipitated PKM2 (IP PKM2) from H1299 cells and purified recombinant GST-WT-MDM2 or GST-MDM2ΔAD proteins as a substrate in the presence of [³²P]-ATP.

(I) Alanine substitution of the two major PKM2-dependent phosphorylation sites (residues S166

and T351) identified by MS-MS phosphopeptide mapping increases MDM2 recruitment to chromatin. Levels of chromatin-bound or soluble WT-MDM2 or MDM2-S166A/T351A were determined by quantitative immunoblotting in H1299 cells. Experimental conditions were adjusted to ensure equal expression of both proteins that display different stability at the time chromatin fractionation was performed. For quantification, the level of MDM2 protein detected in the soluble fraction prepared from H1299 cells expressing WT-MDM2 was considered as the reference level.

See also Figure S7.

or ionizing radiation, relocalized cyto/nucleosoluble MDM2 to chromatin in H1299 cells (Figures 6A, S7A, and S7B). In H1299 cells, recruitment of endogenous MDM2 to chromatin occurred as early as 5 min after incubation with menadione and was abolished in the presence of NAC (Figure 6B). A previous report showed that the activity of the M2 isoform of pyruvate kinase (PKM2), a key metabolic enzyme that converts phosphoenolpyruvate into pyruvate, is inhibited by ROS. ROS-mediated inhibition of PKM2 activity increases anti-oxidant defenses by promoting the redirection of glycolytic intermediates toward the serine biosynthetic and the pentose phosphate pathways (Anastasiou et al., 2011). Moreover, serine is an allosteric acti-

vator of PKM2 (Chaneton et al., 2012). These data prompted us to evaluate whether PKM2 is involved in the control of MDM2 recruitment to chromatin. Consistent with this hypothesis, we found that pharmacological inhibition of PKM2 activity by shikonin in H1299 cells, or knockdown of PKM2, relocalized endogenous MDM2 in chromatin (Figures 6C and 6D). Shikonin-mediated recruitment of MDM2 to chromatin was abolished in H1299 cells expressing shRNAs targeting ATF3 and ATF4 (Figure S7C), linking PKM2 activity and MDM2-mediated control of ATF target genes.

To further characterize the mechanisms by which PKM2 regulates MDM2, we performed co-immunoprecipitation, pull-down

and in vitro phosphorylation assays. Ectopic WT-MDM2 co-immunoprecipitated with endogenous PKM2 in protein extracts prepared from H1299 cells cultured in absence of menadione (Figure 6E). Strikingly, the PKM2-MDM2 interaction was lost upon menadione-induced oxidative stress that instead promoted the association of WT-MDM2 with endogenous ATF4 (Figures 6E and 6F). MDM2 and PKM2 interacted directly, as shown by GST pull-down assays, and this protein-protein interaction required both the RING-E3 ligase and the acidic domains of MDM2 (Figure 6G). Furthermore, GST-WT MDM2, but not GST-MDM2 Δ AD, was efficiently phosphorylated in vitro by a PKM2 complex that was immunoprecipitated from H1299 cells (Figure 6H). Pre-incubation of H1299 cells with shikonin prevented the phosphorylation of MDM2 by immunoprecipitated PKM2 (Figure S7D). Next, we analyzed MDM2 phosphopeptides by mass spectrometry and identified serine 166 (S166) and threonine 351 (T351) of MDM2 to be phosphorylated in vitro by this immunoprecipitated PKM2 complex (Figure S7E). A MDM2 mutant in which S166 and T351 were mutated to non-phosphorylatable alanine residues (MDM2-S166A/T351A) displayed increased stability and increased localization in chromatin relative to WT-MDM2 (Figure 6I; data not shown), confirming the inhibitory role of PKM2-dependent phosphorylation on MDM2 recruitment to chromatin.

Altogether, these data show that MDM2 is involved in a regulatory loop in which oxidative stress and PKM2 control MDM2-recruitment to chromatin to sustain an anti-oxidant response.

DISCUSSION

Metabolic rewiring is considered a hallmark of malignant transformation, and multiple oncogenes and tumor suppressors control various metabolic pathways (Boroughs and DeBerardinis, 2015). Among those, the p53 protein is recognized as a central regulator of metabolism, but the role of other components of the p53 pathway in metabolism has been so far poorly investigated. Here, we show that MDM2, a bona fide oncogene and essential component of this pathway, regulates serine metabolism and redox homeostasis independently of p53. Our data, together with a previous report showing that MDM2 can ubiquitylate and directly control dihydrofolate reductase (DHFR) (Maguire et al., 2008), underline a previously underestimated function of MDM2 in metabolism.

Serine/glycine metabolism supports the growth of cancer cells by contributing to their anabolic demands and epigenome as well as by regulating their redox state (Locasale, 2013). Strikingly, we found that MDM2 operates independently of p53 to control serine/glycine metabolism and sustain cancer growth in conditions of serine and glycine deprivation. Our results indicate that interfering with MDM2 functions when cancer cells face depleted pools of exogenous serine and glycine compromises their proliferative capacities and tumorigenic potential. These phenotypes result, at least in part, from perturbations of their redox state, likely through several mechanisms impinging on GSH metabolism, the NAD⁺/NADH ratio, and ROS levels. Consistent with this notion, addition of the ROS scavenger NAC or exogenous pyruvate partly rescued the growth of MDM2-depleted cells under serine and glycine deprivation.

However, given the central role of serine/glycine metabolism in various anabolic pathways, the metabolic consequences of MDM2 depletion under serine and glycine deprivation are likely to be broader than the observed perturbation of the redox state of these cells. The recent findings that serine metabolism plays an essential role in one carbon cycle for the generation of S-adenosyl-methionine (SAM) (Maddocks et al., 2016), a major methyl-donor co-factor involved in histone and DNA/RNA methylation, raise interesting questions regarding the potential links between MDM2 deregulation and epigenetic alterations that commonly occur during cancer progression. Our pan-genome analysis of MDM2-target genes suggests that MDM2 functions in cancer cell metabolism extend beyond serine/glycine metabolism and may also control cysteine and glutamine levels.

Our data support the notion that MDM2 plays a central role in the metabolic network regulated by PKM2. Indeed, MDM2 is efficiently recruited to chromatin in cells exhibiting low PKM2 activity, as well as in two experimental conditions, oxidative stress and serine deprivation, that alter PKM2 activity. Furthermore, we identified Ser166 and Thr351 to be phosphorylated in a PKM2-dependent manner. Nevertheless, our results obtained with recombinant proteins, as well as those from a recent study showing that PKM2 lacks protein kinase activity (Hosios et al., 2015), do not support the notion that MDM2 is a direct target of PKM2 but rather of a yet-undefined kinase that associates with PKM2. Interestingly, phosphorylation of MDM2 on Ser166 by AKT was previously shown to control its subcellular localization (Mayo and Donner, 2001), and Thr351 was recently identified as a minor phosphorylation site of the mitotic checkpoint kinase MPS1 in response to oxidative stress (Yu et al., 2016). Here, we show the inhibitory role of these phosphorylation sites on MDM2 recruitment to chromatin. Our data also identified the central acidic domain as an inhibitory domain limiting MDM2 recruitment to chromatin. A recent study suggested that this domain plays a conformational role for the protein that is required for MDM2-E3 ligase activity through intramolecular binding with the RING domain (Cheng et al., 2014). Consistent with these data, we found that MDM2-E3 ligase activity is dispensable for its recruitment to chromatin, regulation of its target genes, and control of ROS levels.

Several studies have underlined the role of ATF transcription factors in the regulation of a subset of MDM2 target genes, including those implicated in serine biosynthesis (DeNicola et al., 2015; Ye et al., 2012). Our data clearly indicate that MDM2-recruitment to chromatin triggered by oxidative stress or low PKM2 activity is independent of p53 but involves the ATF3/4 transcription factors. These results, together with those showing that MDM2-mediated ubiquitylation of ATF3 controls its stability (Mo et al., 2010) and that ATF3 enhances transactivation of p53 target genes, including *Mdm2* (Yan et al., 2005), illustrate a complex interplay between the p53 pathway and ATF family members. Interestingly, the G9A methyltransferase and the histone lysine demethylase KDM4C have been linked to the transcriptional regulation of serine synthesis genes (Ding et al., 2013; Zhao et al., 2016). Further studies are warranted to evaluate whether these epigenetic regulators are recruited together with MDM2 and ATF4 to control the transcription of these genes.

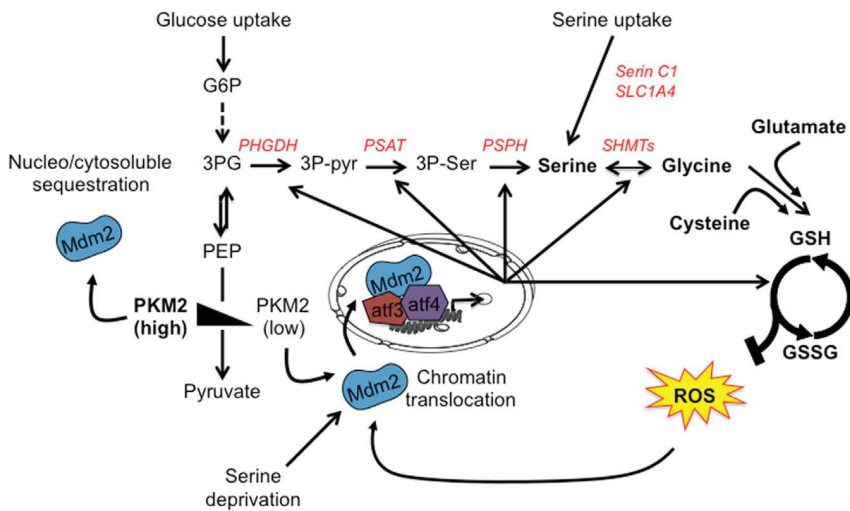


Figure 7. MDM2 Is a Key Regulator of Metabolism to Sustain Cellular Anti-oxidant Defenses

Schematic model showing how the recruitment of MDM2 to chromatin contributes to serine/glycine and glutathione metabolism. MDM2 recruitment to ATF3/4-target genes is increased upon serine deprivation, oxidative stress, or low PKM2 activity to sustain the expression of genes involved in serine/glycine and glutathione metabolism. G6P, glucose 6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; 3PG, 3-phosphoglycerate; 3P-Pyr, 3-phosphohydroxypyruvate; 3P-Ser, 3-phosphoserine; GSH, glutathione.

In line with this hypothesis, MDM2 recruitment to its target genes correlated with increased histone H3 monomethylation on lysine 9, an epigenetic mark regulated by KDM4C and G9A. Altogether, these data highlight a previously unsuspected network involving PKM2, MDM2, and ATFs in the regulation of a transcriptional program involved in serine metabolism and redox homeostasis (Figure 7).

A previous study pinpointed that p53-mutated cells are hypersensitive to serine and glycine deprivation (Maddocks et al., 2013). The potential connections of these observations with our findings showing that MDM2 regulates serine metabolism may reflect the well-described role of p53 on *Mdm2* transcription and the documented downregulation of MDM2 in many p53 null cells (Barak et al., 1993; Wu and Levine, 1997). However, other reports showing that p53 directly represses several MDM2 target genes identified in our study, including *Phgdh* (Ou et al., 2015) and *Slc7A11* (Jiang et al., 2015), illustrate the complex roles of the p53 pathway in these metabolic pathways. Finally, the clinical implications of our findings are underlined by bioinformatic analyses showing the significance of the expression level of genes involved in serine metabolism, including *Phgdh* and *Shmt2*, to predict breast and lung cancer patient survival (Antonov et al., 2014; DeNicola et al., 2015). Our data showing that MDM2 controls cancer cell metabolism pave the way for therapeutic strategies targeting these unexpected functions of this commonly deregulated oncogene, in particular in cancers harboring MDM2 overexpression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subcellular Fractionation and Micrococcal Nuclease Treatment

The protocol for subcellular fractionation was adapted from a previously described method, as described in Supplemental Experimental Procedures (Wysocka et al., 2001). Pooled cyto- and nucleosoluble proteins and chromatin-associated proteins were then analyzed in parallel by immunoblotting.

ChIP-Seq Analysis

Next-generation sequencing was performed upon ChIP with anti-MDM2 N20 antibody in H1299 cells expressing a shRNA targeting *Mdm2* and in cells overexpressing MDM2-ΔAD mutant. Samples were processed in vitro to generate

a library of short inserts of ~250 bp. The library was sequenced on an Illumina HiSeq 2000 platform. Reads were trimmed at 50 bp for single-read runs using the “forward” sequencing primer. The data were then processed using bioinformatics tools to extract biologically useful information. Briefly, alignment with human genome Hg19 was done with Bowtie for Illumina and Picos calling with model-based analysis of ChIP-seq (MACS) 1.0.1. Functional gene annotation was performed using Great, and GO term analysis was performed with Genomatix.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SD. The results were analyzed by a Student's t test, and p values less than 0.05 were considered to be statistically significant (*p < 0.05, 0.01 < **p < 0.001, and ***p < 0.001).

Xenografts

Bilateral subcutaneous injections of H1299 cells were carried out on 8-week-old CD-1-Foxn1nu mice (Charles River) as described in the Supplemental Information. Mice were housed in a pathogen free barrier facility in accordance with the regional ethic committee for animal warfare (n° CEEA-LR-12067).

ACCESSION NUMBERS

The accession number for the complete transcriptomic profiles reported in this paper is GEO: GSE64439.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.033>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.R., L.L., and L.K.L. designed the studies, interpreted the data, and wrote the manuscript; R.R., L.K.L., E.S., E.B., F.S., M.Y.C., T.L., M.H., F.B., and G.A. performed the experiments; L.K.L. and F.R. performed the bioinformatic analyses; R.R., L.K.L., C.V., and I.A.-A. contributed to the in vivo experiments; and J.C.M., J.C.P., P.T., and J.E.S. assisted with data interpretation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Jochemsen and Y. Haupt for *Mdm2* constructs, O. Maddock and K. Vousden for stable isotope labeling experiments, M. Selak and M. Lacroix for input and critical reading of the manuscript, and members of the histology and animal facilities of Montpellier BioCampus for technical assistance. This research was supported by grants from the Institut National du Cancer (INCa), the Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2016), and the

INSERM-Avenir program. R.R. was supported by a fellowship from the French Ministry of Research and the ARC Foundation. G.A. was supported by the Région Languedoc Roussillon and the University of Montpellier.

Received: October 19, 2015

Revised: March 7, 2016

Accepted: April 27, 2016

Published: June 2, 2016

REFERENCES

- Anastasiou, D., Poulgiannis, G., Asara, J.M., Boxer, M.B., Jiang, J.-K., Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A.T., Locasale, J.W., Auld, D.S., et al. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science* 334, 1278–1283.
- Antonov, A., Agostini, M., Morello, M., Minieri, M., Melino, G., and Amelio, I. (2014). Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. *Oncotarget* 5, 11004–11013.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461–468.
- Berkers, C.R., Maddocks, O.D.K., Cheung, E.C., Mor, I., and Vousden, K.H. (2013). Metabolic regulation by p53 family members. *Cell Metab.* 18, 617–633.
- Biderman, L., Manley, J.L., and Prives, C. (2012). Mdm2 and MdmX as regulators of gene expression. *Genes Cancer* 3, 264–273.
- Bohlman, S., and Manfredi, J.J. (2014). p53-independent effects of Mdm2. *Subcell. Biochem.* 85, 235–246.
- Boroughs, L.K., and DeBerardinis, R.J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 351–359.
- Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A.C.L., Maddocks, O.D.K., Chokkathukalam, A., Coyle, J.E., Jankevics, A., Holding, F.P., Vousden, K.H., et al. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* 491, 458–462.
- Cheng, Q., Song, T., Chen, L., and Chen, J. (2014). Autoactivation of the MDM2 E3 ligase by intramolecular interaction. *Mol. Cell. Biol.* 34, 2800–2810.
- Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M.R., Pollack, D., Woodruff, J.M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M.F., and Levine, A.J. (1994). Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 54, 794–799.
- DeNicola, G.M., Chen, P.-H., Mullarky, E., Sudderth, J.A., Hu, Z., Wu, D., Tang, H., Xie, Y., Asara, J.M., Huffman, K.E., et al. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat. Genet.* 47, 1475–1481.
- Ding, J., Li, T., Wang, X., Zhao, E., Choi, J.-H., Yang, L., Zha, Y., Dong, Z., Huang, S., Asara, J.M., et al. (2013). The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. *Cell Metab.* 18, 896–907.
- Goldstein, I., and Rotter, V. (2012). Regulation of lipid metabolism by p53 – fighting two villains with one sword. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 567–575.
- Halestrap, A.P. (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem. J.* 148, 85–96.
- Hosios, A.M., Fiske, B.P., Gui, D.Y., and Vander Heiden, M.G. (2015). Lack of Evidence for PKM2 Protein Kinase Activity. *Mol. Cell* 59, 850–857.
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A.L., Kafri, R., Kirschner, M.W., Clish, C.B., and Mootha, V.K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 336, 1040–1044.
- Jiang, L., Kon, N., Li, T., Wang, S.J., Su, T., Hibshoosh, H., Baer, R., and Gu, W. (2015). Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. *Nature* 520, 57–62.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378, 206–208.
- Jones, S.N., Hancock, A.R., Vogel, H., Donehower, L.A., and Bradley, A. (1998). Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15608–15612.
- Khoo, K.H., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 217–236.
- Li, Q., and Lozano, G. (2013). Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 19, 34–41.
- Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., and Gu, W. (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* 149, 1269–1283.
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., and Feng, Z. (2015). Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 356 (2 Pt A), 197–203.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* 13, 572–583.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C.A., Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* 43, 869–874.
- Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* 493, 542–546.
- Maddocks, O.D.K., Labuschagne, C.F., Adams, P.D., and Vousden, K.H. (2016). Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells. *Mol. Cell* 61, 210–221.
- Maguire, M., Nield, P.C., Devling, T., Jenkins, R.E., Park, B.K., Polański, R., Vlatković, N., and Boyd, M.T. (2008). MDM2 regulates dihydrofolate reductase activity through monoubiquitination. *Cancer Res.* 68, 3232–3242.
- Marine, J.-C., and Lozano, G. (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ.* 17, 93–102.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11598–11603.
- Mo, P., Wang, H., Lu, H., Boyd, D.D., and Yan, C. (2010). MDM2 mediates ubiquitination and degradation of activating transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* 285, 26908–26915.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378, 203–206.
- Ou, Y., Wang, S.-J., Jiang, L., Zheng, B., and Gu, W. (2015). p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation. *J. Biol. Chem.* 290, 457–466.
- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350.
- Saiki, A.Y., Caenepeel, S., Cosgrove, E., Su, C., Boedigheimer, M., and Oliner, J.D. (2015). Identifying the determinants of response to MDM2 inhibition. *Oncotarget* 6, 7701–7712.
- Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., and Vander Heiden, M.G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 162, 552–563.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909–923.
- Wade, M., Li, Y.-C., and Wahl, G.M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 13, 83–96.
- Watanabe, T., Hotta, T., Ichikawa, A., Kinoshita, T., Nagai, H., Uchida, T., Murate, T., and Saito, H. (1994). The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood* 84, 3158–3165.

- Wu, L., and Levine, A.J. (1997). Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.* **3**, 441–451.
- Wysocka, J., Reilly, P.T., and Herr, W. (2001). Loss of HCF-1-chromatin association precedes temperature-induced growth arrest of tsBN67 cells. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3820–3829.
- Yan, C., Lu, D., Hai, T., and Boyd, D.D. (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J.* **24**, 2425–2435.
- Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., and Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6904–6909.
- Yu, Z.-C., Huang, Y.-F., and Shieh, S.-Y. (2016). Requirement for human Mps1/TTK in oxidative DNA damage repair and cell survival through MDM2 phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1133–1150.
- Zhao, E., Ding, J., Xia, Y., Liu, M., Ye, B., Choi, J.-H., Yan, C., Dong, Z., Huang, S., Zha, Y., et al. (2016). KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism. *Cell Rep.* **14**, 506–519.

Molecular Cell, Volume 62

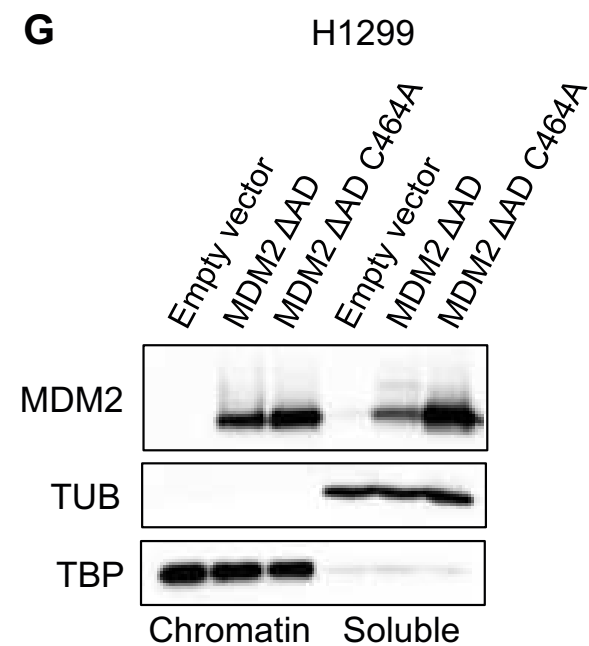
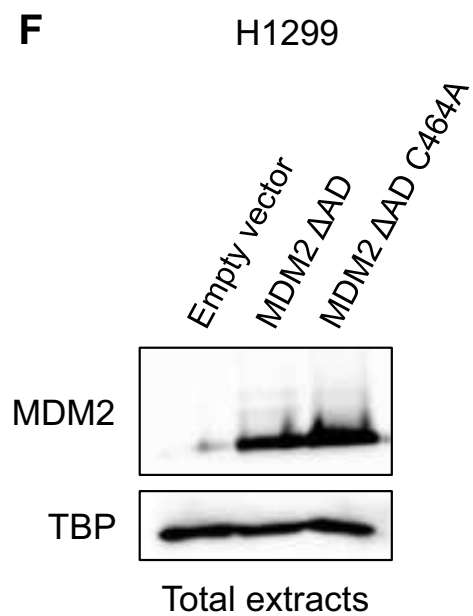
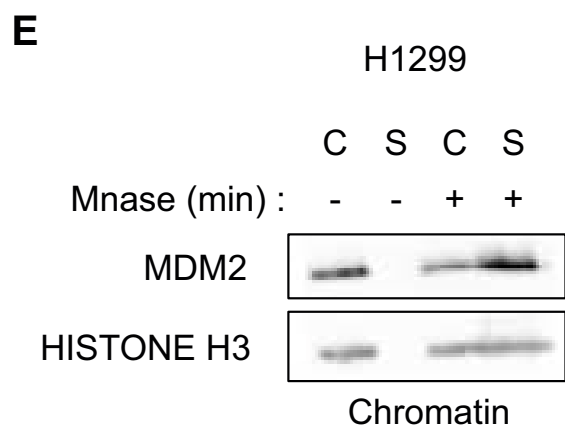
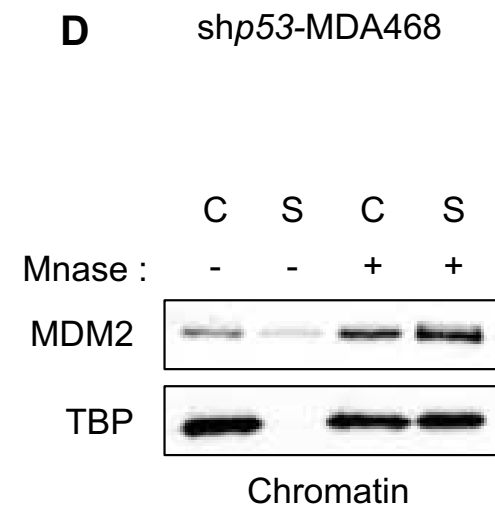
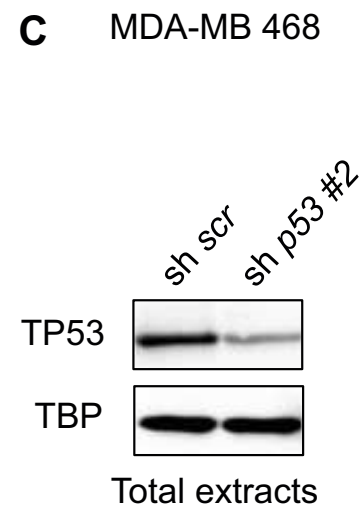
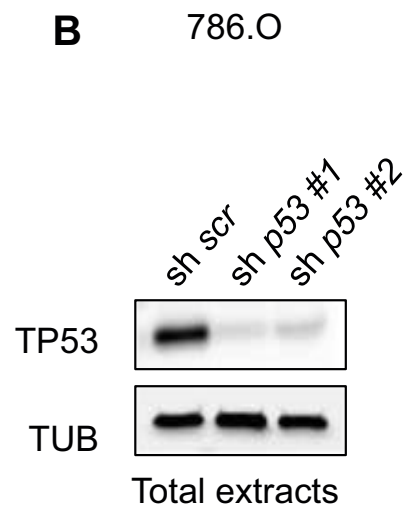
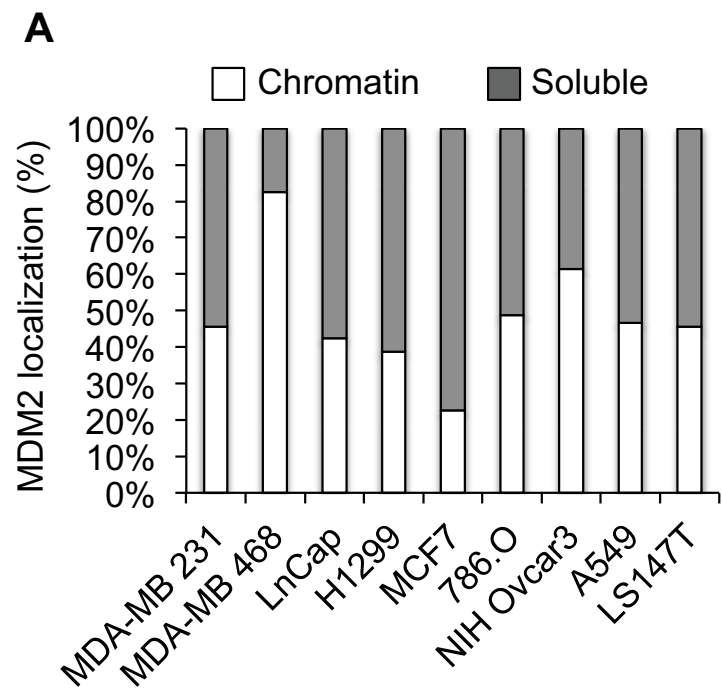
Supplemental Information

Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53

Romain Riscal, Emilie Schrepfer, Giuseppe Arena, Madi Y. Cissé, Floriant Bellvert, Maud Heuillet, Florian Rambow, Eric Bonneil, Frédérique Sabourdy, Charles Vincent, Imade Ait-Arsa, Thierry Levade, Pierre Thibaut, Jean-Christophe Marine, Jean-Charles Portais, Jean-Emmanuel Sarry, Laurent Le Cam, and Laetitia K. Linares

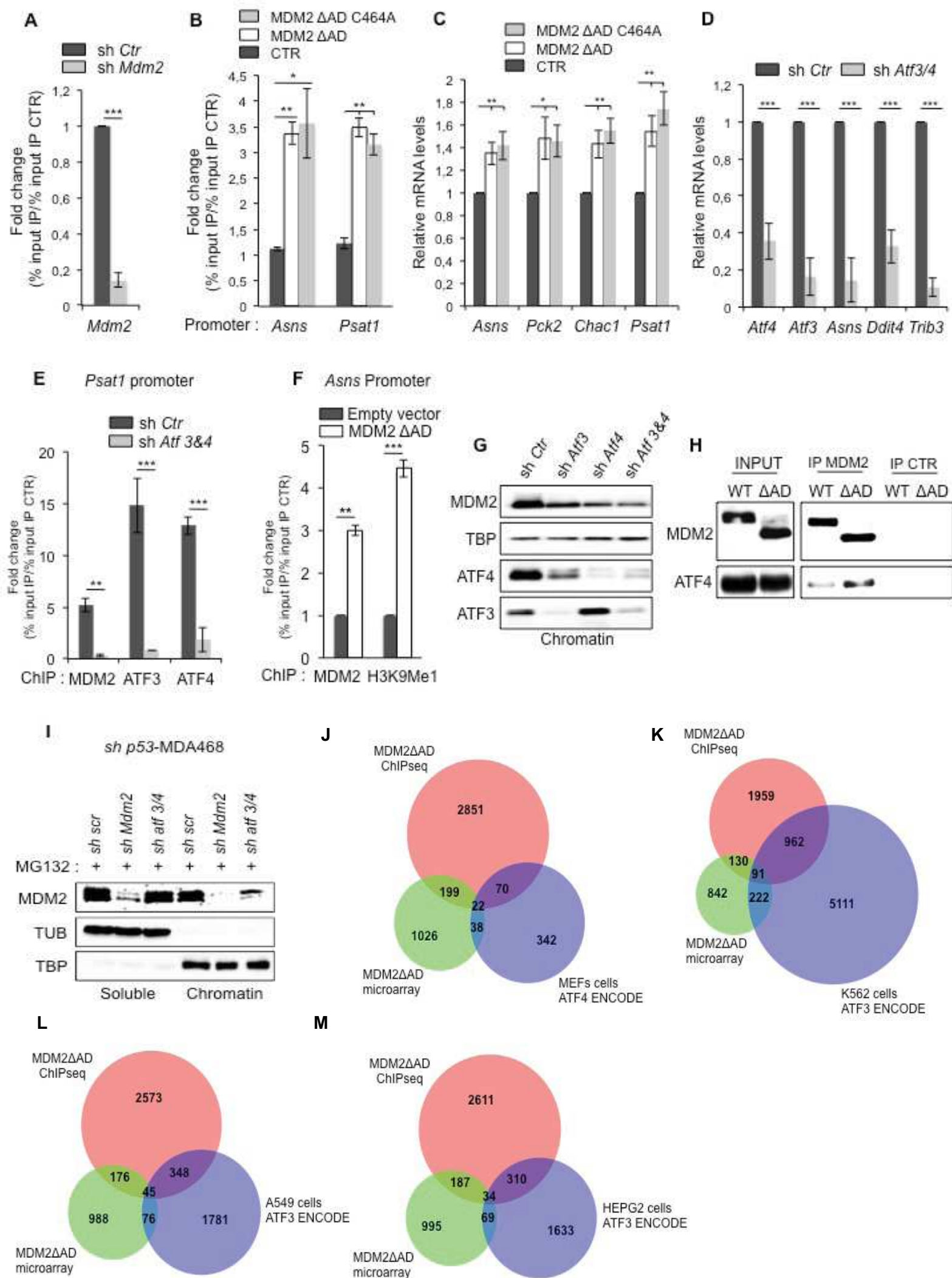
SUPPLEMENTAL INFORMATIONS

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure S1, related to figure 1: Mdm2 is recruited to chromatin independently of p53.

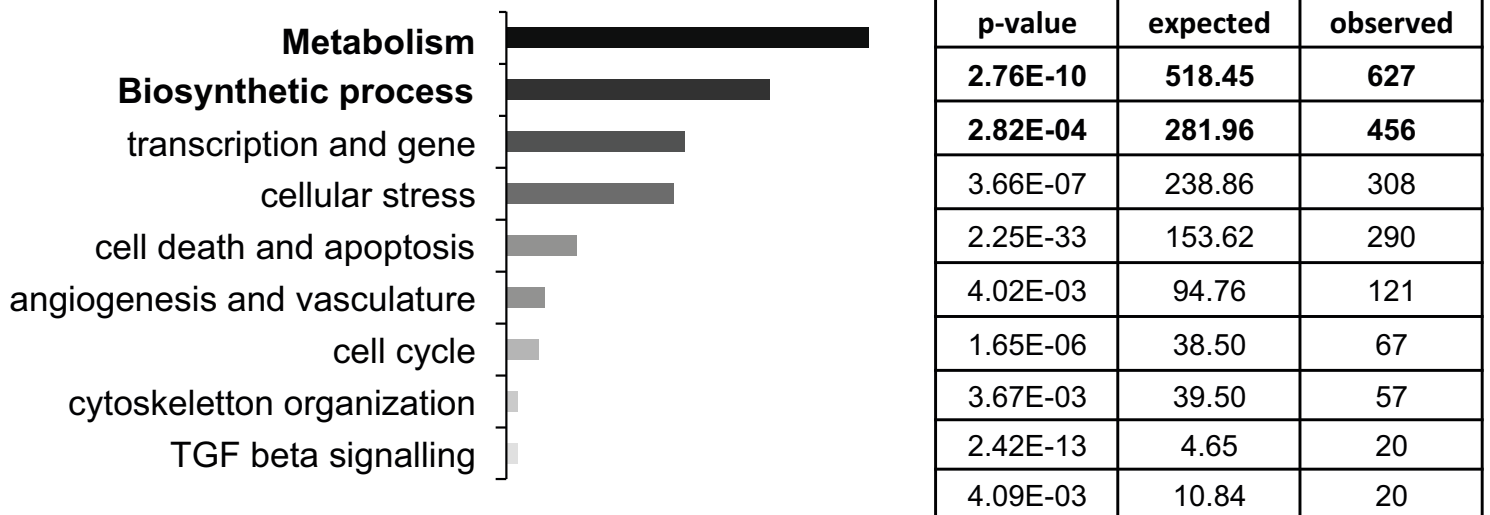
(A) Quantitative immunoblotting was used to determine the relative amounts of endogenous MDM2 in fractions enriched in chromatin or nucleo/cyto-soluble proteins in a panel of different cancer cell lines. Histograms represent the percentage of MDM2 protein in these fractions in a representative experiment. (B-C) The efficiency of *p53* shRNAs was verified by immunoblotting of total protein extracts prepared from 786.0 (B) and MDA-MB 468 (C) cells. Equal loading was verified by Tata Binding Protein (TBP) or Tubulin (TUB) expression. (D) Subcellular localization of MDM2 in MDA-MB468 cells stably expressing *p53*-shRNA. Chromatin-bound MDM2 was solubilized after digestion of DNA of the chromatin fraction C by Micrococcal nuclease (Mnase, 10 min) and recovered in the supernatant S. Release of TBP from chromatin was used as a control of Mnase efficiency. (E) Subcellular localization of the MDM2 Δ AD mutant in H1299 cells. Chromatin-bound MDM2 Δ AD was solubilized after digestion of DNA of the chromatin fraction C by Micrococcal nuclease (Mnase, 10 min) and recovered in the supernatant S. Release of Histone H3 from chromatin was used as a control of Mnase efficiency. (F-G) MDM2 localization on chromatin is independent of its E3 ligase activity. (F) The total protein levels of MDM2 Δ AD and of MDM2 Δ AD-C464A mutants were determined by immunoblotting, using anti-MDM2 antibody, 24 hours and transient transfection in H1299 cells. (G) MDM2 Δ AD and MDM2 Δ AD-C464A protein levels in fractions enriched in chromatin-associated (chromatin) or nucleo- and cyto- soluble (soluble) proteins were determined by immunoblotting, 24 hours after transient transfection in H1299 cells.



Supplemental Figure S2, related to figure 2. Mdm2 regulates an ATF transcriptional program.

(A) *Mdm2* mRNA level was determined by RT-qPCR analysis in H1299 cells, 48 hours after transduction with lentiviruses encoding a control or a shRNA targeting *Mdm2*. (B) Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) experiments showing the relative recruitment of the MDM2 Δ AD and MDM2 Δ AD-C464A mutants on *Asns* and *Psat1* promoters in H1299 cells. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with MDM2 antibody and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; n=3 independent experiments). (C) Relative mRNA levels of a representative panel of MDM2-target genes (*Asns*, *Pck2*, *Chac1*, *Psat1*), 48 hours after expression of the MDM2 Δ AD and MDM2 Δ AD-C464A mutants in H1299 cells. mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to control H1299 cells transfected with an empty vector (mean \pm SD; n=3). (D) Relative mRNA levels of a panel of MDM2 target genes determined by RT-qPCR after ATF3 and ATF4 knock down in H1299 cells. Data are expressed as the mean \pm SD (n=3) and normalized to cells expressing a control shRNA. (E) qChIP assays performed on *Psat1* promoter in H1299 cells after ATF3 and ATF4 knock-down, using anti -MDM2, -ATF3 or -ATF4 antibodies, as indicated. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; n=3 independent experiments). (F) qChIP experiments showing the relative amounts of chromatin-associated MDM2 and of mono-methylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9Me1) on the *Asns* promoter in control or H1299 cells expressing the MDM2- Δ AD mutant, as indicated. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; n=4 independent experiments). (G) Immunoblot analyses showing the levels of chromatin-associated endogenous MDM2, ATF3, and ATF4 in H1299 cells expressing control, *Atf3* or *Atf4* shRNAs, as indicated. Equal loading was verified by Tata Binding Protein (TBP) levels. (H) Co-immunoprecipitation assays in H1299 cells showing interactions between ectopic WT MDM2 or the MDM2 Δ AD mutant and endogenous ATF4. MDM2 or control immunoprecipitates were resolved on SDS PAGE and immunoprobed with

anti-MDM2 or ATF4 antibodies, as indicated. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. (I) Immunoblot analyses showing the level of endogenous MDM2, TBP and TUB in shp53-MDA468 cells expressing control- or a combination of *Atf3*- and *Atf4*- shRNAs in presence of MG132, in fractions enriched in chromatin-associated (chromatin) or nucleo- and cyto- soluble (soluble) proteins. (J-M) MDM2 and ATF-3/4 have common targets. Comparison of ATF3 and ATF4-ChIP-seq data available in ENCODE in primary murine fibroblasts (Mefs) and different human cancer cell lines (K562, A549, HEPG2) to our MDM2-ChIP-seq and microarray data sets obtained in H1299 cells. The Venn diagram illustrate the number of common genes in the indicated cell type and MDM2 target genes.

A**B**

| Go-term | expected | observed | p-value |
|----------------------------------|----------|----------|----------|
| Amino acid metabolism | 29.93 | 74 | 5.59E-17 |
| Organic metabolic process | 495.28 | 573 | 5.21E-06 |
| Nucleic acid metabolism | 290.26 | 303 | 3.46E-03 |

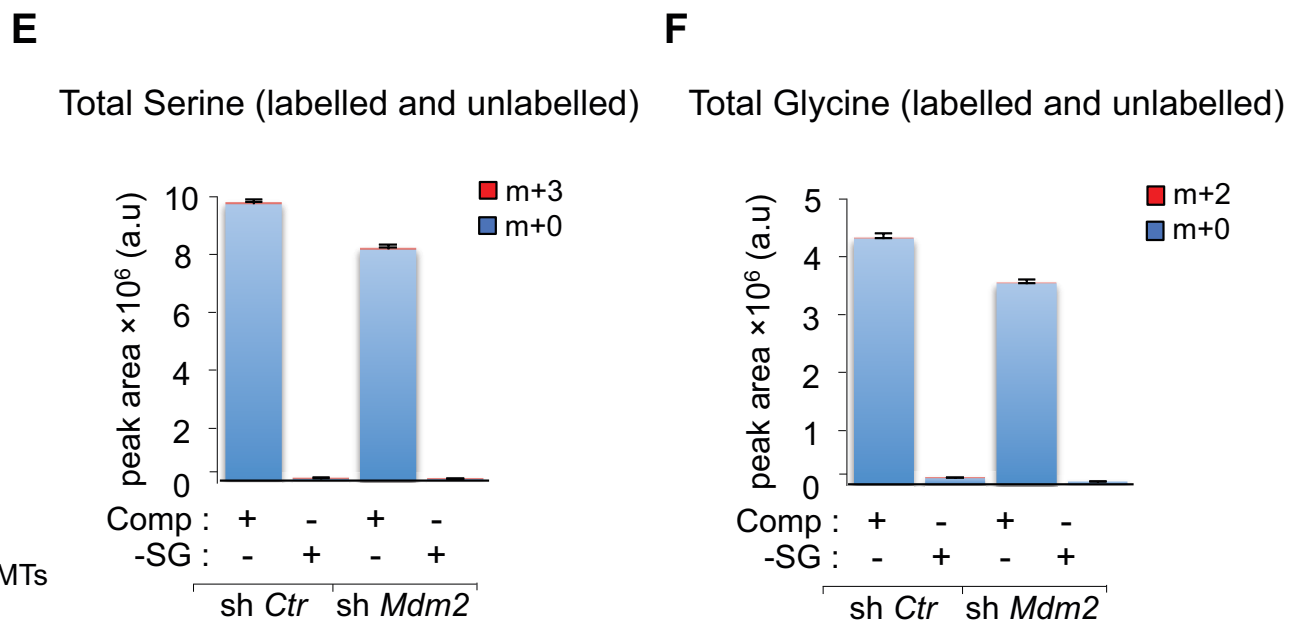
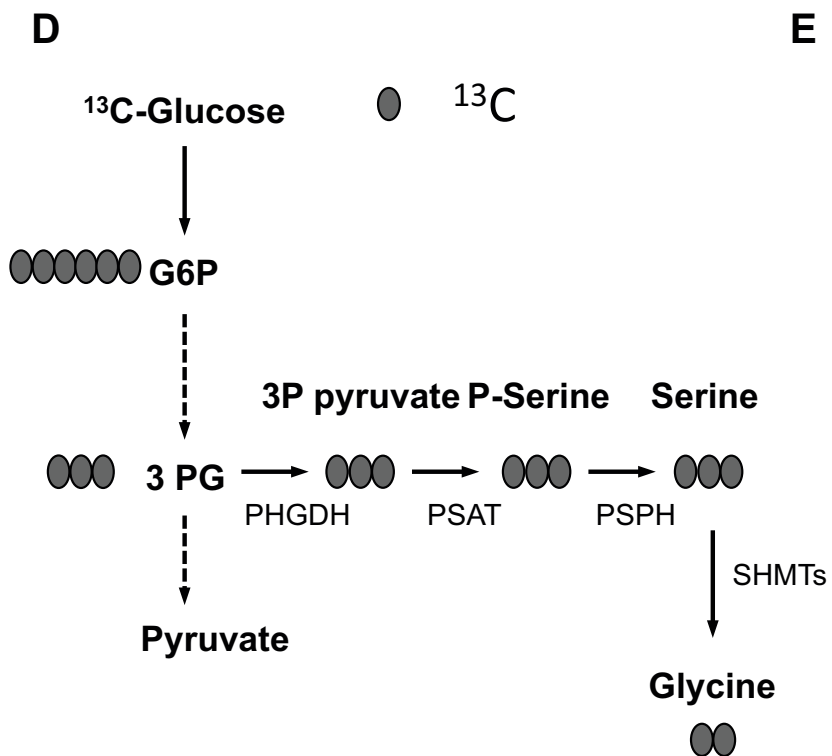
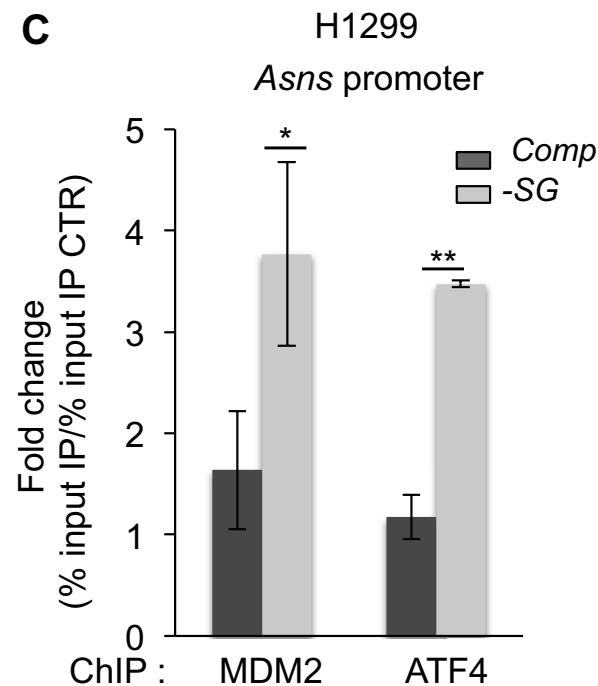
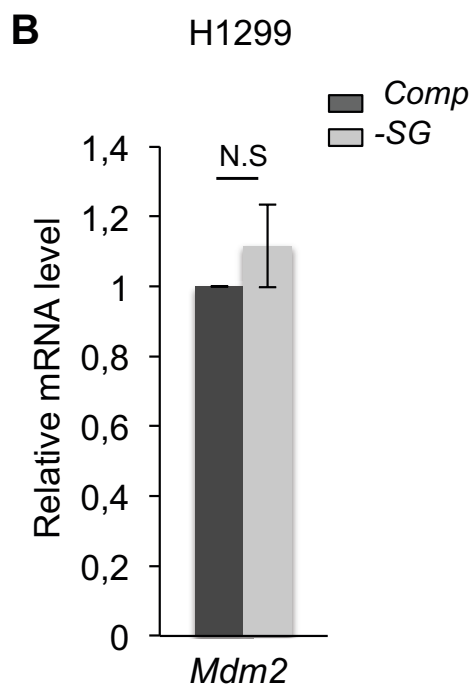
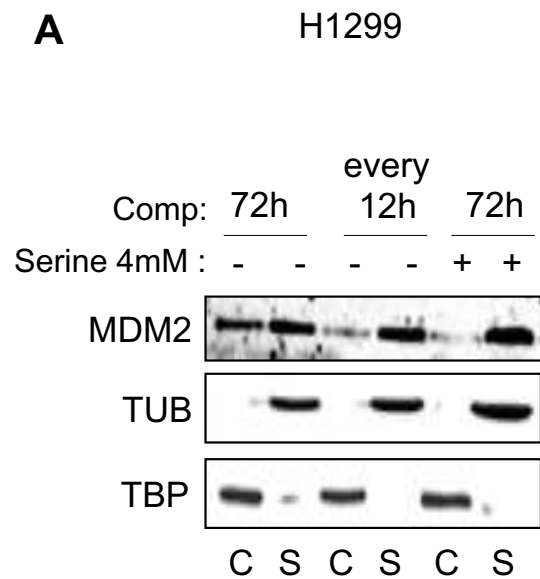
C

| Go-term | expected | observed | p-value |
|------------------------------------|----------|----------|----------|
| Cysteine pathway | 0.89 | 5 | 2.32E-10 |
| Serine/Glycine pathway | 3.38 | 13 | 7.54E-08 |
| Glutamine/Glutamate pathway | 2.53 | 9 | 3.02E-05 |
| Other amino acid pathway | 34.42 | 43 | 1.81E-03 |

D

| SERINE UTILIZATION | associated genes |
|-----------------------------|--|
| Glutathione pathway | <i>ACOT12, CBS, CHAC1, CTH, CTNS, EHHADH, ETHE1, GPX1, GSTT2, HS2ST1, MSRA, NPAS2, NQO1, PHGDH, PYCR1, SHMT2, TXNRD3, VNN1</i> |
| One Carbon and Folate cycle | <i>ALDH1L2, MTHFD1L, MTHFD2, SHMT2</i> |
| Sphingolipids metabolism | <i>ACER3, AGK, GAL3ST1, SERINC1</i> |

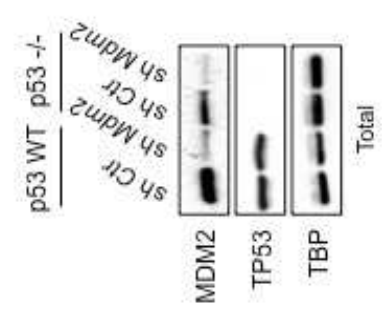
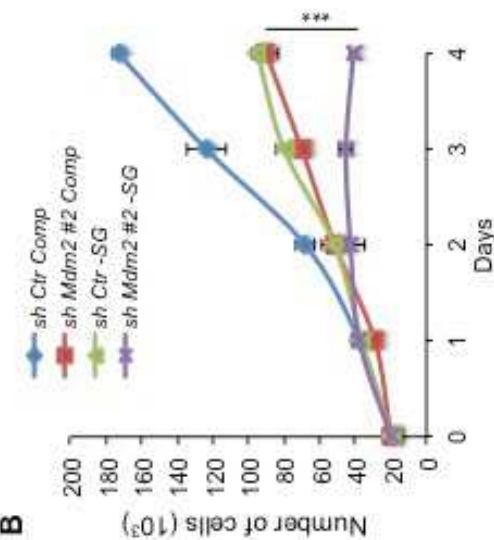
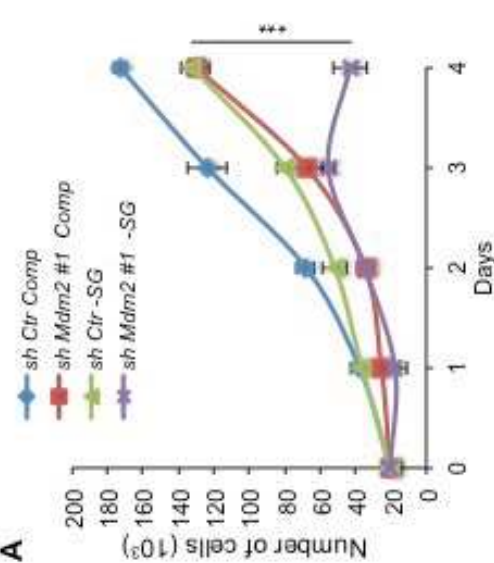
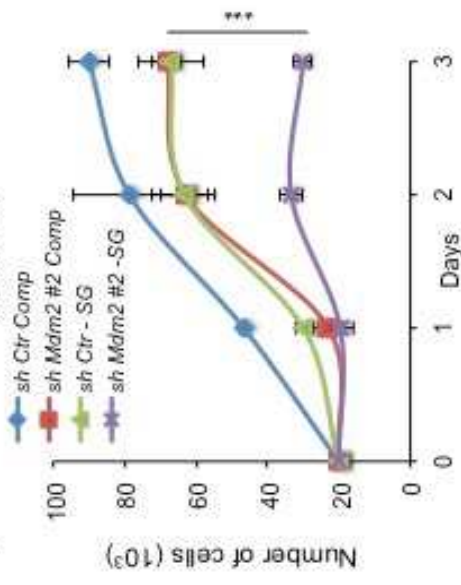
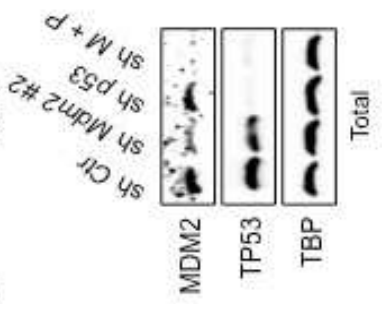
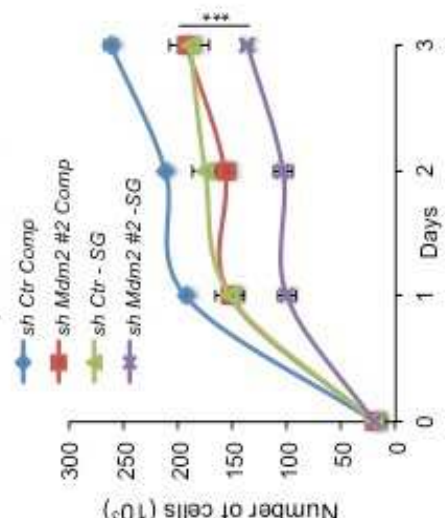
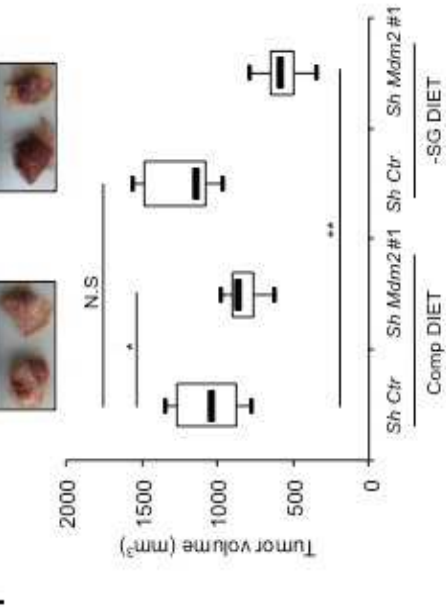
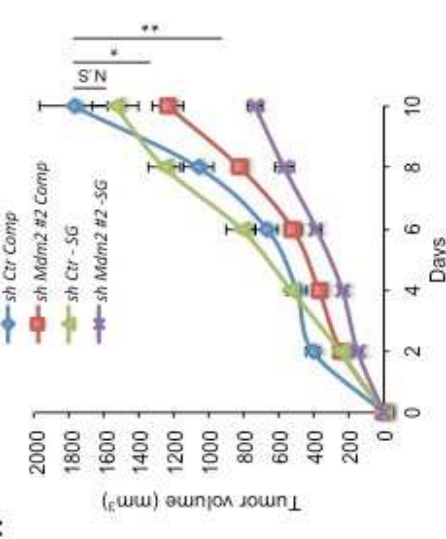
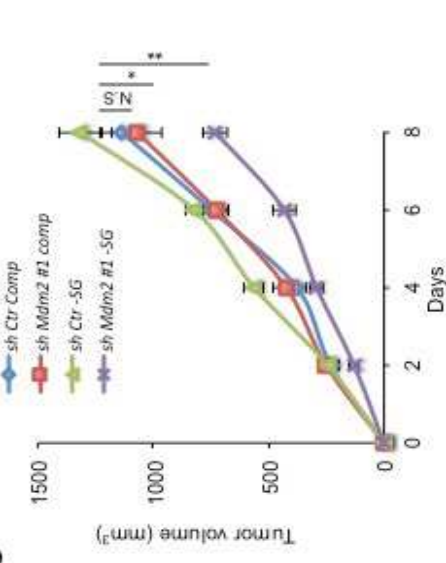
Supplemental Figure S3, related to figure 3. MDM2 regulates amino-acid and glutathione metabolism. (A) Gene set enrichment analysis (GSEA) of MDM2 responsive genes determined by microarray in control or H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant (p value $\leq 0,005$). (B) The metabolism and biosynthetic process categories were further subclassed and ranked according to their respective p -value. (C) Subclasses within the amino acid transport and metabolism category highlighted serine/glycine, glutamine/glutamate and cysteine metabolism. The tables (A-C) indicate the number of genes that would have been assigned to the indicated category if the data was generated at random (expected), versus the experimentally observed number of genes (observed). The p values were calculated by Genomatix software, using a Fisher's Exact Test. (D) Gene list of MDM2 responsive genes implicated in amino acid metabolism that control serine utilization.



Supplemental Figure S4, related to figure 3. Serine/glycine deprivation regulates MDM2 recruitment to chromatin.

(A) Progressive exhaustion of the exogenous pool of serine during in vitro culture increases MDM2 recruitment to chromatin. Immunoblot analysis of MDM2 protein level in fractions enriched in chromatin-associated (C) or nucleo-/cyto- soluble (S) proteins prepared from H1299 cells. The level of chromatin-bound MDM2 was compared in 3 conditions: H1299 cells cultured for 72h in the same complete medium, H1299 cells cultured in a complete medium that was changed every 12hours, and H1299 cells cultured for 72h in the same complete medium supplemented with exogenous serine every 12h (4 mM final). The quality of the fractionation and equal loading was verified by Tata Binding Protein (TBP) and Tubulin (TUB) expression. (B) The relative mRNA level of *Mdm2* was determined by RT-qPCR analysis in H1299 cells cultured in complete (Comp) or serine/glycine-deprived (-SG) medium for 48 hours. (C) qChIP experiments showing the relative recruitment of MDM2 and ATF4 on the *Asns* promoter in H1299 cells cultured in complete medium (Comp) or in the same medium lacking serine and glycine (-SG), as indicated. Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; n=3 independent experiments). (D-F) Stable isotope tracing experiments. (D) Schematic representation of mass isotopomer distribution within the de novo serine/glycine synthesis pathway after culture of H1299 cells with uniformly labelled [U-¹³C] glucose. H1299 cells expressing a control- or *Mdm2*- shRNA were cultured in complete (Comp) or serine/glycine-deprived (-SG) medium for 24 h, in the presence of [U-¹³C]glucose for the final hour. LC-MS was used to detect relative intracellular levels of total and ¹³C-labelled serine (E) or glycine (F). Histograms represent the mean value of the peak area \pm SD (arbitrary unit) corresponding to serine and glycine peaks on the MS-chromatogram. The experiment was performed in triplicate.

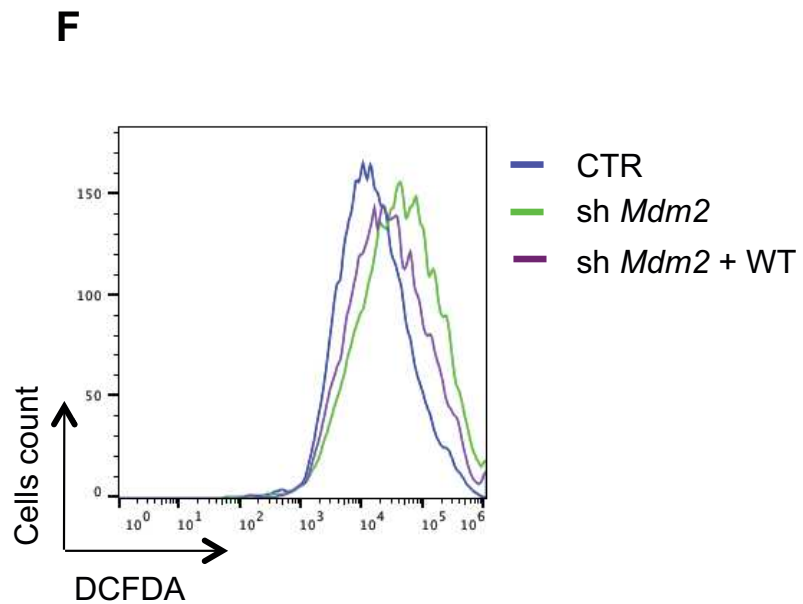
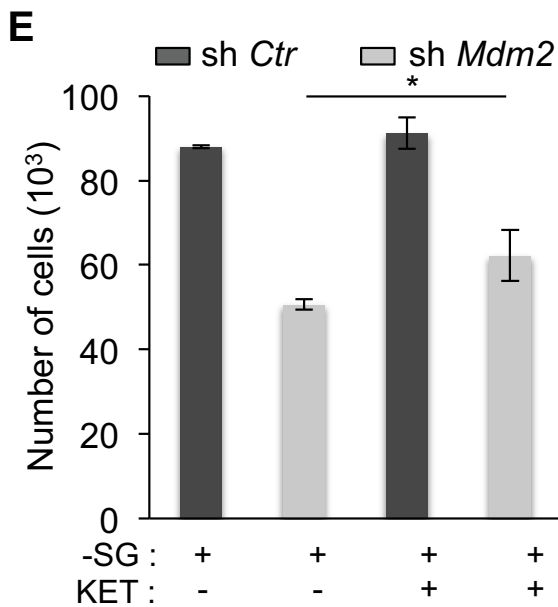
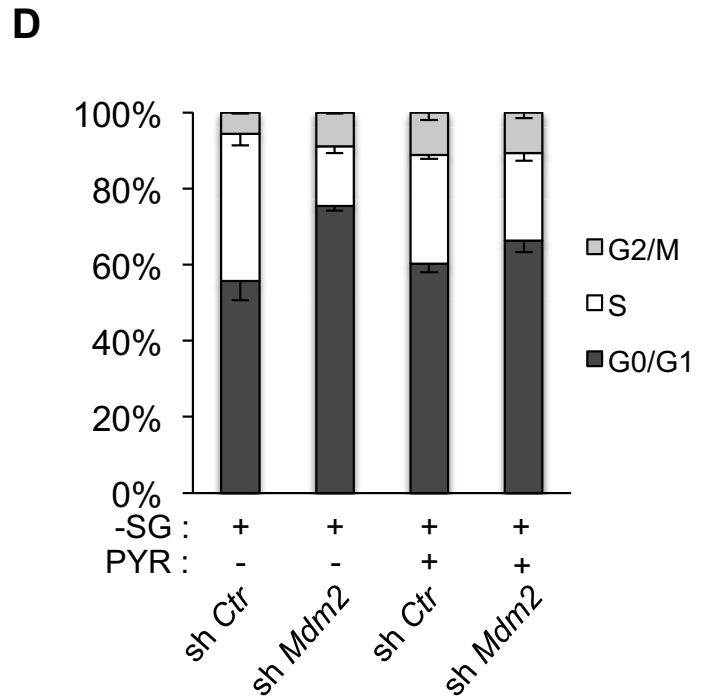
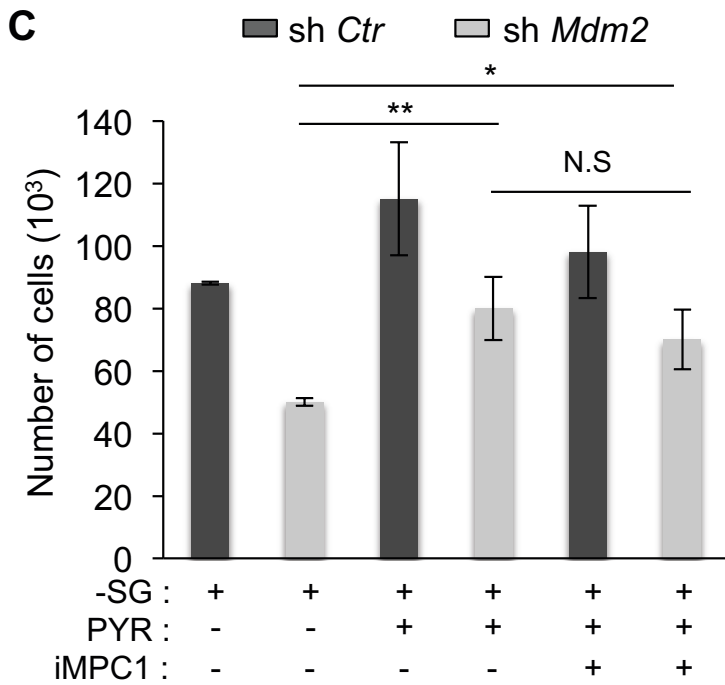
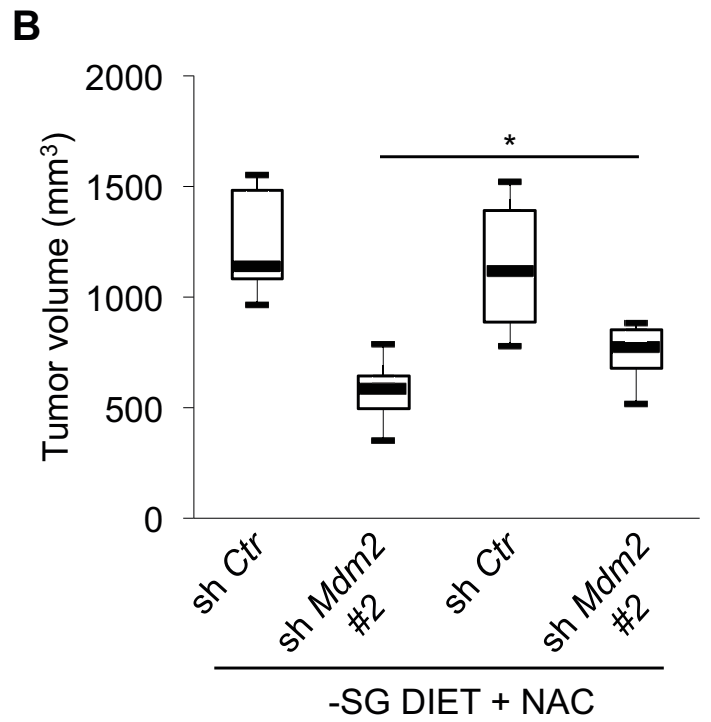
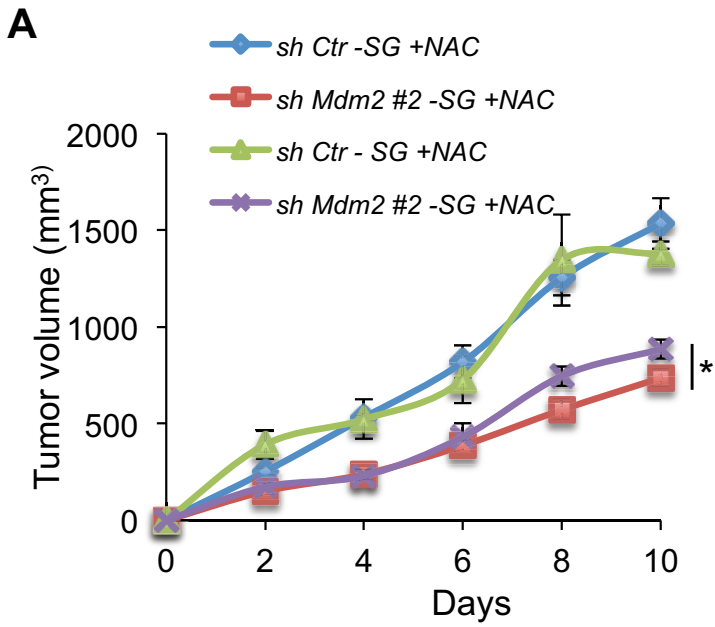
* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ indicate statistical significance of the observed differences. NS: not significant.

C HCT116**B****A****F** shp53-786**E** 786.O**D** p53 -/- HCT116**I****H****G**

Supplemental Figure S5, related to figure 4. MDM2-depleted cells display proliferative defects under serine/glycine deprivation.

(A-B) Growth curves of p53 null H1299 cells expressing control- or *Mdm2*- shRNAs (A, shRNA#1 and B, shRNA *Mdm2* #2) cultured in complete medium (Comp) or in the equivalent medium lacking serine and glycine (-SG). (C) MDM2 and p53 protein levels were determined by immunoblotting of whole cell extracts (Total) prepared from isogenic p53 WT or p53KO HCT116 cells expressing control or *Mdm2*- shRNAs (*Mdm2* shRNA#2). (D) Growth curves of p53 WT or p53 KO HCT116 cells expressing control- or *Mdm2*- shRNAs (*Mdm2* shRNA#2) cultured in complete medium or in the equivalent medium lacking serine and glycine (-SG). (E) MDM2 and p53 protein levels were determined by immunoblotting of whole cell extracts (Total) prepared from 786.O cells expressing control-, *Mdm2*- and/or *p53*- shRNAs, as indicated. M+P indicates cells expressing both *p53* and *Mdm2* shRNAs. (F) Growth curves of shp53-786.O cells expressing control or *Mdm2*- shRNAs (*Mdm2* shRNA#2) cultured in complete medium or in the equivalent medium lacking serine and glycine (-SG). Each growth curve represent the relative number of cells in the indicated culture conditions (mean +/- SD) from 3 independent experiments performed in triplicate wells.*** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. (G-H) p53 null H1299 cells expressing control- (CTRL) or *Mdm2*- shRNAs (A, shRNA#1 and B, shRNA *Mdm2* #2) were subcutaneously implanted in nude mice that were fed with normal control (Ctr) or a serine/glycine deprived diet (-SG) of equivalent calorific value and equal total amino acid content, as indicated. Tumor volume was measured at the indicated time points (n=7 tumors for each experimental group). (I) Box and whisker plots represent the tumor volume in each experimental group (n=7 tumors per group) when the first animal reached the ethical end-point. Microphotograph of a representative tumor for each experimental group is shown (upper panels).

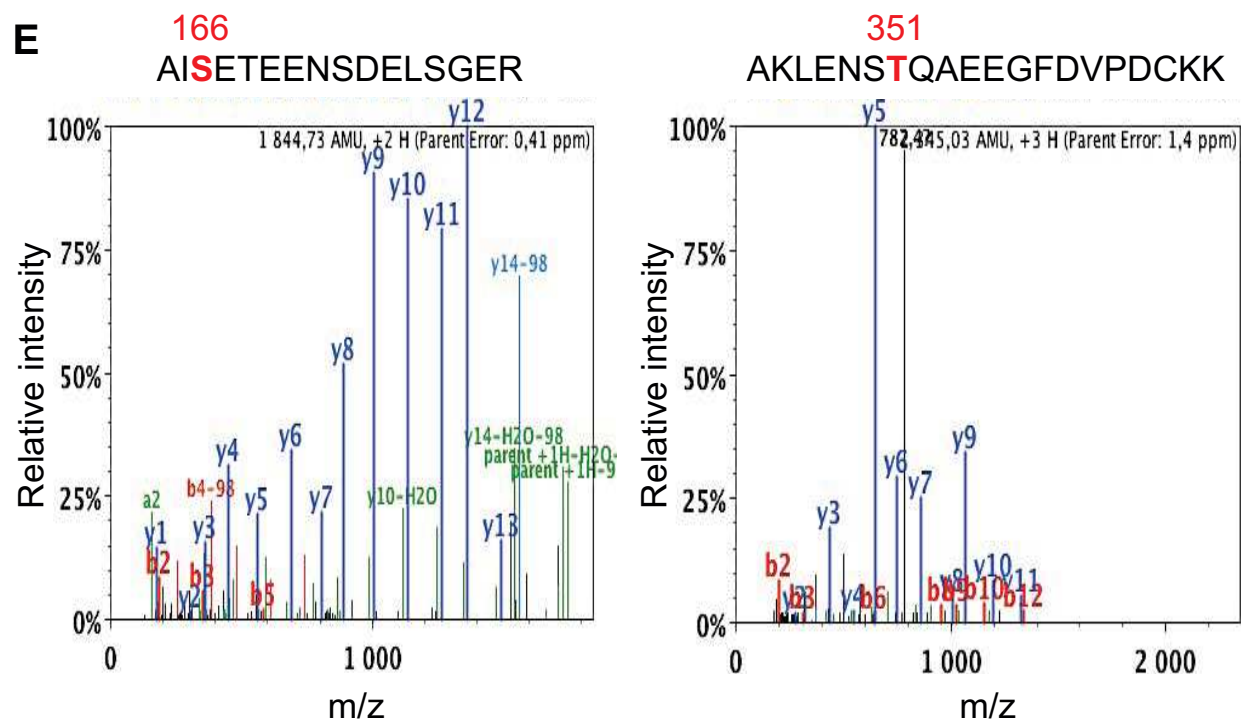
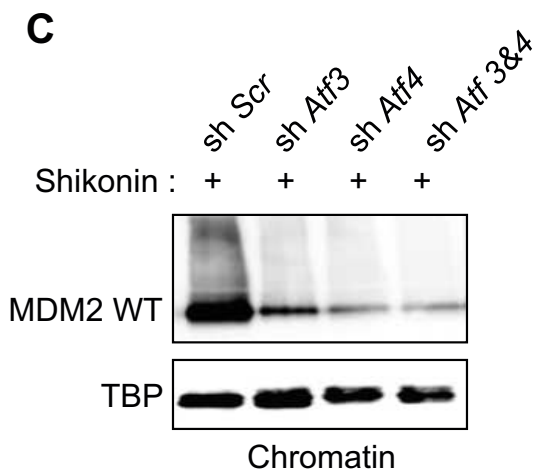
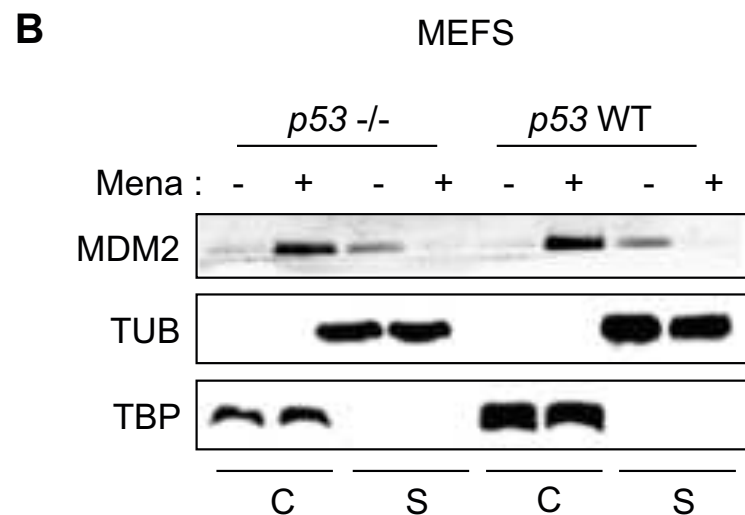
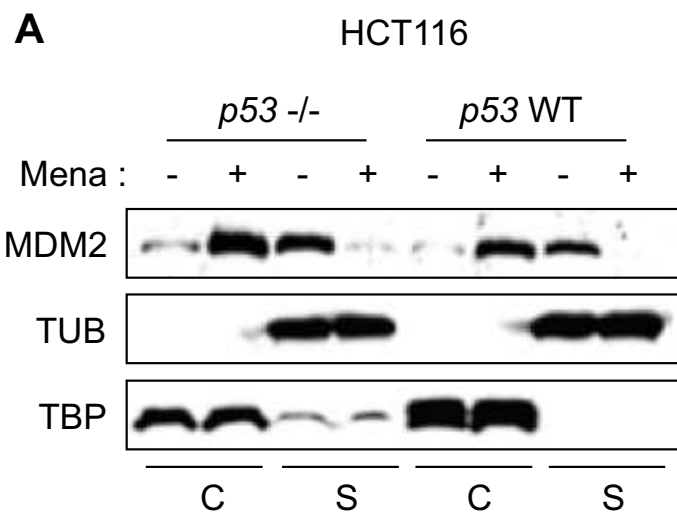
* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ indicate statistical significance of the observed differences. N.S, not significant.



Supplemental Figure S6, related to figure 5. The ROS scavenger N-Acetylcysteine (NAC) and pyruvate partly rescues the growth of MDM2 depleted cells in serine/glycine deprived conditions.

(A) H1299 cells expressing control- or *Mdm2*- (shMdm2#2) shRNAs cells were subcutaneously implanted in nude mice that were fed with a serine/glycine deprived diet (-SG), in presence or absence of NAC in the drinking water, as indicated. Tumor volume was measured at the indicated time points (n=7 tumors for each experimental group). (B) Box and whisker plots represent the tumor volume in each experimental group (n=7 tumors per group) when the first animal reached the ethical end-point. (C-D) Pyruvate partly rescues the growth defects of MDM2-deficient H1299 cells cultured in serine/glycine deprived medium (-SG). (C) Histograms represent the relative number of H1299 cells cultured in -SG medium complemented with pyruvate and a pharmacological inhibitor of the mitochondrial pyruvate transporter MPC1 (iMPC1), as indicated (mean +/- SD; n=3 independent experiments performed in triplicates). (D) Flow cytometry analyses (after propidium iodide and EdU co-staining) showing that pyruvate partly rescues the cell cycle arrest of MDM2-depleted H1299 cells cultured under serine/glycine-deprivation. Histograms represent the relative proportion of H1299 cells expressing control- or *Mdm2*- shRNAs in the different phases of the cell cycle after 4 days of culture in -SG medium, in presence or absence of pyruvate (PYR), as indicated. (E) Alpha-ketobutyrate (AKB) partly rescues the growth defects of MDM2-deficient H1299 cells cultured in -SG medium. Histograms represent the relative number of H1299 cells expressing control or *Mdm2*-shRNAs after 4 days of cultured in -SG medium, in presence or absence of AKB, as indicated (mean +/- SD; n=3 independent experiments performed in triplicates). (F) ROS levels were determined by flow cytometry using the redox-dependent fluorophore dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) probe in H1299 cells expressing control- or *Mdm2*- shRNAs and transfected with a construct expressing a shRNA-resistant WT-full length *Mdm2* cDNA. Data are representative of 3 independent experiments.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ indicate statistical significance of the observed differences. N.S, not significant.



Supplemental Figure S7, related to figure 6. MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 during oxidative stress.

(A-B) MDM2 protein level was determined by immunoblotting in fractions enriched in chromatin-associated proteins (C) and pooled fractions containing nucleo- and cytosoluble proteins (S) prepared from isogenic p53 WT and KO HCT116 cells (A), or from primary p53 WT or KO Mefs prepared from the same litter (B), in presence or absence of menadione, as indicated. The quality of the fractionation and equal loading was verified by Tata Binding Protein (TBP) and Tubulin (TUB) expression. (C) H1299 cells expressing WT-MDM2 were transduced with retroviruses encoding *Atf3*- and *Atf4*- shRNAs. The level of chromatin-bound MDM2 was determined by quantitative immunoblotting in the chromatin fraction prepared from these cells, in presence or absence of shikonin for 24h. Equal loading was verified by Tata Binding Protein (TBP) levels. (D) In vitro kinase assays performed with immunoprecipitated PKM2 (IP PKM2) from H1299 cells cultured in presence or absence of the PKM2 inhibitor shikonin and purified recombinant GST-MDM2 WT protein as a substrate in presence of [³²P]-ATP, as indicated. Control experiments were conducted in parallel with immunoprecipitates performed with an irrelevant antibody (IP CTRL). (E) MDM2 protein level was determined by immunoblotting in whole cell extracts prepared from H1299 cells expressing WT-MDM2 or the MDM2-S166S/T351A phosphorylation mutant. Experimental conditions were adjusted to ensure equal expression of both proteins that display different stability at the time we evaluated their binding to chromatin. (F) Purified recombinant GST-MDM2 was phosphorylated by immunoprecipitated PKM2 in vitro and analyzed by mass spectrometry. The calculated target ions for serine 166 (left panel) and threonine 351 (right panel) are shown.

LEGENDS OF SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental Table S1

(A) List of genes differentially expressed between H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant and their corresponding control cells transfected with the matched empty vector. Top-ranked genes were selected using the following criteria: p value <0.001. (B) List of transcription factors associated with the top-ranked MDM2 responsive genes identified by microarray. This list was determined using genomatrix software. (C) List of MDM2 target genes associated with ATF3/4 transcription factors using the gene expression profiles described in (A). (D) MDM2 target genes were identified in the p53 null H1299 cells by ChIP-sequencing assays using anti-MDM2 (N20) antibody by subtracting peaks identified in control cells expressing *Mdm2* shRNA to those identified in cells overexpressing the MDM2- Δ AD mutant. Raw data were processed using MACS (with a p value = 5.10^{-5}) and annotation of the nearest genes associated with MDM2 peaks was performed using GREAT 2.0. (E) List of MDM2 direct target genes identified by ChIP-seq that display differential expression between H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant and their matched control cells. (F) List of transcription factors associated with MDM2 target genes identified by MDM2-ChIP-seq and expression profiling in H1299 cells. (G) ATF-responsive genes are significantly enriched among MDM2-target genes identified by gene profiling and ChIP-seq.

Supplemental Table S2

(A) List of genes differentially expressed between H1299 cells expressing the MDM2 Δ AD mutant and their corresponding control cells transfected with the matched empty vector. Top-ranked genes were selected using the following criteria: p value <0.005.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of MDM2 constructs

MDM2 point mutants were generated by site-directed mutagenesis, using the Quickchange Lightning kit (Agilent Technologies). All the constructs were then verified by sequencing.

Antibodies and Reagents

The following antibodies were used for immunoblotting: mouse monoclonal anti -p53 (clone DO1, Santa-Cruz), -TBP (Santa-Cruz), -HDM2 (clone 4B2 Calbiochem), -TUBULIN (Sigma) and rabbit polyclonal anti -MDM2 (clone N20, Santa-Cruz), -ATF3 (Santa-Cruz), -ATF4 (Santa-Cruz), -PKM2 (Cell Signaling), -Histone H3 (Santa-Cruz), -PSPH (Santa-Cruz), -PSAT (Santa-Cruz), -PHGDH (Cell Signaling) and SLC1A4 (Cell Signaling). Shikonin, Menadione, N-Acetyl-Cysteine (NAC), Phosphatase inhibitor cocktail 2, Cycloheximide (CHX) and α -ketobutyrate were purchased from Sigma- Aldrich. Protease inhibitor complete EDTA-free was purchased from Roche. Sodium-Pyruvate was purchased from Gibco.

Knockdown or genetic inactivation of Mdm2, p53, Pkm2, Atf3 and Atf4

The following constructs were used for knock-down experiments: pRS_Hygro *shRNA Mdm2* (*sh Mdm2* provided by R. Bernards (NKI, Amsterdam)), pLKO.1_Puro *shMdm2 #1* (Sigma-Aldrich mission clone #3377), pLKO.1_Puro *shMdm2 #2* (Sigma-Aldrich mission clone #3378), pLKO.1_Puro *shAtf3* (Sigma-Aldrich mission clone #329689), pLKO.1_Puro *shAtf4* (Sigma-Aldrich mission clone #13575), pMKO.1 puro *shp53* (a gift from W. Hahn, Addgene clones #10671 and #10672), and pLKO_Puro *shPkm2* (a gift from D. Anastasiou, Addgene clone #42516). Retrovirus or lentivirus allowing stable expression of shRNA targeting the firefly *luciferase* gene was used as a control shRNA. Lentiviral and retroviral particles were produced as previously reported in packaging HEK293 cells (Hatchi et al., 2011). Transduced H1299 cells were selected with puromycin (2 μ g/ml, invitrogen) or hygromycin (50 μ g/ml) during 48h. For inactivation of murine Mdm2, primary MEFs were isolated at E13.5 from Mdm2^{flox/flox}; p53^{-/-} mice, and then transduced with a retrovirus expressing a self-excising CRE recombinase (Silver and Livingston, 2001), or a control empty retrovirus.

Subcellular fractionation and Micrococcal Nuclease treatment

The protocol for subcellular fractionation was adapted from a previously described method (Wysocka et al., 2001). Pooled cyto- and nucleosuble proteins and chromatin associated proteins were then analyzed in parallel by immunoblotting. Briefly, cells were seeded in 150mm dish grown in the indicated medium until they reached 90% confluency. Cells were then washed with PBS, scraped in lysis buffer 1 (10mM Hepes, 10mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.34M sucrose, 10% glycerol, protease inhibitors Complete EDTA-free and 1 mM DTT) and then rapidly centrifuged at 3500 RPM at 4°C. The supernatant containing cytosoluble proteins was stored and then pooled with the fraction containing nucleosoluble proteins (S fraction). Nucleosoluble proteins were recovered by vortexing the pellet upon incubation with buffer 2 (3 mM EDTA, 0.2 mM EGTA and protease inhibitors) for 30 min at 4°C. After 2 washes with buffer 2, chromatin-associated proteins (chromatin fraction) were recovered from the pellet by addition of Laemmli buffer and processed for immunoblotting. To demonstrate that MDM2 was localized in the fraction enriched in chromatin-associated proteins and not in insoluble structures that are co-purified with this fractionation method, the pellet corresponding to the chromatin fraction was incubated with 2 units of Micrococcal Nuclease (Sigma-Aldrich) in reaction buffer (10 mM Tris-HCL, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1mM DTT and protease inhibitor in a final volume of 100 μ l) for 10 min at 37°C. Proteins remaining in this pellet or chromatin-associated proteins recovered in the supernatant were lysed by addition of Laemmli buffer and heated at 95°C for 10 min before being processed for immunoblotting.

Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) assays

H1299 Cells ($5 \cdot 10^6$ cells) were trypsinized and counted before crosslink (5 min 1% formaldehyde/1% paraformaldehyde added in the culture medium). Glycine was added at 125mM final for 5 minutes to stop the crosslinking. Cells were then rinsed with cold PBS. Cell nuclei were isolated upon incubation for 5 minutes on ice in buffer A (20mM Hepes pH 7,8, 10mM KCl, 0,25% tritonX100, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, supplemented with protease inhibitors). After centrifugation, nuclei were resuspended in buffer B (10mM Tris pH8, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, protease inhibitors) for 10 min on ice. Nuclei were lysed and chromatin extracted with lysis buffer (10mM Tris pH8,140mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% tritonX100, 0,05% NaDoc,

1mM EDTA, 0,5mM EGTA, protease inhibitors) at a final concentration corresponding to 10 millions of cells per ml. Chromatin sonication was achieved with a sonicator (epishear, Active motif). MDM2 ChIP was carried out by incubating 500µl (prepared from 5 millions of cells) of chromatin prepared from H1299 cells with 20µl of protein G- Dynabeads (life technology) and 5 µg of MDM2 N20 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz) or an irrelevant antibody. After O/N incubation, immunoprecipitates were successively washed with the 5 following buffers: W1 (Tris pH8 10mM, KCl 150mM, NP40 0,5%, EDTA 1mM), W2 (10mM Tris pH8, 100mM NaCl, 0,1% NaDoc, 0,5% TritonX100), W3a (10mM Tris pH8, 400mM NaCl, 0,1% NaDoc, 0,5% TritonX100), W3b (10mM Tris pH8, 500mM NaCl, 0,1% NaDoc, 0,5% TritonX100), W4 (10mM Tris pH8, 250mM LiCl, 0,5% NaDoc, 0,5% NP40, 1mM EDTA), W5 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA). Input and immunoprecipitated DNA were decrosslinked ON at 65°C, diluted in TE and incubated first with RNaseA (37°C, 45 minutes) and then treated with proteinase K (55°C, 45 minutes). Proteins were removed with phenol-chloroform-isomalylic-alcohol extraction and DNA was recovered by chromatography (nucleospin extract II columns, Macherey-Nagel). ChIP-qPCR: 1/100 (0.5µl) of input or immunoprecipitated DNA was analyzed by quantitative PCR with sybr green (Takara) on a LightCycler 480 apparatus (Roche). Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies and the one obtained with a control irrelevant antibody. Sequence of primers used for qPCR can be provided upon request.

Micro-array gene expression analysis

Gene expression profiles were determined from mRNA prepared from H1299 cells expressing ectopic MDM2 Δ AD mutant or their corresponding control cells transfected with the matched empty vector. Each experiment was repeated 4 times and gene expression was analyzed with Agilent® SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarrays (AMADID 28004) following the manufacturer's instructions. Test samples were labelled with Cy5 and controls with Cy3. Microarray images were analyzed with Agilent Feature Extraction (10.7.3.1), using the default settings. Microarray data were processed as follow: control probes were systematically removed, and flagged probes were considered as missing values. Arrays were normalized by loess normalization, followed by quantile normalization of both Cy3 and Cy5 channels.

Arrays were then normalized by quantile normalization on M-values. A single value was computed for each transcript by taking the mean of each replicated probes. Missing values were replaced using the KNN algorithm (package 'impute' from R). Normalized data were then analyzed with LIMMA. The top-ranked genes were selected using the following criteria: p-value < 0.001.

Xenografts

Bilateral subcutaneous injections of $8 \cdot 10^6$ H1299 cells were carried out on 8-week-old CD-1-Foxn1^{nu} mice (Charles River). One week before injection, mice were fed with control diet (Amino Acid diet, TD99366, Harlan) or the same diet lacking serine and glycine (Harlan). The diets had equal calorific value (3,9 kCal/g) and equal amount of total amino acids (179.6g/Kg). Total food uptake was controlled to be identical in all experimental groups. Mice were housed in a pathogen free barrier facility in accordance with the regional ethic committee for animal warfare (n°CEEA-LR-12067). Volumetric measurements of xenografted tumors were performed every 3 days by the same person using a manual caliper (volume = (length × width²)/2). All animals were sacrificed when the first animal reached the ethical endpoint (volume=1500 cm³ or ulceration). NAC (40mM) was added in the drinking water and renewed every other day.

Cell culture and Proliferation assays

Unless otherwise stated, cell culture reagents were purchased from Gibco (Invitrogen). Cells were kept at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. H1299, MEFs, MDA MB-468 and -231 cells were maintained in DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Thermo Scientific). 786.0, LnCap, A549, LS174T, MCF7 and NIH Ovar3 cells were maintained in RPMI Glutamax supplemented with 10% FBS (Hyclone, Thermo Scientific). For amino acid starvation experiments, cells were cultured in DMEM lacking serine and glycine (-SG medium, Biological Industries). The indicated drugs were directly added in the culture medium: Shikonin (20 μM), Menadione (100 μM).

For proliferation assays, cells were transduced overnight with retroviral or lentiviral particles encoding firefly *luciferase* (control) or *Mdm2* shRNAs, selected with puromycin (2 μg/ml) for 72h and then seeded in triplicates in 6-well plates ($3 \cdot 10^5$ cells per well) in regular DMEM. 24 hrs later, cells were washed with PBS and then

cultured in complete or –SG medium in presence of absence of NAC (10mM), Sodium pyruvate (5mM) or α -ketobutyrate (5mM). Cell numbers were determined by manual counting after trypan-blue exclusion every 24h during 4 days. To evaluate the impact of progressive consumption of exogenous serine and glycine during cell culture on the recruitment of MDM2 to chromatin, H1299 cells were either cultured for 72h in complete DMEM medium that was replaced every 12h (fresh) or in the same unchanged medium.

For analysis of MDM2 localization after DNA damage, biochemical fractionation was performed in H1299 cells that were UV irradiated (50 mJ/cm², 1 h), irradiated with 5 Gy of ionizing radiation (24 hrs), or treated with 1mM of 5FU (12h) or 10 mM H₂O₂ (1h).

Analysis of MDM2 stability

Protein half-life was determined in H1299 or shp53-786 cells after addition of cycloheximide (CHX) (50 μ g/ml, Calbiochem). Biochemical fractionation was performed at the indicated time points after CHX addition.

RNA extraction and quantitative RT-qPCR

Total mRNAs were isolated from H1299 cells using TriZol Reagent (Invitrogen). cDNAs were synthesized from 500ng of total RNA using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time quantitative PCRs were performed on a LightCycler 480 SW 1.5 apparatus (Roche) with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and a SYBR Green mix containing 3 mM MgCl₂ and 30 μ M of each dNTP using the following amplification procedure: 45 cycles of 95°C for 4 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 15 s. The relative mRNA copy number was calculated using Ct value and was normalized with *Tbp* or *beta2-microglobulin* transcripts. Sequence of primers used for PCR can be provided upon request.

Immunoprecipitation experiments and in vitro kinase assays

To perform in vitro kinase assays, PKM2 was immunoprecipitated from total protein extracts prepared from 3.10⁶ of mock- or shikonin- treated H1299 cells. Briefly, cells were lysed in lysis buffer (100mM Tris-HCl pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1%NP-40, 1mM DTT) supplemented with protease inhibitors (Complete- EDTA free, Roche). 1 mg of total protein extract was incubated overnight at 4°C with 5 μ g of mouse

monoclonal anti-PKM2 antibody (Cell Signaling) or an irrelevant antibody and 20 μ l of protein G-dynabeads (Life Technology). After washing, beads with control or PKM2 immunocomplexes were incubated with bacterially produced GST-MDM2 in kinase buffer (Cell Signalling, 20 μ l final) in presence of 5 μ Ci [γ 32P]ATP and incubated for 30 min at room temperature. Reactions were stopped by adding Laemmli sample buffer and [32P]-labelled proteins were separated by 8% SDS-PAGE and detected by autoradiography.

In vitro binding assay

10 μ l of in vitro-translated ³⁵S-labelled MDM2 or PKM2 proteins were incubated with recombinant GST or GST-MDM2 or with 6XHIS-tagged PKM2 that were preadsorbed on glutathione-sepharose or Ni-NTA beads in binding buffer (0.1mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 200 ml final volume) overnight at 4°C. The pull-down products were separated by 8% SDS-PAGE, followed by autoradiography.

Co-immunoprecipitation assays

H1299 cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris HCL pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% SDS, 1 mM EDTA), supplemented with protease inhibitors. Immunoprecipitation was carried out by incubating 500 μ g proteins overnight with 1 μ g of the indicated antibody. Antibody-protein complexes were then purified by adding Protein A Sepharose beads (Sigma), washed twice in lysis buffer without SDS and finally resuspended in Laemmli 2X. Co-immunoprecipitates were then processed for immunoblotting.

Mass spectrometry analysis

Sample reduction was performed by adding 50 μ l of 5mM TCEP in 50 mM ammonium bicarbonate. Alkylation was performed by adding 50 μ l of chloroacetamide 50mM with ammonium bicarbonate 50 mM. Digestion was performed with 2 μ g of chymotrypsin for 8 h at 37°C, followed by an additional digestion step with 1 μ g of trypsin for 8 h at 37°C. Samples were loaded and separated on a homemade reversed-phase column (150 μ m i.d. x 150 mm) with a 106-min gradient from 0–30% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on a Easy nLC 2 (Thermo Fisher Scientific) connected to a Q-Eactive HF (Thermo Fisher

Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 70,000 resolution was followed by 12 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Peptides were identified using Peaks 7.5 (Bioinformatics Solution Inc.) and peptide sequences were blasted against the human Uniprot database. Tolerance was set at 10 ppm for precursor and 0.01 Da for fragment ions during data processing. For the post-translational modification of proteins, occurrence of carbamidomethylation (C), oxidation (M), deamidation (NQ) were considered. The procedure achieved 95% coverage of the MDM2 protein.

FACS analysis of cell cycle profiles

H1299 cells were incubated for the last 2 hours of culture in presence of EdU (10 μ M). Cell cycle distribution was determined on fixed cells by flow cytometry on a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) upon staining with Click it EdU Flow Cytometry Assay Kit (life technologies) and propidium iodide, according to the manufacturer's recommendations.

Stable isotope tracing experiments

Measurement of glucose-derived ^{13}C incorporation in serine and glycine were performed as previously described (Maddocks et al., 2013).

Intracellular ROS, Glutathione and NAD⁺/NADH measurement

Total intracellular ROS levels were evaluated on live cells by flow cytometry using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter) upon staining with the CM-H2DFCDA probe (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The levels of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) in H1299 cells were measured with the GSH/GSSG- Glo Assay (Promega, V6611) according to the manufacturer's instructions. The NAD⁺/NADH ratio was measured in H1299 cells using the NAD/NADH Glo Assay (Promega) and a modified protocol adapted from Sullivan et al. (Sullivan et al., 2015).

SUPPLEMENTAL BIBLIOGRAPHY

Hatchi, E., Rodier, G., Lacroix, M., Caramel, J., Kirsh, O., Jacquet, C., Schrepfer, E., Lagarrigue, S., Linares, L.K., Lledo, G., et al. (2011). E4F1 deficiency results in oxidative stress-mediated cell death of leukemic cells. *J. Exp. Med.* 208, 1403–1417.

Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* 493, 542–546.

Silver, D.P., and Livingston, D.M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol. Cell* 8, 233–243.

Sullivan, L.B., Gui, D.Y., Hosios, A.M., Bush, L.N., Freinkman, E., and Vander Heiden, M.G. (2015). Supporting Aspartate Biosynthesis Is an Essential Function of Respiration in Proliferating Cells. *Cell* 162, 552–563.

Conclusion article:

L'oncogène MDM2 participe aux processus cancéreux par de nombreuses voies. Son action négative sur p53 y contribue grandement, mais le nouveau rôle de MDM2 dans le métabolisme cancéreux au travers de la régulation de la voie de biosynthèse de la sérine et du maintien de l'homéostasie redox dans les cellules cancéreuses lui confère une importance non négligeable dans la croissance tumorale. Ainsi nos résultats montrent que MDM2 est capable indépendamment de p53 de contrôler le métabolisme des cellules cancéreuses faisant de lui une cible potentielle dans le traitement de cancers en particulier ceux qui ont une amplification du gène *Mdm2*.

DISCUSSION

ET PERSPECTIVES

Le cancer né de l'interaction des cellules entre elles et leur environnement. Des cellules en culture montrent que les gènes ne sont pas fixes, ils sont régis par le contexte, le microenvironnement. Quand cette architecture extérieure est détruite et perturbée, cela se répercute sur les gènes. Ces gènes sont principalement des oncogènes qui poussent la cellule à croître hors proportion sans que rien ne vienne contrôler cette croissance qui aboutira à une tumeur. Ces dernières années la génétique a montré ses limites laissant place à une autre façon d'essayer de comprendre le cancer en envisageant d'étudier la cellule en relation avec son environnement, la façon dont elle respire, se nourrit ou se développe. On s'intéresse maintenant à la disponibilité des ressources nutritives pour une cellule et comment elle les utilise. On parle de métabolisme. L'intérêt pour cette discipline est basé sur le principe que les activités métaboliques sont altérées dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Cependant, comment le métabolisme est-il reprogrammé dans les cellules cancéreuses et comment exploiter ces changements métaboliques afin de faire des progrès thérapeutiques, font partie des questions clés qui orientent la recherche au sein de cette discipline. Mes travaux de thèse permettent d'expliquer comment un oncogène comme MDM2 peut participer à la modulation du métabolisme des cellules cancéreuses et ainsi avancer dans la compréhension de certains mécanismes utilisés par les cellules cancéreuses pour subvenir aux besoins que requiert une hyper prolifération. Une meilleure compréhension de ces phénomènes devrait à terme conduire à de nouveaux traitements pour lutter contre les cancers humains.

1) MDM2: bien plus qu'un oncogène, un facteur diagnostic:

L'analyse comparative d'échantillons de tumeurs de patients permet d'un point de vue moléculaire de mettre en évidence des facteurs pronostiques qui diffèrent en terme d'expression. Ainsi la réponse au traitement, l'apparition de métastase ou encore le risque de récurrence peuvent être appréhendés en terme de prévention. Dans cette optique mes travaux soulignent une hétérogénéité dans l'expression protéique de MDM2 dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses incluant les cellules du cancer du sein (MCF7, MDA-MB468, MDA-MB231), du poumon (H1299, A549), du rein (786.0) ou du colon (LS147T) pour ne citer qu'elles. Cette hétérogénéité peut s'expliquer en partie par le statut génétique de ces lignées cellulaires. Pour donner un exemple, la lignée cellulaire H1299 est génétiquement nulle pour *p53* et exhibe de faible niveau protéique de MDM2 alors que la lignée MCF7 exhibe un *p53* WT et de fort taux d'expression de MDM2. Comme rapporté dans l'introduction, *Mdm2* est un gène cible de *p53* (autorégulation) et l'absence de ce dernier joue sur l'expression de la protéine MDM2. En plus de cette différence d'expression, j'ai pu mettre en évidence une localisation subcellulaire différente de MDM2 suivant les lignées cancéreuses. En effet MDM2 est connu pour être présent dans de nombreux compartiments cellulaires, comme le noyau, les nucléoles ou encore dans le cytoplasme. En plus de ces localisations connues de MDM2, j'ai pu montrer qu'une fraction non négligeable de MDM2 se retrouvait, dans certaines lignées cellulaires,

associée à la chromatine. Nous montrons ici que cette relocalisation s'opère en réponse à une certaine catégorie de stress comme la carence en acides aminés (sérine et glycine) et le stress oxydant. Cette différence d'expression et de localisation de MDM2 entre les différentes lignées soulève des questions intéressantes quant au rôle de MDM2 dans la cellule en tant que modulateur du métabolisme. En effet on peut imaginer qu'en plus de la pression génétique, le statut oxydatif de ces différentes lignées peut jouer sur l'expression et la localisation de MDM2 en vu d'activer la voie de synthèse du glutathion, le principal acteur de la réponse anti oxydante. Ainsi il serait donc intéressant de classer les différentes lignées cellulaires cancéreuses en fonction de leur potentiel redox. Une simple mesure du stress oxydant par cytométrie permettrait de définir ce point. De plus une étude récente montre une différence de survie à la carence en sérine entre les deux lignées du cancer du sein MDA-MB468 et MDA-MB231 (**Figure 34**) (458). Différence en partie expliquée par la surexpression de *Phgdh* dans la lignée MDA-MB468 qui lui confère cette résistance. La surexpression de *Phgdh* augmente probablement le flux vers la biosynthèse *de novo* de sérine afin de compenser la perte d'apport de sérine exogène.

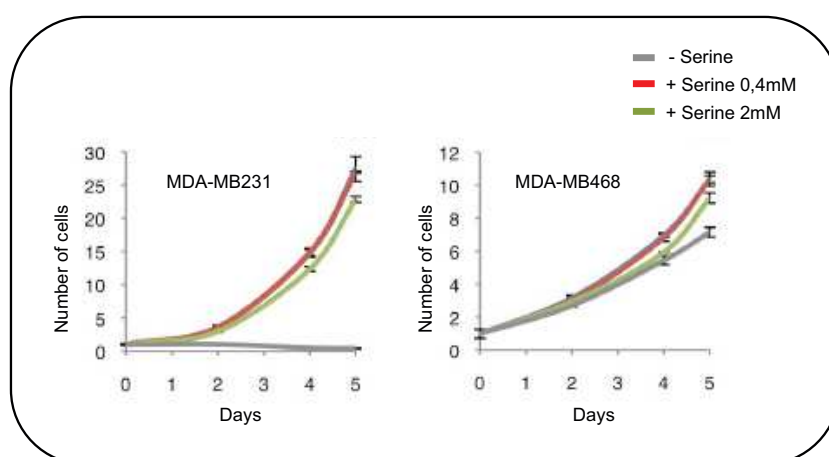


Figure 34: La réponse à la carence en sérine

Courbes de croissance cellulaire des lignées du cancer du sein MDA-MB231 et MDA-MB468 en réponse à une carence en sérine. Comme on peut le voir, seule la lignée MDA-MB468 résiste à cette carence.

Adaptée à partir de Labuschagne et al. (2014).

J'ai montré pendant ma thèse que MDM2 est associé à la chromatine de façon à réguler les enzymes de la biosynthèse de la sérine. Il est donc intéressant de noter ici que notre étude montre une différence entre ces deux lignées au niveau du recrutement de MDM2 à la chromatine, renforçant l'idée que la lignée MDA-MB468 résiste à la carence en sérine car elle force l'activation de la synthèse *de novo* de sérine via la surexpression de *Phgdh* ainsi que le recrutement de MDM2 à la chromatine.

Ces résultats tendent à penser que MDM2 peut s'avérer de par son expression (déjà utilisée dans le diagnostic des liposarcomes) mais aussi par sa localisation cellulaire comme un bon facteur diagnostic en vu d'établir des traitements adaptés en fonction des caractéristiques génétiques et métaboliques de chaque patient.

2) MDM2 Δ AD: un outil d'étude du métabolisme cancéreux

Lors de notre étude analyse structure/fonction des différents domaines de MDM2 susceptibles d'être impliqués dans son recrutement à la chromatine, nous avons mis en évidence le domaine acide de MDM2 comme régulateur négatif de cette relocalisation. Ce domaine central acide de MDM2 est connu pour être la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles ainsi qu'un site de liaison pour de nombreuses protéines cellulaires comme rapporté dans l'introduction. Nous avons montré que l'absence de ce domaine induit la relocalisation spontanée de MDM2 à la chromatine. De façon intéressante, il a été montré que la structure tridimensionnelle de MDM2 est très importante pour son activité. Le domaine acide a été décrit récemment comme indispensable à la totale activation de l'activité E3 ligase de MDM2 via une interaction intramoléculaire (**459**). En effet, le domaine RING-finger conférant l'activité ligase à MDM2 est replié sur le domaine acide pour être actif. Ces données suggèrent que dans les conditions basales, MDM2 est en conformation dite "fermée" et ainsi le domaine acide de MDM2 est relié au domaine RING et accessible aux protéines qui vont induire les modifications post-traductionnelles qui restreignent MDM2 à ses actions principales d'E3 ligase nucléaire et cytoplasmique. Par contre lors de stress cellulaires comme une augmentation de ROS, MDM2 adopte une conformation dite "ouverte" où le domaine RING ne peut plus interagir avec le domaine acide. Cette conformation "ouverte" fait apparaître un domaine de liaison reconnu par ATF4, ainsi que certains sites de phosphorylation afin de moduler la localisation subcellulaire de MDM2 (**Figure 35**). L'ensemble des mécanismes qui contrôlent ce passage de la conformation "ouverte" à la conformation "fermée" n'est pas encore très bien connu. L'utilisation du mutant Δ AD fait un parfait outil qui pourrait nous servir à mettre en évidence toutes les fonctions de MDM2 à la chromatine en attendant de mieux comprendre les mécanismes qui régulent la conformation de la protéine endogène en conditions normales et pathologiques.

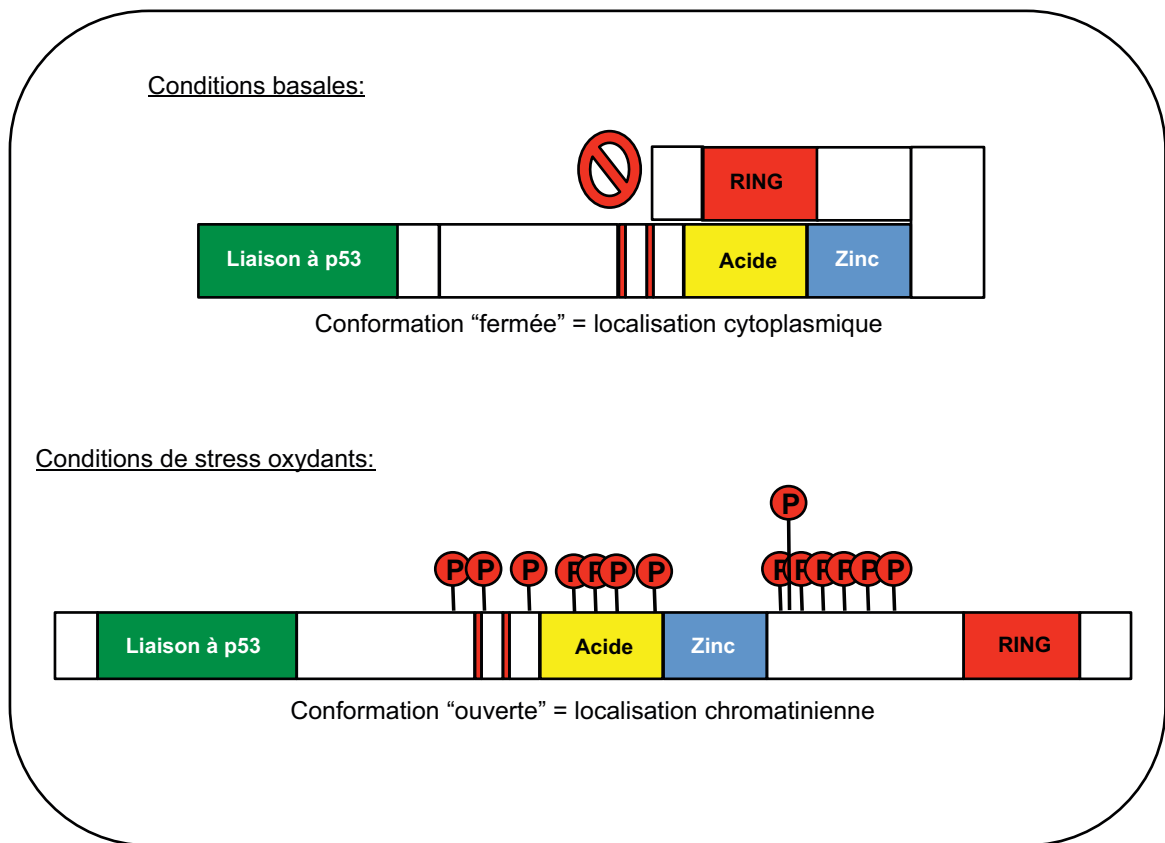


Figure 35: Le repliement de MDM2

Schéma d'un potentiel changement de conformation qui s'opère lors de stress oxydants. Cette conformation dite "fermée" bloque l'accès aux protéines ciblant la région autour du domaine central acide de MDM2 et lui permet de relocaliser à la chromatine.

3) Quelles kinases candidates pour la régulation allostérique de MDM2 ?

Des contrôles allostériques positifs et négatifs sont souvent utilisés pour réguler les voies métaboliques. En effet la pyruvate kinase intervient lors de la dernière étape de la glycolyse en convertissant le phosphoénolpyruvate en pyruvate. Comme expliqué dans l'introduction, de part son activité enzymatique modulable, l'inactivation de PKM2 induit une accumulation des intermédiaires glycolytiques qui seront alors redirigés vers les voies anaboliques comme la voie des pentoses phosphates (PPP) et la voie de synthèse de la sérine (SSP). La conformation de PKM2 est contrôlée par des régulations allostériques. Parmi elles la sérine agit comme un activateur allostérique de PKM2. Lors de carence en sérine, PKM2 est majoritairement sous sa forme inactive et le flux glycolytique est alors redirigé vers la biosynthèse de la sérine afin de maintenir la prolifération cellulaire. Dans notre étude je montre que l'inactivation de PKM2 induit le recrutement de MDM2 à la chromatine en vu de rediriger le flux vers la biosynthèse de la sérine. Dans des conditions normales, MDM2 et PKM2 forment un complexe protéique entièrement cytoplasmique où PKM2 permet la séquestration dans le cytoplasme de MDM2. MDM2 est alors retrouvé phosphorylé sur les résidus S166 et T351 par un ou plusieurs acteurs de cette régulation pas encore identifiés. Ma première idée était de penser que le médiateur à l'origine de cette séquestration via phosphorylation était PKM2 lui même mais l'étude de l'équipe du docteur M.G. Vander Heiden montre qu'ils sont incapables de démontrer la phosphorylation de n'importe quelle protéine par PKM2 en utilisant comme donneur de phosphate soit le phosphoénolpyruvate (PEP) soit l'ATP suggérant que l'état phosphorylé

de MDM2 est PKM2 dépendant mais pas orchestré directement par celui-ci. Nos résultats de phospho protéomique mettent en avant deux sites potentiels de phosphorylations sur MDM2 qui sont déjà connus comme des cibles potentielles de kinases connues. Pour la sérine 166, elle est connue pour être une cible de la protéine kinase AKT. Et pour la thréonine 351, MPS1 est une kinase activée en réponse à des stress tels que les stress oxydant ou dommages à l'ADN et pourrait être une candidate potentielle. Ces deux kinases avec l'aide de PKM2 pourraient participer à la séquestration de MDM2 dans le cytoplasme via double phosphorylation. En effet le mutant non phosphorylable de MDM2 (MDM2 S166A; T351A) est constitutivement localisé à la chromatine et l'utilisation d'inhibiteur de ces deux kinases identifiées comme candidates devraient nous permettre de valider cette hypothèse. Des études avaient déjà été faites avec des inhibiteurs d'AKT sans aucun succès. Sachant que ces deux phosphorylations sont critiques, la combinaison des inhibiteurs des deux kinases devrait donner meilleure satisfaction.

En plus de la sérine, une élévation des stress oxydant (ROS) a été décrite à l'origine de la régulation allostérique négative de PKM2. En effet les espèces réactives oxygénées (ROS) en abondance dans la cellule diminue l'activité de PKM2, afin de rediriger le flux métabolique vers la synthèse de la sérine et la voie des pentoses phosphates. Deux précurseurs de ces voies, la glycine et le NADPH, sont indispensables dans la biosynthèse du glutathion et lors de son turn-over. Une augmentation des ROS dans la cellule au travers de l'utilisation de drogue pharmacologique induit une relocalisation de MDM2 à la chromatine pour induire une réponse antioxydante médiée par le glutathion. Nous savons que MDM2 peut avoir un impact direct au niveau de l'oxydation du glutathion et influence également la production de glutathion en partie à travers la synthèse de la sérine. Des études complémentaires sur les niveaux cellulaires de NADPH sont envisageables afin de savoir si MDM2 peut avoir également un impact sur la voie des pentoses phosphates.

De plus une étude récente place un régulateur clé dans la lutte antioxydante connu sous le nom de NRF2, au coeur de la régulation des gènes de la synthèse de la sérine. Cette réponse étant médiée par ATF4, il serait intéressant là aussi de voir si cette réponse NRF2 dépendante requiert MDM2 pour la régulation des gènes de la sérine.

Pris tous ensemble, ces résultats mettent en avant un réseau inattendu impliquant PKM2, MDM2 et les facteurs de transcription ATF dans la régulation d'un programme transcriptionnel complexe impliqué dans le métabolisme de la sérine et l'homéostasie redox.

4) Tous les stress ne mènent pas à la chromatine:

Les différentes drogues pro-oxydantes que j'ai utilisées dans cette étude, sont connues pour induire la formation de ROS différentes, et par là même, des dégâts cellulaires différents. De façon intéressante, nos travaux nous ont permis de montrer que MDM2 se retrouvait à la chromatine uniquement avec certaines drogues pro-oxydantes, suggérant que seuls certains types de ROS conduisent au recrutement de ce complexe à la chromatine. Des approches de résonances magnétiques nucléaires (RMN) pourraient permettre d'identifier la nature des ROS qui sont réellement impliqués dans ce mécanisme de régulation.

Il est intéressant de noter que le chlorure de cobalt, un agent mimant l'hypoxie, et également produisant des ROS est capable d'induire le recrutement de ce complexe à la chromatine. Mes travaux préliminaires à ce sujet montre que la fraction chromatinienne de cellules en hypoxies est plus enrichie en MDM2 que la fraction de cellules cultivées avec un niveau normal d'oxygène (20%) (**Figure 36**).

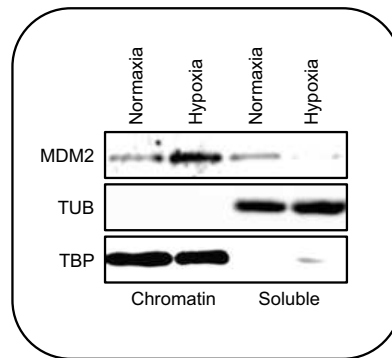


Figure 36: L'hypoxie relocalise MDM2 à la chromatine

Western blot montrant le niveau protéique de MDM2 en réponse à l'hypoxie. Ces données suggèrent qu'un stress hypoxique permet de relocaliser MDM2 à la chromatine.

De plus le cobalt a des effets connus sur la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie, entraînant la production accrue de ROS, créant alors un stress oxydatif (460, 461). Il est possible que ce soit au travers de la génération de ROS mitochondriaux que les sels de cobalt induisent le recrutement à la chromatine de MDM2, puisque nos résultats indiquent que le traitement au NAC de cellules traitées au chlorure de cobalt bloque le recrutement de MDM2 à la chromatine.

Enfin, dans la mesure où certaines drogues oxydatives qui n'induisent pas le recrutement de MDM2 à la chromatine, telle que le Paraquat, les ultraviolet (UV) ou les radiations ionisantes (IR) produisent des ROS, je n'exclus pas la possibilité que suivant les différentes espèces de ROS produites, elles ne sont pas toutes vectrices de ce phénotype.

5) Oncogènes et suppresseurs de tumeur en première ligne des dérégulations du métabolisme cellulaire:

L'importance du métabolisme dans le cancer a ravivé l'enthousiasme pour l'étude du contrôle de ces voies métaboliques, révélant quelques contributions intéressantes d'oncogènes et de suppresseurs de tumeur bien connus. En effet la réduction de la dépendance à la phosphorylation oxydative pour subvenir à la production d'énergie n'est généralement pas due à un défaut du cycle de Krebs ou de la chaîne de transport des électrons mais plutôt à la capacité des protéines oncogéniques à promouvoir la glycolyse. Elles incluent AKT, MYC, HIF mais aussi des suppresseurs de tumeur comme PTEN, TSC2, LKB1, TP53.

Ce remodelage métabolique semble être une étape clé dans la mise en place du cancer, et comprendre les mécanismes qui y contribuent sera crucial dans le développement de nouveaux traitements contre cette maladie.

Lorsque les nutriments sont abondants, les voies oncogéniques augmentent leur acquisition avec pour but de récupérer des carbones qui serviront à la biosynthèse de macromolécules indispensables pour la croissance cellulaire et la prolifération. Cependant, afin de résister au rude environnement des tumeurs solides, les cellules cancéreuses doivent optimiser l'utilisation de ces nutriments pour ne pas les gaspiller et les avoir à disposition lorsque les ressources se feront rares.

C'est dans ces situations de manque en nutriment que les cellules s'adaptent notamment en jouant sur les oncogènes et les suppresseurs de tumeurs. Parmi les gènes les plus

souvent dérégulés dans les processus cancéreux, celui qui arrive en tête de liste est le gène *TRp53* codant pour le suppresseur de tumeur p53. Comme rapporté dans l'introduction p53 régule des programmes transcriptionnels impliqués dans des mécanismes de réponses cellulaires aux stress. Cependant ce facteur de transcription est aussi impliqué dans des réponses adaptatives plus subtiles permettant à la cellule de s'adapter à son environnement en fonction des nutriments qui sont disponibles. En effet p53 intervient dans une multitude de voie métabolique via l'activation ou la répression de nombreux gènes clés du métabolisme impliqués dans la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, la phosphorylation oxydative, le métabolisme des lipides ou encore celui de certains acides aminés comme la glutamine ou la sérine.

Quant au possible rôle des régulateurs de p53 dans le métabolisme énergétique, leur étude suscite trop peu d'intérêt et c'est dans ce contexte que j'ai mis en évidence une nouvelle fonction de l'oncogène MDM2, un des principaux régulateurs de p53, dans le remodelage métabolique permettant aux cellules cancéreuses de survivre lors d'une carence en acide aminé (sérine et glycine) ou une forte exposition à un stress oxydant (augmentation des niveaux de ROS cellulaire).

Des études récentes ont pu associer p53 à la capacité des cellules cancéreuses à répondre à la carence en sérine. Les fonctions propres à p53 en l'absence de sérine exogène passent par la régulation de la voie de synthèse des nucléotides en redirigeant le flux via un de ses gènes cibles *p21* vers la voie de synthèse du glutathion, acteur majeur de la défense anti oxydante. En d'autres termes, p53 aide les cellules cancéreuses à surmonter une absence de sérine en préservant leur capacité antioxydante au détriment de la synthèse de nucléotides. Les cellules qui n'ont plus p53 sont incapables de répondre à cette carence en sérine, entraînant un stress oxydant majeur qui conduit à réduire la viabilité des cellules et de diminuer fortement leur prolifération. Ces travaux ouvrent la voie vers une nouvelle approche thérapeutique où un régime alimentaire pauvre en sérine serait un bon complément chez les patients qui ont des tumeurs arborant des statuts altérés pour p53. Pour l'instant ces régimes semblent encourageant en laboratoire chez les souris nues notamment dans le ralentissement de la croissance tumorale mais qu'en est il chez les patients, où ce type d'approche pourrait être tester afin de limiter les récives ?

Comme rapporté précédemment, en plus des fonctions propres à p53 dans cette réponse, le rétrocontrôle connu qu'exerce p53 sur un autre de ses gènes cibles *Mdm2*, tend à impacté négativement le niveau protéique de MDM2 en l'absence de p53. Ainsi cette diminution de MDM2 pourrait avoir une part de responsabilité dans cette sensibilité à la carence en sérine. C'est dans cette optique que mes résultats montrent que la déplétion concomitante de *Mdm2* et de l'apport exogène de sérine, accroît la sensibilité des cellules cancéreuses à la carence en sérine. Plaçant MDM2 comme un régulateur majeur dans la survie des cellules cancéreuses en absence de sérine indépendamment de p53. La présence de MDM2 à la chromatine qui s'opère lors de cette carence en sérine permet de maintenir un pool de sérine cellulaire suffisant pour les besoins de survie des cellules. Ces données suggèrent alors qu'en l'absence de p53, un acteur majeur de sa cascade de signalisation est capable de prendre le relais afin de maintenir l'homéostasie cellulaire nécessaire à la survie des cellules cancéreuses lors de stress type carence en nutriment.

Il est important de noter que si nos résultats montrent clairement que le complexe associé avec MDM2 à la chromatine se forme de manière indépendante de p53, cela ne signifie pas que ce complexe n'influe pas *in fine* sur l'activité de p53, ni même que p53 puisse s'y associer et en moduler les fonctions. Ces notions ouvrent de nombreuses perspectives quant à la régulation du métabolisme cellulaire et plus particulièrement celui de la sérine par le couple MDM2/p53.

6) Les voies non étudiées régulées par MDM2:

Lors de notre étude génomique à grande échelle combinant les technologies de profilage d'expression de gènes par microarray et de séquençage à haut débit basé sur une immunoprécipitation de chromatine (ChIP seq), nous avons pu mettre en évidence l'ensemble des gènes potentiellement cibles de MDM2. L'analyse bioinformatique qui a suivie a permis de regrouper l'ensemble des gènes cibles de MDM2 dans différents processus biologiques et cellulaires. L'objet de notre étude a été de montrer que MDM2 régulait un panel de gènes impliqués dans le métabolisme de la sérine et la régulation de l'homéostasie rédox, processus majoritairement dérégulés dans nos analyses. Mais ces analyses ont fait émerger d'autres voies métaboliques que nous n'avons pas exploitées et qui pourraient dans un futur proche servir de nouvel axe de recherche au sein du laboratoire. Au delà des effets métaboliques, d'autres pistes sont à explorer quant au rôle de MDM2 à la chromatine comme, la motilité cellulaire ainsi que la régulation du cytosquelette.

En tant qu'oncogène jouant sur la tumorigenèse il n'est pas étonnant de voir un groupe de gènes régulés par MDM2 impliqués dans la motilité cellulaire. De plus il a été montré par de nombreuses études cliniques que l'amplification de MDM2 corrèle souvent avec un stade métastatique de la tumeur plutôt qu'un stade primaire (462, 463). D'autres études ont mis en évidence que MDM2 était capable d'interagir avec l'E-cadhérine et de promouvoir son ubiquitinylation et sa dégradation. Ainsi MDM2 joue un rôle dans la perte de contact entre les cellules augmentant la motilité cellulaire et le potentiel d'invasion des cellules cancéreuses (464). Ces données suggèrent alors que MDM2 est un acteur important dans la motilité cellulaire et que d'étudier le groupe de gènes cibles de MDM2 impliqué dans cette voie devrait à terme permettre de mieux cibler les fonctions de MDM2 dans les métastases tumorales afin de mettre en place de nouvelles approches dans le traitement des cancers.

La régulation du cytosquelette s'insère aussi dans cette dynamique car les cytosquelettes d'actine et de tubuline participent aux processus d'acquisition de caractéristiques inappropriées en terme de motilité, migration et invasion à l'origine de la progression de la maladie. Donc étudier le rôle de MDM2 sur les gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette pourrait aider à mieux comprendre les fonctions de MDM2 lors de ce processus indispensable à la tumorigenèse.

7) MDM2 régulateur dans la course aux nutriments:

On a pu montrer dans notre étude via des approches de fluxomique, utilisant comme source le glucose radiomarqué, que la biosynthèse de sérine en absence de MDM2 était impactée. En plus du glucose, la glutamine est une alternative comme précurseur des voies bioénergétiques qui alimentent le cycle de Krebs en fournissant de l' α -kétoglutarate à partir du glutamate par la glutaminolyse. Il est important de noter ici que cette voie métabolique est présente dans notre analyse génomique et pourrait elle aussi être un champ d'étude prépondérant dans le rôle de l'axe MDM2/p53 dans la flexibilité métabolique des cellules cancéreuses.

De plus l'enzyme PSAT1 dont l'expression est régulée par MDM2 a besoin de glutamate comme cofacteur afin de synthétiser de la phosphosérine et de l' α -kétoglutarate. L' α -kétoglutarate est un intermédiaire anaplérotique du cycle de Krebs et il participe au maintien du métabolisme cancéreux. C'est à travers ce mécanisme que la biosynthèse *de novo* de sérine contribue à l'obtention d'intermédiaires majeurs du cycle de Krebs. La redirection du flux vers cette voie anabolique est favorisée par une faible entrée du

pyruvate dans la mitochondrie. Ainsi notre modèle où la redirection du flux vers la biosynthèse de sérine médiée par la relocalisation de MDM2 à la chromatine, participe à la génération d'intermédiaires anaplérotiques du cycle de Krebs dans l'unique but de faire toujours plus de biomasse. Mes résultats préliminaires montrent qu'en absence de glutamine dans le milieu de culture, le niveau protéique de MDM2 est dramatiquement diminué comparé à un milieu complet (**Figure 37**). Régulation négative de MDM2 qui s'opère probablement pour empêcher la redirection du flux vers les voies anaboliques afin d'alimenter le cycle de Krebs au travers de la dégradation du glucose en pyruvate.

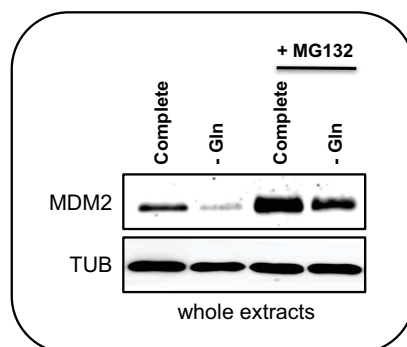


Figure 37: L'absence de glutamine joue sur la stabilité de MDM2

Western blot montrant le niveau protéique de MDM2 en réponse à la carence en glutamine. L'utilisation du MG132 (inhibiteur du protéasome) révèle que l'absence de glutamine n'induit pas la dégradation de MDM2 mais bloque son expression.

Encore une parfaite illustration quant à l'adaptation des cellules cancéreuses qui sont capables d'utiliser les ressources disponibles pour continuer à se diviser et survivre. Nous avons des études de fluxomique en cours avec du glucose et de la glutamine ^{13}C afin d'étudier qu'elle est la contribution du glucose et de la glutamine dans les différentes voies métaboliques dépendantes de MDM2. L'idée de ce travail est d'élaborer une carte sur la régulation du flux métabolique par MDM2 dans les lignées cellulaires d'intérêts (**Figure 38**).

essentiel pour l'activation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse de la sérine traduisant un état de chromatine active.

De plus ATF4 est nécessaire et indispensable pour le recrutement de MDM2 à la chromatine au même titre qu'il est requis pour l'activation de la voie régulée par G9A et KDM4C. Renforçant l'idée d'un complexe composé d'ATF4, MDM2, G9A et KDM4C à l'origine du maintien du métabolisme de la sérine pour la survie et la prolifération des cellules cancéreuses en réponse à des conditions extrêmes comme une carence en nutriments essentiels tel que la sérine.

Pour finir, Il est important de noter que KDM4C est déjà connu pour interagir avec le promoteur de *Mdm2* favorisant son expression, cependant dans nos conditions nous ne sommes pas encore parvenu à montrer si les deux protéines endogènes étaient capable d'interagir.

Ces différentes données tendent à penser que MDM2 pourrait jouer le rôle de régulateur transcriptionnel via l'interaction avec des protéines importantes dans l'établissement de marques épigénétiques en vu de réguler ses gènes cibles.

9) MDM2 régulateur de la sérine: qu'en est il du métabolisme 1C ?

Une réaction centrale dans l'interconnexion des voies métaboliques est la conversion de la sérine en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Cette réaction représente une source majeure de groupement méthyl utilisés dans le métabolisme un carbone (1C) requis pour la biosynthèse *de novo* de nucléotides et la méthylation des acides nucléiques. Un des évènements majeurs dans ce métabolisme 1C est la transformation du folate. Le cycle du folate est alimenté par cette conversion de sérine en glycine via la méthylation du tétrahydrofolate (THF). Ce cycle est ensuite couplé au cycle de la méthionine, cycle important au travers de la génération de S adénosylmethionine principal donneur de méthyl aux acides nucléiques.

Il est connu que la sérine est importante dans cette génération de SAM au travers de la synthèse d'ATP (de novo de purine). En l'absence de sérine, la synthèse des SAM à partir de la méthionine est fortement diminuée. On peut noter qu'on bloque l'incorporation de méthylation sur l'ADN et l'ARN au bout de 9h de carence. Phénotype complètement rétablit au bout de 33h, du fait que les cellules s'adaptent et augmentent la synthèse *de novo* de sérine (467)

Sachant que MDM2 est un régulateur clé de cette synthèse *de novo*, l'absence de celui-ci devrait bloquer cette reprise de la méthylation des acides nucléiques médiée par la synthèse *de novo* de sérine. Ainsi MDM2 pourrait être un acteur majeur dans la régulation de la mise en place des marques épigénétiques.

10) La relation entre MDM2 et ATF4:

Nos travaux montrent que MDM2 est localisé à la chromatine dans un complexe où l'on retrouve les facteurs de transcription ATF3 et ATF4. Les relations entre ATF3 et MDM2 sont connues et décrites dans l'introduction. Cependant dans un contexte indépendant de p53 et en réponse à certains stress cellulaires l'interaction entre MDM2 et ATF3 n'induit pas une dégradation d'ATF3 mais la relocalisation de ces deux protéines à la chromatine. La localisation de ce complexe à la chromatine est également dépendante de la présence d'ATF4. Nous avons pu montrer que MDM2 est aussi capable d'interagir avec ATF4 dans ces conditions. Cependant mes données préliminaires concernant ces deux nouveaux partenaires suggèrent qu'il existe une relation beaucoup plus complexe qu'une simple

interaction entre MDM2 et ATF4. En effet l'absence de l'un à une incidence négative sur l'autre et *vice et versa* (**Figure 39**). Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'établir exactement le lien entre ces deux protéines en absence de stress dans un contexte dépendant ou indépendant de p53. Connaissant le rôle de ces 3 acteurs dans la régulation de la biosynthèse de la sérine, la complexité de leur relation suggère une régulation très fine de cette voie. Il serait intéressant de déterminer par quelle fonction de MDM2 et donc quels domaines de MDM2 sont impliqués dans la stabilisation d'ATF4. On pourrait facilement imaginer que le domaine E3 ligase participe à cette stabilisation. L'utilisation du mutant C464A nous permettrait facilement de répondre à cette question.

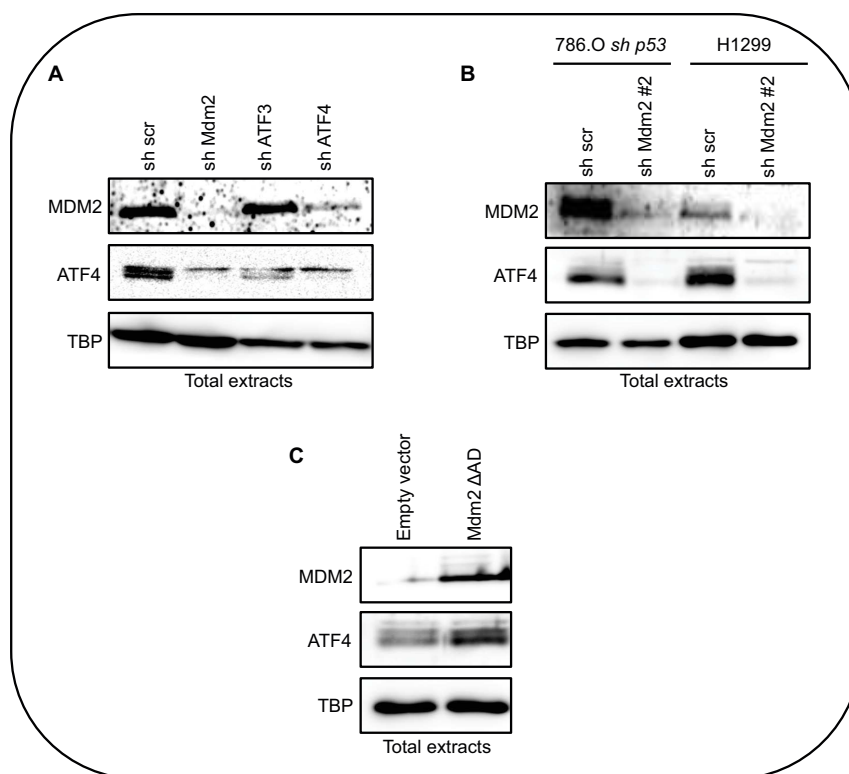


Figure 39: La boucle de régulation entre MDM2 et ATF4

A, Western blot montrant les niveaux protéiques endogènes de MDM2, ATF4 et TBP dans les cellules H1299 exprimant shARN-contrôle, -Mdm2, -Atf3- et -Atf4. B, Western blot montrant les niveaux protéiques endogènes de MDM2, ATF4 et TBP dans les cellules H1299 et 786.O shp53 exprimant shARN-contrôle et Mdm2. C, Western blot montrant les niveaux protéiques endogènes de MDM, ATF4 et TBP dans les cellules H1299 sur exprimant MDM2.

11) Relevance physiologique de cette relocalisation à la chromatine:

Des résultats récents du laboratoire suggèrent que MDM2 pourrait être impliqué dans la différenciation cellulaire, et plus particulièrement dans la différenciation adipocytaire. En effet, MDM2 est recruté à la chromatine au cours de la différenciation adipocytaire *in vitro* (**Figure 40**). Ce recrutement semble spécifique du lignage adipocytaire, puisque cette localisation n'est pas observée par exemple au cours de la différenciation kératinocytaire. Il est intéressant de noter que la différenciation du lignage adipocytaire *in vitro* implique la génération de ROS (**468**), et que celle-ci est bloquée par des chelateurs de ROS tel que le NAC (**469**). Ces données sont à mettre en perspective avec des travaux récents qui montrent que MDM2 est impliquée dans le contrôle transcriptionnel du gène C/EBPδ dans

l'initiation de l'adipogenèse par un mécanisme impliquant le facteur de transcription CREB et son co-activateur (Crtc2)/TORC2 (470).

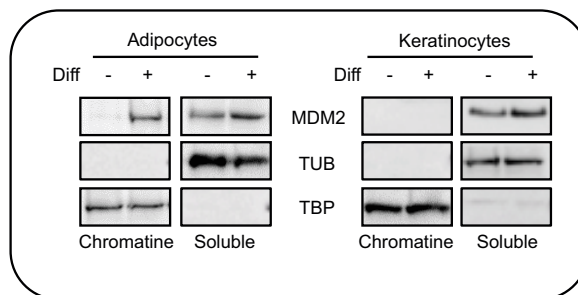


Figure 40: La différenciation adipocytaire relocalise MDM2 à la chromatine

Western blot illustrant le recrutement à la chromatine de MDM2 lors de l'induction de la différenciation adipocytaire dans la lignée cellulaire 3T3L1. A noter que cette relocalisation ne s'opère pas lors d'une différenciation kératinocytaire.

12) Le complexe MDM2/E4F1: une piste vers la régulation du flux métabolique

La mise en commun de plusieurs travaux du laboratoire suggère une possible explication quant à la redirection du flux médiée par MDM2 vers la biosynthèse de la sérine. En effet l'autre protéine majeure du laboratoire, E4F1, connue pour agir en tant que facteur de la survie dans les cellules cancéreuses a récemment été montrée comme régulateur de l'activité du complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) via la régulation transcriptionnelle d'un de ses composants; *Dlat*. L'absence d'E4F1 induit une reprogrammation métabolique qui conduit à la diminution de l'activité PDH et une redirection du flux glycolytique vers une production de lactate. Mes résultats préliminaires montrent que cette activité PDH est aussi partiellement régulée par MDM2 car une absence de celui ci conduit à une augmentation significative de cette activité. De plus une étude récente suggère que MDM2 est capable d'interagir avec un composant de ce complexe PDH, la dihydrolipoamide déshydrogénase (472). Si on prend en compte des résultats non publiés du laboratoire qui suggèrent que MDM2 et E4F1 sont capables d'interagir ensemble et de s'ubiquitinyler l'un l'autre à la chromatine, on peut imaginer que ces deux protéines sont ensemble à la chromatine d'une part sur les gènes cibles de MDM2 pour réguler le flux glycolytique vers la biosynthèse de la sérine et d'autre part sur les gènes cibles d'E4F1 pour réguler le flux glycolytique vers le cycle de Krebs (Figure 42).

Des études de ChIP en cours tentent de vérifier si ces deux protéines sont présentes sur les mêmes gènes pour les réguler. Des études complémentaires pour connaître leur état d'ubiquitinylation ou l'état des histones environnantes sont aussi à prévoir afin de comprendre quel est l'impact de la présence de ces deux protéines sur l'état d'activation de leurs gènes cibles. Ainsi comprendre les mécanismes complexes de l'interconnexion entre ces deux protéines pourrait aboutir à une meilleure compréhension de comment les cellules cancéreuses régulent les flux intracellulaires en réponses à des changements extérieurs qui contrôlent les besoins des cellules.

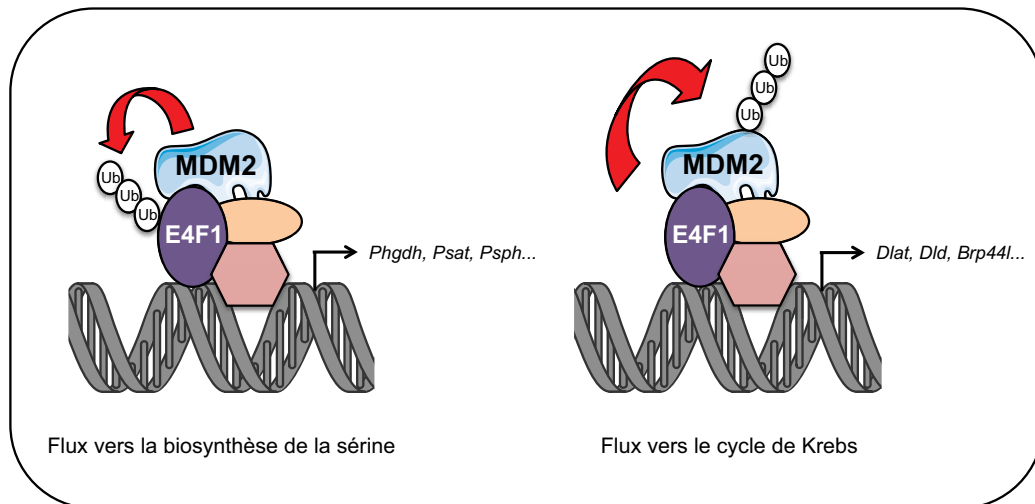


Figure 42: MDM2 et E4F1 co-régulateurs transcriptionnel.

Possible modèle décrivant l'interaction entre MDM2 et E4F1 dans un même complexe à la chromatine. D'une part l'ubiquitinylation de l'un entraîne le programme transcriptionnel de l'autre et inversement.

13) Autre localisation inattendue de MDM2: la mitochondrie

Durant ma thèse, en plus de cette localisation chromatinienne, j'ai pu montrer que MDM2 était aussi localisé à la mitochondrie. Cette observation a abouti à un travail en cours de finalisation réalisé par un post doctorant du laboratoire où il a démontré que cette fonction de MDM2 indépendante de p53 dans le métabolisme ne se restreint pas qu'à sa localisation chromatinienne mais qu'une fraction significative de MDM2 est localisée à la mitochondrie afin de contrôler l'activité de la chaîne de transport des électrons. En utilisant un mutant de MDM2 MTS (possédant un peptide de localisation mitochondriale), nous avons pu montrer que MDM2 joue sur la dynamique des mitochondries, leur ultrastructure ainsi que leur respiration. De plus notre analyse génomique à grande échelle sous entend que MDM2 interagit directement avec le génome mitochondrial, plus précisément avec les gènes NADH déshydrogénase (MT-NDs). Le rôle de MDM2 dans la régulation de la transcription et de la réplication du génome mitochondrial illustre une nouvelle fonction de MDM2 dans le métabolisme. Les deux mutants en notre possession nous permettront de mieux comprendre les différentes fonctions de MDM2. Le MDM2 Δ AD permettra de faire la lumière sur les fonctions chromatinienne alors que le MDM2 MTS sur les fonctions mitochondriales. Comment ces localisations inattendues sont régulées ou le rationnel de l'une par rapport à l'autre indépendamment ou en tandem, autant de questions en suspens qui devraient à terme nous permettre de mieux comprendre le rôle de MDM2 dans le métabolisme afin d'établir de nouvelles thérapies anti cancer.

14) Les perspectives cliniques :

Le shift métabolique des cellules cancéreuses peut être expliqué par les besoins bioénergétiques de celles-ci. En d'autres mots, la prolifération des cellules cancéreuses dépend de la capacité de ces cellules à synthétiser les acides nucléiques, lipides et protéines connus pour être les blocs de construction métaboliques requis pour faire de nouvelles cellules. Les besoins métaboliques des cellules cancéreuses nécessaire pour croître ne cessant pas d'augmenter, elles répondent à ces attentes en activant les voies de

la sérine et de la glycine, voies anaboliques qui ont pour origine des intermédiaires de la glycolyse. Basé sur ces observations les enzymes importantes pour la synthèse de novo de sérine comme PHGDH, PSAT, PSPH sont alors devenus des cibles thérapeutiques potentielles. PHGDH est connu pour être nécessaire à la progression de nombreux cancers comme le cancer du sein ou encore le mélanome.

Par exemple des études de métabolomiques utilisant des isotopes stables marqués ont permis de mettre en évidence que dans certaines cellules cancéreuses, une quantité non négligeable des carbones glycolytiques étaient dirigés vers le métabolisme de la sérine à travers la phosphoglycérate déshydrogénase, enzyme responsable de la première étape de conversion du 3 phosphoglycérate en sérine.

Il a été montré que les différences de niveau d'expression protéique de PHGDH dans trois lignées cellulaires (HEK293T, MCF-10A et H1299) correspondent avec les différences de quantité de sérine synthétisée à partir du glucose. Ceci montre qu'un moyen pour les tumeurs d'augmenter le flux vers la voie de synthèse de la sérine et donc in fine produire de la biomasse est de réguler cette activité PHGDH en amplifiant le nombre de copie du locus contenant le gène *Phgdh*. Ainsi certains cancers comme le cancer du sein ou encore les mélanomes arborent cette amplification génique qui leur donne un avantage prolifératif caractéristique de la progression tumorale. Une étude récente montre l'efficacité in vitro et in vivo d'un inhibiteur de PHGDH bloquant ainsi l'accès de la sérine au métabolisme 1C nécessaire pour la prolifération. D'autres travaux montrent que p53 réprime directement de nombreux gènes cibles de MDM2 identifiés dans notre étude incluant *Phgdh* et *Slc7a11*, illustrant le rôle complexe de la voie p53 dans ces voies métaboliques. Ces données confirment le rôle majeur de cette voie de biosynthèse de la sérine et que le fait de jouer sur ses régulateurs tendrait vers une approche thérapeutique pertinente en vu de soigner et prévenir le cancer.

Finalement, les implications cliniques de nos résultats sont soulignées par des analyses bioinformatiques montrant de manière significative le niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de la sérine incluant *Phgdh* et *Shmt2*, pour prédire la survie des patients atteints de cancer du poumon ou du sein.

Ainsi le métabolisme et ses différentes voies fournissent à nous chercheur un large et excitant terrain de chasse à explorer pour trouver des cibles thérapeutiques potentielles. Il y a de fortes évidences suggérant que les cellules tumorales dépendent des altérations de ce métabolisme pour leur croissance et leur survie et que ces changements métaboliques les rendent dépendante à la disponibilité de nutriments essentiels.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-74.
- (2) Levine AJ, Oren M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 749-58.
- (3) Soussi, T. and Bérout, C. (2001). Assessing *TP53* statut in humantumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 233-40.
- (4) Olivier, M., Hollstein, M. and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* a001008.
- (5) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentlly normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 356: 215-21.
- (6) Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A, Donehower LA. (1995). A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet*. 9: 305-11.
- (7) Lapenko, O. & Prives, C. (2006) Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ*. 13, 951–961.
- (8) Nordstrom W, Abrams JM. (2000). Guardian ancestry: fly p53 and damage-inducible apoptosis. *Cell Death Differ*. 7: 1035-8. Review.
- (9) Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. (2001). *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. 294: 591-5.
- (10) Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A. (2001). The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol*. 11: 1722-7.
- (11) Levine AJ, Hu W, Feng Z. (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 13:1027-36. Review.
- (12) Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., Hwang, P.M. (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312, 1650–1653.
- (13) Bensaad, K. Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H. (2006). TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107–120.

- (14) Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH. (2012). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 493: 542-6.
- (15) Ou Y, Wang SJ, Jiang L, Zheng B, Gu W. (2014). p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation. *Biol Chem*. 290:457-66.
- (16) Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 14, 121–134.
- (17) Gatz, S. A. & Wiesmuller, L. (2006). p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ*. 13, 1003–1016.
- (18) Bensaad, K. & Vousden, K. H. (2005). Savior and slayer: the two faces of p53. *Nature Med*. 11, 1278–1279.
- (19) Roger, L., Gadea, G. & Roux, P. (2006). Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol. Cell* 98, 141–152.
- (20) Kortleverm, R. M., Higgins, P. J. & Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nature Cell Biol*. 8, 877–884.
- (21) Toeodoro, J. G., Parker, A. E., Zhu, X. & Green, M. R. (2006). p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 313, 968–971.
- (22) Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P. & Bourdon, J. C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*. 13, 962–972.
- (23) Kruse, J.P., Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-22.
- (24) Brooks, C. L. & Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* 21, 307–315.
- (25) Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- (26) Leng, R. P. et al. (2003). Pirh2, a p53-induced ubiquitinprotein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* 112, 779–791.
- (27) Dornan, D. et al. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429, 86–92.
- (28) Yang, W. et al. (2007). CARPs are ubiquitin ligases that promote MDM2-independent p53 and phosphop53ser20 degradation. *J. Biol. Chem*. 282, 3273–3281.
- (29) Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J. and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a

critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 121, 1071-1083.

(30) Le Cam, L., Linares, L.K., Paul, C., Julien, E., Lacroix, M., Hatchi, E., Triboulet R., Bossis, G., Shmueli, A., Rodriguez, M.S., Coux, O., Sardet, C. (2006). E4F1 is an atypical ubiquitin ligase that modulates p53 effector functions independently of degradation. *Cell*, 127, 775-88.

(31) Gu, B., Zhu, W.G. (2012) Surf the post-translational modification network of p53 regulation. *Int J Biol Sci.* 8, 672-84.

(32) Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM (2006). p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312: 1650–1653.

(33) Vahsen N, Cande C, Briere JJ, Benit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V. (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 23: 4679–4689.

(34) Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, Rotter V. (2006). Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ.* 13: 2140–2149.

(35) Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 7455–7460.

(36) Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107: 7461–7466.

(37) Contractor T, Harris CR. (2012). p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res.* 72: 560–567.

(38) Achanta G, Sasaki R, Feng L, Carew JS, Lu W, Pelicano H, Keating MJ, Huang P. Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol gamma. *EMBO J.* 24: 3482–3492.

(39) Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* 64: 2627–2633.

(40) Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol.* 10: 611–618.

(41) Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, Martinez D, Carnero A, Beach D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* 65: 177–185.

(42) Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell.* 126: 107–120.

- (43) Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol.* 13: 310–316.
- (44) Ou Y, Wang SJ, Jiang L, Zheng B, Gu W. (2015). p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation. *J Biol Chem.* 290: 457-66.
- (45) Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 9: 550–562.
- (46) Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 6: 184–192.
- (47) Feng Z. (2010). p53 Regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: 001057.
- (48) Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. (2006). Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev.* 20: 267–275.
- (49) Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, Benchimol S, Mak TW. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell.* 8: 317–325.
- (50) Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky A, Jin S, Lowe S, Levine AJ. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67: 3043–3053.
- (51) Budanov AV, Karin M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell.* 134: 451–460.
- (52) Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 8204–8209.
- (53) Ide T, Brown-Endres L, Chu K, Ongusaha PP, Ohtsuka T, El-Deiry WS, Aaronson SA, Lee SW. (2006). GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Mol Cell.* 36: 379–392.
- (54) Assaily W, Rubinger DA, Wheaton K, Lin Y, Ma W, Xuan W, Brown-Endres L, Tsuchihara K, Mak TW, Benchimol S. (2011). ROS-mediated p53 induction of Lpin1 regulates fatty acid oxidation in response to nutritional stress. *Mol Cell.* 44: 491–501.
- (55) Finck BN, Gropler MC, Chen Z, Leone TC, Croce MA, Harris TE, Lawrence JC Jr, Kelly DP. (2006). Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell Metab.* 4: 199–210.
- (56) Phan J, Reue K. (2005). Lipin, a lipodystrophy and obesity gene. *Cell Metab.* 1: 73–83.

- (57) Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. (1999). Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem.* 274: 12061–12066.
- (58) Yoon KA, Nakamura Y, Arakawa H. (2004). Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *J HumGenet.* 49: 134–140.
- (59) Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D, Zhang DD. (2009). Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell.* 34: 663–673.
- (60) Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL. (1987). Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat Cell Mol Genet.* 13, 235-44.
- (61) Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69, 1237 – 1245.
- (62) Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358, 80 – 83.
- (63) Toledo, F., Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer* 6, 909–923.
- (64) Bond, G.L., et al. (2006). MDM2 SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res.* 66, 5104–5110.
- (65) Araki, S., et al., (2010). TGF-beta1-induced expression of human MDM2 correlates with late-stage metastatic breast cancer. *J. Clin. Invest.* 120, 290–302.
- (66) Conyers, R., S. Young, and D.M. Thomas. (2011). Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. *Sarcoma* 483154.10.1155.
- (67) Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D., Levine, A.J. (1993). The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 11623–11627.
- (68) Saucedo, L. J., Myers, C. D., and Perry, M. E. (1999). Multiple murine double minute gene 2 (MDM2) proteins are induced by ultraviolet light. *J. Biol. Chem.* 274, 8161 – 8168.
- (69) Olson, D. C., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., and Levine, A. J. (1993). Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene.* 8, 2353 – 2360.
- (70) Naski N, Gajjar M, Bourougaa K, Malbert-Colas L, Fahraeus R, Candeias MM. (2009). The p53 mRNA-Mdm2 interaction. *Cell Cycle.* 8: 31-34.
- (71) Bartel, F., Taubert, H., and Harris, L. C. (2002). Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer. *Cancer Cell.* 2, 9 – 15.

- (72) Dang, J., Kuo, M. L., Eischen, C. M., Stepanova, L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2002). The RING domain of Mdm2 can inhibit cell proliferation. *Cancer Res.* 62, 1222 – 1230.
- (73) Zheng T, Wang J, Zhao Y, Zhang C, Lin M, Wang X, Yu H, Liu L, Feng Z, Hu W. (2013). Spliced MDM2 isoforms promote mutant p53 accumulation and gain-of-function in tumorigenesis. *Nat Commun.* 4: 2996.
- (74) Freedman, D. A. and Levine, A. J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7288 – 7293.
- (75) Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., and Levine, A. J. (1998). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 17: 554 – 564.
- (76) Lohrum, M. A., Ashcroft, M., Kubbutat, M. H., and Vousden, K. H. (2000). Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat. Cell Biol.* 2, 179 – 181.
- (77) Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C., Levine, A.J. (1994). The ribosomal protein L5 is associated with mdm-2 and mdm2-p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7414-20.
- (78) Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell.* 3, 577 – 587
- (79) Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7669-7680.
- (80) Argentini, M., Barboule, N., and Wasylyk, B. (2001). The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene.* 20, 1267 – 1275.
- (81) Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M. A., and Wani, A. (2001). Mdm2 mutant defective in binding p300 promotes ubiquitination but not degradation of p53: evidence for the role of p300 in integrating ubiquitination and proteolysis. *J. Biol. Chem.* 276, 29695 – 29701.
- (82) Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 8292 – 8297.
- (83) Honda, R. and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* 18, 22 – 27.
- (84) Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 92, 725 – 734.
- (85). Cross B, Chen L, Cheng Q, Li B, Yuan ZM, Chen J. (2011). Inhibition of p53 DNA

- binding function by the MDM2 protein acidic domain. *J Biol Chem.* 286: 16018-29.
- (86) Cheng Q, Song T, Chen L, Chen J. (2014). Autoactivation of the MDM2 E3 ligase by intramolecular interaction. *Mol Cell Biol.* 34: 2800-10.
- (87) Chen, L., Li, C., Pan, Y. and Chen, J. (2005). Regulation of p53-MDMX interaction by casein kinase 1 alpha. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6509-6520.
- (88) Challen, C., et al. (2012). Recombinant human MDM2 oncoprotein shows sequence composition selectivity for binding to both RNA and DNA. *Int. J. Oncol.* 40, 851-859.
- (89) Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J. and George, D. L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189-38196.
- (90) Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. and Ohtsubo, M. (1999). Mdm2 interacts with MdmX through their RING finger. *FEBS Lett.* 447, 5-9.
- (91) Elenbaas, B., Dobbelstein, M., Roth, J., Shenk, T. and Levine, A.J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol. Med.* 2,439-451.
- (92) Linares LK, Scheffner M. (2003). The ubiquitin-protein ligase activity of Hdm2 is inhibited by nucleic acids. *FEBS Lett.* 554: 73-6.
- (93) Chen J, Marechal V and Levine A. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4107-4114.
- (94) Challen et al., 2012
- (95) Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Powell, D.J., Daskalogianni, C., Maslon, M.M., Naski, N., Bourougaa, K., Calvo, F., Fahraeus, R. (2008). p53 mRNA controls p53 activity by managing Mdm2 functions. *Nat. Cell. Biol.* 10, 1098-1105.
- (96) Gajjar, M., Candeias, M.M., Malbert-Colas, L., Mazars, A., Fujita, J., Olivares-Illana, V., Fåhraeus, R. (2012). The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. *Cancer Cell.* 21,25-35.
- (97) Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. et al. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* 10, 429-439.
- (98) Lee, J. C. and Peter, M. E. (2003). Regulation of apoptosis by ubiquitination. *Immunol. Rev.* 193, 39 - 47.
- (99) Yang, Y. and Yu, X. (2003). Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *FASEB J.* 17, 790 - 799.
- (100) Ikeda, F., Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO.* 9, 536-542.
- (101) Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G.,

- Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21, 921-926.
- (102) Walczak, H., Iwai, K., Dikic, I. (2012). Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains. *BMC Biol.* 10, 23.
- (103) Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19: 94 – 102.
- (104) Pickart, C.M., and Eddins, M.J. (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1695, 55–72.
- (105) Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69, 1237 – 1245.
- (106) Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387, 296 – 299.
- (107) Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420, 25 – 27.
- (108) Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature.* 387, 299 – 303.
- (109) Chavez-Reyes, A., Parant, J.M., Amelse, L.L., de Oca Luna, R.M., Korsmeyer, S.J., Lozano, G. (2003). Switching mechanisms of cell death in mdm2- and mdm4-null mice by deletion of p53 downstream target. *Cancer Res.* 63, 8664-8669.
- (110) Mendrysa, S.M., McElwee, M.K., Michalowski, J., O'Leary, K.A., Young, K.M., and Perry, M.E. (2003). Mdm2 is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 23: 462 – 472.
- (111) Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature.* 378: 203 – 206.
- (112) Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature.* 378: 206–208.
- (113) Moll, U. M. and Petrenko, O. (2003). The MDM2-p53 Interaction. *Mol. Cancer Res.* 1, 1001-1008.
- (114) Ringshausen, I., O'Shea, C.C., Finch, A.J., Swigart, L.B., Evan, G.I. (2006). Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell.* 10, 501-14.
- (115) Grier JD, Yan W, Lozano G. (2002). Conditional allele of mdm2 which encodes a p53 inhibitor. *Genesis.* 32: 145–147
- (116) Grier JD, Xiong S, Elizondo-Fraire AC, et al. (2006) Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol Cell Biol.* 26: 192–19

- (117) Hallenborg P, Feddersen S, Francoz S, Murano I, Sundekilde U, Petersen RK, Akimov V, Olson MV, Lozano G, Cinti S, Gjertsen BT, Madsen L, Marine JC, Blagojev B, Kristiansen K. Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 19: 1381-9.
- (118) Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *EMBO J.* 26: 923-34.
- (119) Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* 19: 94 – 102.
- (120) Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, Tagami H, Nakatani Y, Livingston DM. (2003). Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science.* 300: 342-4.
- (121) Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem.* 277: 50607-11.
- (122) Ganguli G, Wasylyk B. (2003). p53-independent functions of MDM2. *Mol. Cancer Res.* 1, 1027–1035.
- (123) Xiao, Z. X., Chen, J., Levine, A. J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W. R., and Livingston, D. M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature.* 375, 694 – 698.
- (124) Martin, K., Trouche, D., Hagemeyer, C., Sorensen, T. S., La Thangue, N. B., and Kouzarides, T. (1995). Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature.* 375, 691–694.
- (125) Zhang, Z., Wang, H., Li, M., Rayburn, E.R., Agrawal, S., and Zhang, R. (2005). Stabilization of E2F1 protein by MDM2 through the E2F1 ubiquitination pathway. *Oncogene.* 24, 7238–7247.
- (126) Robert Tuitou, Jo Richardson, Suchira Bose, Makoto Nakanishi, Jennifer Rivett, Martin J. Allday. (2001) A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α subunit of the 20S proteasome. *EMBO Journal.* 20, 2367-2375.
- (127) Zhang Z, Wang H, Li M, Agrawal S, Chen X, Zhang R. (2004). MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53. *J Biol Chem.* 279: 16000-6.
- (128) Wei, X., Yu, Z. K., Ramalingam, A., Grossman, S. R., Yu, J. H., Bloch, D. B., and Maki, C. G. (2003). Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J. Biol. Chem.* 278, 29288-29297.
- (129) Boyd MT, Vlatkovic N, Haines DS. (2000). A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2. *J Biol Chem.* 275: 31883-90.
- (130) Sun, P., Dong, P., Dai, K., Hannon, G. J., and Beach, D. (1998). p53-independent role of MDM2 in TGF- β 1 resistance. *Science.* 282, 2270–2272.
- (131) Mo P, Wang H, Lu H, Boyd DD, Yan C. (2010). MDM2 mediates ubiquitination and

degradation of activating transcription factor 3. *J Biol Chem.* 285: 26908-15.

(132) Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR. (1989). Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* 3: 2083-90.

(133) Chen BP, Wolfgang CD, Hai T. (1996). Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1157-68.

(134) Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E., Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expr.* 7, 321-35.

(135) Fu, W., Ma, Q., Chen, L., Li, P., Zhang, M., Ramamoorthy, S., Nawaz, Z., Shimojima, T., Wang, H., Yang, Y., Shen, Z., Zhang, Y., Zhang, X., Nicosia, S.V., Zhang, Y., Pledger, J.W., Chen, J., Bai, W. (2009). MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.* 284, 13987-4000.

(136) Brenkman, A.B., de Keizer, P.L., van den Broek, N.J., Jochemsen, A.G., Burgering, B.M. (2008). Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS One.* 3, e2819.

(137) Alkhalaf, M., Ganguli, G., Messaddeq, N., Le Meur, M., and Wasylyk, B. (1999). Mdm2 overexpression generates a skin phenotype in both wild type and p53 null mice. *Oncogene.* 18, 1419 – 1434.

(138) Fiddler, T. A., Smith, L., Tapscott, S. J., and Thayer, M. J. (1996). Amplification of MDM2 inhibits MyoD-mediated myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5048 – 5057.

(139) Juven-Gershon, T., Shifman, O., Unger, T., Elkeles, A., Haupt, Y., and Oren, M. (1998). The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3974 – 3982.

(140) Yogosawa, S., Miyauchi, Y., Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (2003). Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 869 – 872.

(141) Hallenborg, P., Feddersen, S., Francoz, S., Murano, I., Sundekilde, U., Petersen, R.K., Akimov, V., Olson, M.V., Lozano, G., Cinti, S., Gjertsen, B.T., Madsen, L., Marine, J.C., Blagoev, B., Kristiansen, K.. (2012) Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation. *Cell. Death Differ.* 19, 1381-9.

(142) Wienken M, Dickmanns A, Nemajerova A, Kramer D, Najafova Z, Weiss M, Karpiuk O, Kassem M, Zhang Y, Lozano G, Johnsen SA, Moll UM, Zhang X, Dobbelstein M. (2016). MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of p53. *Mol Cell.* 61: 68-83.

(143) Leveillard, T. and Wasylyk, B. (1997). The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 30651 – 30661.

(144) Gu, L., Findley, H. W., and Zhou, M. (2002). MDM2 induces NF- κ B/p65

- expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 99, 3367 – 3375.
- (145) Cheney, M.D., McKenzie, P.P., Volk, E.L., Fan, L., Harris, L.C. (2008). MDM2 displays differential activities dependent upon the activation status of NFkappaB. *Cancer Biol Ther*. 7, 38-44.
- (146) Vlatkovic, N., Guerrero, S., Li, Y., Linn, S., Haines, D. S., and Boyd, M. T. (2000). MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Res*. 28, 3581 – 3586.
- (147) Asahara, H., Li, Y., Fuss, J., Haines, D.S., Vlatkovic, N., Boyd, M.T., Linn, S. (2003). Stimulation of human DNA polymerase epsilon by MDM2. *Nucleic Acids Res*. 31, 2451-9.
- (148) Jung YS, Qian Y, Chen X. (2012). DNA polymerase eta is targeted by Mdm2 for polyubiquitination and proteasomal degradation in response to ultraviolet irradiation. *DNA Repair*. 11: 177-84.
- (149) Alt, J.R., Bouska, A., Fernandez, M.R., Cerny, R.L., Xiao, H., Eischen, C.M. (2005). Mdm2 binds to Nbs1 at sites of DNA damage and regulates double strand break repair. *J. Biol. Chem*. 280, 18771-81.
- (150) Stracker, T.H., Theunissen, J.W., Morales, M., Petrini, J.H. (2004). The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair*. 3, 845–54.
- (151) Lo, D., Lu, H. (2010). Nucleostemin: Another nucleolar "Twister" of the p53-MDM2 loop. *Cell Cycle*. 9, 3227-32.
- (152) Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C., Levine, A.J. (1994). The ribosomal protein L5 is associated with mdm-2 and mdm2-p53 complexes. *Mol. Cell. Biol*. 14, 7414-20.
- (153) Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*. 3, 577 – 587.
- (154) Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol. Cell. Biol*. 24, 7669-7680.
- (155) Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X., He, F. (2010). Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res*. 38, 6544-54.
- (156) Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X., Prives, C. (2009). Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol Cell*. 35, 316-26.
- (157) Nieminen, A.L., Qanungo, S., Schneider, E.A., Jiang BH, Agani FH. (2005). Mdm2 and HIF-1alpha interaction in tumor cells during hypoxia. *J. Cell Physiol*. 204, 364-9.
- (158) Zhao, Y., Chen, X.Q., Du, J.Z. (2009). Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 10, 404-10.

- (159) Fels, D.R., Koumenis, C. HIF-1 α and p53: the ODD couple? *TRENDS in Biochemical Sciences* 30, 426–429 (2005).
- (160) Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., and Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science*. 294, 1307–1313.
- (161) Brown, D.R., Thomas, C.A., Deb, S.P. (1998). The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: Elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis. *Embo J*. 17, 2513-25.
- (162) Zhou, R., Frum, R., Deb, S., Deb, S.P. (2005). The growth arrest function of the human oncoprotein mouse double minute-2 is disabled by downstream mutation in cancer cells. *Cancer Res*. 65, 1839-48.
- (163) Dilla, T., Velasco, J.A., Medina, D.L., Fernandez, Gonzalez-Palacios, J., Santisteban, P. (2000). The MDM2 oncoprotein promotes apoptosis in p53-deficient human medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrinology*. 141, 420-9.
- (164) Folberg-Blum, A., Sapir, A., Shilo, B.Z., Oren, M. 2002. Overexpression of mouse Mdm2 induces developmental phenotypes in Drosophila. *Oncogene*. 21: 2413-7.
- (165) Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, Shohet JM. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 731-6.
- (166) Zhang X, Zhang Z, Cheng J, Li M, Wang W, Xu W, Wang H, Zhang R. (2012). Transcription factor NFAT1 activates the mdm2 oncogene independent of p53. *J Biol Chem*. 287: 30468-76.
- (167) Zhou JX, Lee CH, Qi CF, Wang H, Naghashfar Z, Abbasi S, Morse HC 3rd. (2009). IFN regulatory factor 8 regulates MDM2 in germinal center B cells. *J Immunol*. 183: 3188-94.
- (168) Chang CJ, Freeman DJ, Wu H. (2004). PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem*. 279: 29841-8.
- (169) Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, Onel K, Yip L, Hwang SJ, Strong LC, Lozano G, Levine AJ. (2004). A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 119: 591-602.
- (170) Matsumoto R, Tada M, Nozaki M, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H. (1998). Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms. *Cancer Res*. 58: 609-13.
- (171) Zhang J, Sun Q, Zhang Z, Ge S, Han ZG and Chen WT. (2013). Loss of microRNA-143/145 disturbs cellular growth and apoptosis of human epithelial cancers by impairing the MDM2-p53 feedback loop. *Oncogene*. 32: 61–69.

- (172) Suh SS, Yoo JY, Nuovo GJ, Jeon YJ, Kim S, Lee TJ and Kim T. (2012). MicroRNAs/TP53 feedback circuitry in glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 5316–5321.
- (173) Xiao J, Lin H, Luo X and Wang Z. (2011). miR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress. *EMBO J*. 30: 524–532.
- (174) Dar AA, Majid S, Rittsteuer C, de Semir D, Bezrookove V, Tong S and Nosrati M. (2013). The role of miR-18b in MDM2-p53 pathway signaling and melanoma progression. *J Natl Cancer Inst*. 105: 433 – 442.
- (175) Hoffman Y, Bublik DR, Pilpel Y and Oren M. (2013). miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53. *Cell Death Differ*. 21: 302-9.
- (176) López I, Tournillon AS, Nylander K, Fåhraeus R. (2015). p53-mediated control of gene expression via mRNA translation during Endoplasmic Reticulum stress. *Cell Cycle*. 14: 3373-8.
- (177) Mayo, L.D., Turchi, J.J., and Berberich, S.J. (1997). Mdm2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res*. 57, 5013 – 5016.
- (178) Maya, R., Balass, M., Kim, S. T., Shkedy, D., Leal, J. F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M. B., Katzir, E., and Oren, M. (2001). ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*. 15, 1067 – 1077.
- (179) Lu X, Ma O, Nguyen TA, Jones SN, Oren M, Donehower LA. (2007). The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell*. 12: 342-54.
- (180) Yu E, Ahn YS, Jang SJ, Kim MJ, Yoon HS, Gong G, Choi J. (2007) Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 101: 269-78.
- (181) Goldberg Z, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y. (2002). Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation. *EMBO J*. 21: 3715-27.
- (182) Kulikov R, Boehme KA, Blattner C. (2005). Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol Cell Biol*. 25: 7170-80.
- (183) Inuzuka H, Tseng A, Gao D, Zhai B, Zhang Q, Shaik S, Wan L, Ang XL, Mock C, Yin H, Stommel JM, Gygi S, Lahav G, Asara J, Xiao ZX, Kaelin WG Jr, Harper JW, Wei W. (2010). Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell*. 18: 147-59.
- (184) Mayo, L. D. and Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 11598 – 11603.

- (185) Itahana, K. et al. (2007). Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation. *Cancer Cell*. 12, 355–366.
- (186) Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat. Cell Biol.* 9, 331-338.
- (187) Inuzuka, H., Tseng, A., Gao, D., Zhai, B., Zhang, Q., Shaik, S., Wan, L., Ang, X.L., Mock, C., Yin, H., Stommel, J.M., Gygi, S., Lahav, G., Asara, J., Xiao, Z.X., Kaelin, W.G., Jr., Harper, J.W., Wei, W. (2010). Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. *Cancer Cell*. 18, 147-159.
- (188) Wang, Z., Inuzuka, H., Zhong, J., Fukushima, H., Wan, L., Liu, P., and Wei, W. (2012). DNA damage-induced activation of ATM promotes β -TRCP-mediated Mdm2 ubiquitination and destruction. *Oncotarget*. 3:1026-35.
- (189) Song MS, Song SJ, Kim SY, Oh HJ, Lim DS. (2008). The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J*. 27: 1863-74.
- (190) Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 92, 725 – 734.
- (191) Li, L., Liao, J., Ruland, J., Mak, T. W., and Cohen, S. N. (2001). A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1619 – 1624.
- (192) Buschmann, T., Lerner, D., Lee, C-G., and Ronai, Z. (2001). The Mdm2 amino terminus is required for Mdm2 binding and SUMO-1 conjugation by the E2 SUMO-1 conjugating enzyme Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, 40389 – 40395.
- (193) Miyauchi, Y., Yogosawa, S., Honda, R., Nishida, T., and Yasuda, H. (2002). Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes. *J. Biol. Chem.* 277, 50131 – 50136.
- (194) Xirodimas, D.P., Chisholm, J., Desterro, J.M.S., Lane, D.P., and Hay, R.T. (2002). p14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2. *FEBS Lett.* 528, 207 – 211.
- (195) Kenji Tago, Susanna Chiocca, and Charles J. Sherr. (2005). Sumoylation induced by the Arf tumor suppressor: A p53-independent function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 7689–7694.
- (196) Buschmann, T., Lerner, D., Lee, C-G., and Ronai, Z. (2001). The Mdm2 amino terminus is required for Mdm2 binding and SUMO-1 conjugation by the E2 SUMO-1 conjugating enzyme Ubc9. *J. Biol. Chem.* 276, 40389 – 40395.
- (197) Dimitris P Xirodimas, Mark K Saville, Jean-Christophe Bourdon, Ronald T Hay,

David P Lane. (2004). Mdm2-Mediated NEDD8 Conjugation of p53 Inhibits Its Transcriptional Activity. *Cell*. 118, 83–97.

(198) Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 8292 – 8297.

(199) Honda, R. and Yasuda, H. (1999). Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*. 18, 22 – 27.

(200) Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*. 92, 725 – 734.

(201) Quelle, D. E., Zindy, F., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell*. 83, 993 – 1000.

(202) Tao, W. and Levine, A. J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 6937 – 6941.

(203) Weber, J. D., Taylor, L. J., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol*. 1, 20 – 26.

(204) Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., and Levine, A. J. (1998). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J*. 17, 554 – 564.

(205) Tao, W. and Levine, A. J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 6937 – 6941.

(206) Lohrum, M. A., Ludwig, R. L., Kubbutat, M. H., Hanlon, M., and Vousden, K. H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*. 3, 577 – 587.

(207) Chen, D., Li, M., Luo, J., and Gu, W. (2003). Direct interactions between HIF-1a and Mdm2 modulate p53 function. *J. Biol. Chem*. 278, 13595 – 13598.

(208) Lo, D., Lu, H. (2010). Nucleostemin: Another nucleolar "Twister" of the p53-MDM2 loop. *Cell Cycle*. 9, 3227-32.

(209) Mayo, L. D. and Donner, D. B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, 11598 – 11603.

(210) Nag S, Zhang X, Srivenugopal KS, Wang MH, Wang W, Zhang R. (2014). Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet? *Curr Med Chem*. 21: 553-74.

(211) Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, Zhang S, El-Deiry WS. (2014). Targeting

- tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. *Curr Drug Targets*. 15: 80-9.
- (212) Tovar C, Graves B, Packman K, Filipovic Z, Higgins B, Xia M, Tardell C, Garrido R, Lee E, Kolinsky K, To KH, Linn M, Podlaski F, Wovkulich P, Vu B, Vassilev LT. (2013). MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Res*. 73: 2587-97.
- (213) Ray-Coquard I, Blay JY, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, Heil F, Rueger R, Graves B, Ding M, Geho D, Middleton SA, Vassilev LT, Nichols GL, Bui BN. (2012). Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol*. 13: 1133-40.
- (214) Wang W, Qin JJ, Voruganti S, Srivenugopal KS, Nag S, Patil S, Sharma H, Wang MH, Wang H, Buolamwini JK, Zhang R. (2014). The pyrido[b]indole MDM2 inhibitor SP-141 exerts potent therapeutic effects in breast cancer models. *Nat Commun*. 5:5086.
- (215) Wang W, Qin JJ, Voruganti S, Wang MH, Sharma H, Patil S, Zhou J, Wang H, Mukhopadhyay D, Buolamwini JK, Zhang R. (2014). Identification of a new class of MDM2 inhibitor that inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors in mice. *Gastroenterology*. 147: 893-902.
- (216) ClinicalTrials.gov identifiers for RG7112: NCT00559533, NCT00623870, NCT01677780, NCT01164033, NCT01605526, NCT01143740, and NCT01635296.
- (217) Vu, B.; Wovkulich, P.; Pizzolato, G.; Lovey, A.; Ding, Q.; Jiang, N.; Liu, J.-J.; Zhao, C.; Glenn, K.; Wen, Y.; Tovar, C.; Packman, K.; Vassilev, L.; Graves, B. (2013). Discovery of RG7112: a small-molecule MDM2 inhibitor in clinical development. *ACS Med. Chem. Lett*. 4, 466– 469.
- (218) Ding, Q.; Zhang, Z.; Liu, J.-J.; Jiang, N.; Zhang, J.; Ross, T. M.; Chu, X.-J.; Bartkovitz, D.; Podlaski, F.; Janson, C.; Tovar, C.; Filipovic, Z. M.; Higgins, B.; Glenn, K.; Packman, K.; Vassilev, L. T.; Graves, B. (2013). Discovery of RG7388, a potent and selective p53–MDM2 inhibitor in clinical development *J. Med. Chem*. 56, 5979– 5983.
- (219) Siu, L. L.; Italiano, A.; Miller, W. H., Jr; Blay, J. Y.; Gietema, J. A.; Bang, Y. J.; Mileskin, L. R.; Hirte, H. W.; Reckner, M.; Higgins, B.; Jukofsky, L.; Blotner, S.; Zhi, J.; Middleton, S.; Nichols, G. L.; Chen, L. C. (2014). Phase 1 dose escalation, food effect, and biomarker study of RG7388, a more potent second-generation MDM2 antagonist, in patients (pts) with solid tumors. *J. Clin Oncol* 32: 2535.
- (220) ClinicalTrials.gov identifiers for MI-77301/SAR405838: NCT01636479 and NCT01985191
- (221) Wang, S.; Sun, W.; Zhao, Y.; McEachern, D.; Meaux, I.; Barrière, C.; Stuckey, J.; Meagher, J.; Bai, B.; Liu, L.; Hoffman-Luca, C. G.; Lu, J.; Shangary, S.; Yu, S. H.; Bernard, D.; Aguilar, A.; Dos-Santos, O.; Besret, L.; Guerif, S.; Pannier, P.; Gorge-Bernat, D.; Debussche, L. (2014). SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. *Cancer Res*. 74, 5855– 5865.

(222) ClinicalTrials.gov identifiers for AMG 232: NCT01723020 and NCT02016729.

(223) Sun, D.; Li, Z.; Rew, Y.; Gribble, M.; Bartberger, M. D.; Beck, H. P.; Canon, J.; Chen, A.; Chen, X.; Chow, D.; Deignan, J.; Duquette, J.; Eksterowicz, J.; Fisher, B.; Fox, B. M.; Fu, J.; Gonzalez, A. Z.; Gonzalez-Lopez De Turiso, F.; Houze, J. B.; Huang, X.; Jiang, M.; Jin, L.; Kayser, F.; Liu, J.; Lo, M.-C.; Long, A. M.; Lucas, B.; McGee, L. R.; McIntosh, J.; Mihalic, J.; Oliner, J. D.; Osgood, T.; Peterson, M. L.; Roveto, P.; Saiki, A. Y.; Shaffer, P.; Toteva, M.; Wang, Y.; Wang, Y. C.; Wortman, S.; Yakowec, P.; Yan, X.; Ye, Q.; Yu, D.; Yu, M.; Zhao, X.; Zhou, J.; Zhu, J.; Olson, S. H.; Medina, J. C. (2014). Discovery of AMG 232, a potent, selective, and orally bioavailable MDM2–p53 Inhibitor in clinical development. *J. Med. Chem.* 57, 1454–1472.

(224) Lucas, B. S.; Fisher, B.; McGee, L. R.; Olson, S. H.; Medina, J. C.; Cheung, E. (2012). An expeditious synthesis of the MDM2–p53 inhibitor AM-8553. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 12855– 12860.

(225) Parks, D. J.; LaFrance, L. V.; Calvo, R. R.; Milkiewicz, K. L.; Marugan, J. J.; Raboisson, P.; Schubert, C.; Koblisch, H. K.; Zhao, S.; Franks, C. F.; Lattanze, J.; Carver, T. E.; Cummings, M. D.; Maguire, D.; Grasberger, B. L.; Maroney, A. C.; Lu, T. (2006). Enhanced pharmacokinetic properties of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione antagonists of the HDM2-p53 protein-protein interaction through structure-based drug design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 3310– 3314.

(226) Grasberger, B. L.; Lu, T.; Schubert, C.; Parks, D. J.; Carver, T. E.; Koblisch, H. K.; Cummings, M. D.; LaFrance, L. V.; Milkiewicz, K. L.; Calvo, R. R.; Maguire, D.; Lattanze, J.; Franks, C. F.; Zhao, S.; Ramachandren, K.; Bylebyl, G. R.; Zhang, M.; Manthey, C. L.; Petrella, E. C.; Pantoliano, M. W.; Deckman, I. C.; Spurlino, J. C.; Maroney, A. C.; Tomczuk, B. E.; Molloy, C. J.; Bone, R. F. (2005). Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *J. Med. Chem.* 48, 909– 912.

(227) Shvarts, A., Steegenga, W. T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A. J. (1996). MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* 15, 5349-5357.

(228) Shvarts, A., Bazuine, M., Dekker, P., Ramos, Y. F., Steegenga, W. T., Merckx, G., van Ham, R. C., van der Houven van Oordt, W., van der Eb, A. J. and Jochemsen, A. G. (1997). Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics.* 43, 34-42.

(229) Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J. and George, D. L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189-38196.

(230) Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. and Ohtsubo, M. (1999). Mdm2 interacts with MdmX though their RING finger. *FEBS Lett.* 447, 5-9.

(231) Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A. G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z. M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their

functional inactivation of p53. *J. Biol. Chem.* 277: 19251 – 19254.

(232) Stad, R., Ramos, Y. F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 28039 – 28044.

(233) Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat. Cell Biol.* 9, 331-338.

(234) Badciong, J.C., and Haas, A.L. (2002). MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 277, 49668–49675.

(235) Wang, X., Wang, J., Jiang, X. (2011). MdmX protein is essential for Mdm2 protein-mediated p53 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* 286, 23725–23734.

(236) Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N. A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A. G., and Lozano, G. (2001). Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat. Genet.* 29, 92 – 95.

(237) Migliorini, D., Denchi, E. L., Danovi, D., Jochemsen, A., Capillo, M., Gobbi, A., Helin, K., Pelicci, P. G., and Marine, J. C. (2002). Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5527 – 5538.

(238) Finch, R. A., Donoviel, D. B., Potter, D., Shi, M., Fan, A., Freed, D. D., Wang, C. Y., Zambrowicz, B. P., Ramirez-Solis, R., Sands, A. T., and Zhang, N. (2002). Mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo. *Cancer Res.* 62, 3221 – 3225.

(239) Toledo, F., Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 909–923.

(240) Liang, M., et al. (2010). HDM4 is overexpressed in mantle cell lymphoma and its inhibition induces p21 expression and apoptosis. *Mod. Pathol.* 23, 381–391.

(241) Marine JC, Dyer MA, Jochemsen AG. (2007). MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci.* 120: 371-8.

(242) Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S, Zwolinska A, Haupt S, de Lange J, Yip D, Goydos J, Haigh JJ, Haupt Y, Larue L, Jochemsen A, Shi H, Moriceau G, Lo RS, Ghanem G, Shackleton M, Bernal F, Marine JC. (2012). MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med.* 18: 1239-47.

(243) Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A. G., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z. M. (2002). Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J. Biol. Chem.* 277 19251 – 19254.

(244) Linares, L.K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S., Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 12009-14.

- (245) Stad, R., Ramos, Y. F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 28039 – 28044.
- (246) Jackson, M. W. and Berberich, S. J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1001 – 1007.
- (247) Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. and Ohtsubo, M. (1999). Mdm2 interacts with MdmX through their RING finger. *FEBS Lett.* 447, 5-9.
- (248) Sharp, D. A., Kratowicz, S. A., Sank, M. J. and George, D. L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189-38196.
- (249) Stad, R., Ramos, Y. F., Little, N., Grivell, S., Attema, J., van Der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (2000). Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275, 28039 – 28044.
- (250) Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E. and Marine, J.C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 3232–3237.
- (251) Xiong, S., Van Pelt, C. S., Elizondo-Fraire, A. C., Liu, G. and Lozano, G. (2006). Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 3226-3231.
- (252) Francoz, S., Froment, P., Bogaerts, S., De Clercq, S., Maetens, M., Doumont, G., Bellefroid, E. and Marine, J.C. (2006). Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 3232–3237.
- (253) Grier, J. D., Xiong, S., Elizondo-Fraire, A. C., Parant, J. M. and Lozano, G. (2006). Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol. Cell. Biol.* 26, 192-198.
- (254) Boesten, L. S., Zadelaar, S. M., De Clercq, S., Francoz, S., van Nieuwkoop, A., Biessen, E. A., Hofmann, F., Feil, S., Feil, R., Jochemsen, A. G. (2006). Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. *Cell Death Differ.* 13, 927-934.
- (255) Dewaele M, Tabaglio T, Willekens K, Bezzi M, Teo SX, Low DH, Koh CM, Rambow F, Fiers M, Rogiers A, Radaelli E, Al-Haddawi M, Tan SY, Hermans E, Amant F, Yan H, Lakshmanan M, Koumar RC, Lim ST, Derheimer FA, Campbell RM, Bonday Z, Tergaonkar V, Shackleton M, Blattner C, Marine JC, Guccione E. (2016). Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth. *J Clin Invest.* 126: 68-84.
- (256) Warburg O, Wind F, Negelein E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *J*

Gen Physiol. 8: 519-30.

(257) Som P, Atkins HL, Bandoypadhyay D, Fowler JS, MacGregor RR, Matsui K, Oster ZH, Sacker DF, Shiue CY, Turner H, Wan CN, Wolf AP, Zabinski SV. (1980). A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection. *J Nucl Med.* 21: 670-5.

(258) Almuhaideb A, Papathanasiou N, Bomanji J. (2011) 18F-FDG PET/CT imaging in oncology. *Ann Saudi Med.* 31: 3-13.

(259) DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 7: 11-20.

(260) Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. (1956). *Science.* 124: 269-70.

(261) Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274: 1393-418.

(262) Lu, Y., Yi, Y., Liu, P., Wen, W., James, M., Wang, D., and You, M. (2007). Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis. *PLoS One.* 2: 1149.

(263) Altenberg, B. and Greulich, K.O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics.* 84: 1014-1020.

(264) Chunfang et al., 2014

(265) Tong, X., Zhao, F., and Thompson, C.B. (2009). The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr Opin Genet Dev.* 19: 32-37.

(266) Tian WN, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi QC, Tian X, Stanton RC. (1998). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J Biol Chem.* 273: 10609-17.

(267) Boros LG, Torday JS, Lim S, Bassilian S, Cascante M, Lee WN. (2000). Transforming growth factor beta2 promotes glucose carbon incorporation into nucleic acid ribose through the nonoxidative pentose cycle in lung epithelial carcinoma cells. *Cancer Res.* 60: 1183-5.

(268) Langbein, S., Zerilli, M., Zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., Grobholz, R., Willeke, F., Alken, P., Stassi, G., Schubert, P., and Coy, J.F. (2006). Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer.* 94: 578-585.

(269) Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P. (2005). Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab.* 51: 257-73.

(270) DeBerardinis RJ. (2011). Serine metabolism: some tumors take the road less traveled. *Cell Metab.* 14: 285-6.

- (271) Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 476: 346-50.
- (272) Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature*. 493: 542-6.
- (273) Lunt SY, Vander Heiden MG. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 27: 441-64.
- (274) Amelio I, Markert EK, Rufini A, Antonov AV, Sayan BS, Tucci P, Agostini M, Mineo TC, Levine AJ, Melino G. (2014). p73 regulates serine biosynthesis in cancer. *Oncogene*. 33: 5039-46.
- (275) Mazurek S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 43: 969-80.
- (276) Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, Thompson CB. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: 6904-9.
- (277) Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, Shane B. (1993). Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 268: 11910-6.
- (278) Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB, Mootha VK. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*. 336: 1040-4.
- (279) Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. (2010). Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab*. 12: 321-7.
- (280) Yang Y, Bedford MT. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 13: 37-50.
- (281) Maddocks OD, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. (2016). Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. *Mol Cell*. 61: 210-21.
- (282) DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7: 11-20.
- (283) Daidone F, Florio R, Rinaldo S, Contestabile R, di Salvo ML, Cutruzzolà F, Bossa F, Paiardini A. (2011). In silico and in vitro validation of serine hydroxymethyltransferase as a chemotherapeutic target of the antifolate drug pemetrexed. *Eur J Med Chem*. 46: 1616-21.
- (284) Vazquez, A., Tedeschi, P.M., and Bertino, J.R. (2013). Overexpression of the

- mitochondrial folate and glycine-serine pathway: a new determinant of methotrexate selectivity in tumors. *Cancer Res.* 73: 478-482.
- (285) DeBerardinis RJ. (2011). Serine metabolism: some tumors take the road less traveled. *Cell Metab.* 14: 285-6.
- (286) Pacold ME, Brimacombe KR, Chan SH, Rohde JM, Lewis CA, Swier LJ, Possemato R, Chen WW, Sullivan LB, Fiske BP, Cho S, Freinkman E, Birsoy K, Abu MR, Shaul YD, Liu CM, Zhou M, Koh MJ, Chung H, Davidson SM, Luengo A, Wang AQ, Xu X, Yasgar A, Liu L, Rai G, Westover KD, Heiden MG, Shen M, Gray NS, Boxer MB, Sabatini DM. (2016). A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nat Chem Biol.* 12: 656.
- (287) Mazurek S, Grimm H, Boschek CB, Vaupel P, Eigenbrodt E. (2002). Pyruvate kinase type M2: a crossroad in the tumor metabolome. *Br J Nutr.* 87 Suppl 1: S23-9.
- (288) Presek P, Glossmann H, Eigenbrodt E, Schoner W, Rübsamen H, Friis RR, Bauer H. (1980). Similarities between a phosphoprotein (pp60src)-associated protein kinase of Rous sarcoma virus and a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-independent protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase type M2. *Cancer Res.* 40: 1733-41.
- (289) Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R. (1992). Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Crit Rev Oncog.* 3: 91-115.
- (290) Mazurek S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 43: 969-80.
- (291) Imamura K, Tanaka T. (1982). Pyruvate kinase isozymes from rat. *Methods Enzymol.* 90: 150-65.
- (292) Cardenas JM, Dyson RD. (1978). Mammalian pyruvate kinase hybrid isozymes: tissue distribution and physiological significance. *J Exp Zool.* 204: 361-7.
- (293) Netzker R, Greiner E, Eigenbrodt E, Noguchi T, Tanaka T, Brand K. (1992). Cell cycle-associated expression of M2-type isozyme of pyruvate kinase in proliferating rat thymocytes. *J Biol Chem.* 267: 6421-4.
- (294) Takenaka M, Noguchi T, Sadahiro S, Hirai H, Yamada K, Matsuda T, Imai E, Tanaka T. (1991). Isolation and characterization of the human pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem.* 198: 101-6.
- (295) Clower CV, Chatterjee D, Wang Z, Cantley LC, Vander Heiden MG, Krainer AR. (2010). The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 1894-9.
- (296) Stammers DK, Muirhead H. (1977). Three-dimensional structure of cat muscle pyruvate kinase at 3-1 Å resolution. *J Mol Biol.* 112: 309-16.
- (297) Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure.* 6: 195-

(298) Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, Cheng SY. (1991). An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6-bisphosphate. *Biochemistry*. 30: 7105-11.

(299) Taylor CB, Bailey E. (1967). Activation of liver pyruvate kinase by fructose 1,6-diphosphate. *Biochem J*. 102: 32C-33C

(300) Vijayvargiya R, Schwark WS, Singhal RL. (1969). Pyruvate kinase: modulation by L -phenylalanine and L -alanine. *Can J Biochem*. 47: 895-8.

(301) Weber G. (1969). Inhibition of human brain pyruvate kinase and hexokinase by phenylalanine and phenylpyruvate: possible relevance to phenylketonuric brain damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 63: 1365-9.

(302) Morgan HP, O'Reilly FJ, Wear MA, O'Neill JR, Fothergill-Gilmore LA, Hupp T, Walkinshaw MD. (2013). M2 pyruvate kinase provides a mechanism for nutrient sensing and regulation of cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 5881-6.

(303) Schulz J, Sparmann G, Hofmann E. (1975). Alanine-mediated reversible inactivation of tumour pyruvate kinase caused by a tetramer-dimer transition. *FEBS Lett*. 50: 346-50.

(304) Sparmann G, Schulz J, Hofmann E. (1973). Effects of L-alanine and fructose (1,6-diphosphate) on pyruvate kinase from ehrlich ascites tumour cells. *FEBS Lett*. 36: 305-8.

(305) Chaneton B, Hillmann P, Zheng L, Martin AC, Maddocks OD, Chokkathukalam A, Coyle JE, Jankevics A, Holding FP, Vousden KH, Frezza C, O'Reilly M, Gottlieb E. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature*. 491: 458-62.

(306) Ashizawa K, McPhie P, Lin KH, Cheng SY. (1991). An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M2 by thyroid hormone and fructose 1, 6-bisphosphate. *Biochemistry*. 30: 7105-11.

(307) Keller KE, Tan IS, Lee YS. (2012). SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions. *Science*. 338: 1069-72.

(308) Anastasiou D, Yu Y, Israelsen WJ, Jiang JK, Boxer MB, Hong BS, Tempel W, Dimov S, Shen M, Jha A, Yang H, Mattaini KR, Metallo CM, Fiske BP, Courtney KD, Malstrom S, Khan TM, Kung C, Skoumbourdis AP, Veith H, Southall N, Walsh MJ, Brimacombe KR, Leister W, Lunt SY, Johnson ZR, Yen KE, Kunii K, Davidson SM, Christofk HR, Austin CP, Inglese J, Harris MH, Asara JM, Stephanopoulos G, Salituro FG, Jin S, Dang L, Auld DS, Park HW, Cantley LC, Thomas CJ, Vander Heiden MG. (2012). Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nat Chem Biol*. 8: 839-47.

(309) Kung C, Hixon J, Choe S, Marks K, Gross S, Murphy E, DeLaBarre B, Cianchetta G, Sethumadhavan S, Wang X, Yan S, Gao Y, Fang C, Wei W, Jiang F, Wang S, Qian K, Saunders J, Driggers E, Woo HK, Kunii K, Murray S, Yang H, Yen K, Liu W, Cantley LC, Vander Heiden MG, Su SM, Jin S, Salituro FG, Dang L. (2012). Small molecule activation

of PKM2 in cancer cells induces serine auxotrophy. *Chem Biol.* 19: 1187-98.

(310) Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature.* 452: 181-6.

(311) Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K, Dong S, Lonial S, Wang X, Chen GZ, Xie J, Gu TL, Polakiewicz RD, Roesel JL, Boggon TJ, Khuri FR, Gilliland DG, Cantley LC, Kaufman J, Chen J. (2009). Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal.* 2: 73.

(312) Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. (2012). Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell.* 45: 598-609.

(313) Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell.* 145: 732-44.

(314) Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature.* 480: 118-22.

(315) Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang JK, Shen M, Bellinger G, Sasaki AT, Locasale JW, Auld DS, Thomas CJ, Vander Heiden MG, Cantley LC. (2011). Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science.* 334: 1278-83.

(316) Cortés-Cros M, Hemmerlin C, Ferretti S, Zhang J, Gounarides JS, Yin H, Muller A, Haberkorn A, Chene P, Sellers WR, Hofmann F. (2013). M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 489-94.

(317) Keller KE, Doctor ZM, Dwyer ZW, Lee YS. (2014). SAICAR induces protein kinase activity of PKM2 that is necessary for sustained proliferative signaling of cancer cells. *Mol Cell.* 53: 700-9.

(318) Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. (2012). Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell.* 45: 598-609.

(319) Yang W, Xia Y, Hawke D, Li X, Liang J, Xing D, Aldape K, Hunter T, Alfred Yung WK, Lu Z. (2012). PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell.* 150: 685-96.

(320) Jiang Y, Li X, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, Xia Y, Aldape K, Wei C, Guo F, Chen Y, Lu Z. (2014). PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Mol Cell.* 53: 75-87.

(321) Jiang Y, Wang Y, Wang T, Hawke DH, Zheng Y, Li X, Zhou Q, Majumder S, Bi E, Liu DX, Huang S, Lu Z. (2014). PKM2 phosphorylates MLC2 and regulates cytokinesis of tumour cells. *Nat Commun.* 5: 5566.

(322) Hosios AM, Fiske BP, Gui DY, Vander Heiden MG. (2015). Lack of Evidence for PKM2 Protein Kinase Activity. *Mol Cell.* 59: 850-7.

- (323) Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, Semenza GL. (2011). Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell*. 145: 732-44.
- (324) Palsson-McDermott EM, Curtis AM, Goel G, Lauterbach MA, Sheedy FJ, Gleeson LE, van den Bosch MW, Quinn SR, Domingo-Fernandez R, Johnston DG, Jiang JK, Israelsen WJ, Keane J, Thomas C, Clish C, Vander Heiden M, Xavier RJ, O'Neill LA. (2015). Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metab*. 21: 65-80.
- (325) Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J. (2008). Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 40: 1043-54.
- (326) Mor I, Carlessi R, Ast T, Feinstein E, Kimchi A. (2012). Death-associated protein kinase increases glycolytic rate through binding and activation of pyruvate kinase. *Oncogene*. 31: 683-93.
- (327) Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W, Gao X, Aldape K, Lu Z. (2011). Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature*. 480: 118-22.
- (328) Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 2037-42.
- (329) Stern, R., Shuster, S., Neudecker, B.A., and Formby, B. (2002). Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*. 276: 24-31.
- (330) Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S.W., and Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 109: 3812-3819.
- (331) Gerlinger, M., Santos, C.R., Spencer-Dene, B., Martinez, P., Endesfelder, D., Burrell, R.A., Vetter, M., Jiang, M., Saunders, R.E., Kelly, G., Dykema, K., Rioux-Leclercq, N., Stamp, G., Patard, J.J., Larkin, J., Howell, M., and Swanton, C. (2012). Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *J Pathol*. 227: 146-156.
- (332) Porporato, P.E., Dhup, S., Dadhich, R.K., Copetti, T., and Sonveaux, P. (2011). Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*. 2: 49.
- (333) Sonveaux, P., Vegran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., Kelley, M.J., Gallez, B., Wahl, M.L., Feron, O., and Dewhirst, M.W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 118: 3930-3942.
- (334) Dhup, S., Dadhich, R.K., Porporato, P.E., and Sonveaux, P. (2012). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des*. 18: 1319-1330.

- (335) Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D.A., and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 8: 311-321.
- (336) DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 7: 11-20.
- (337) DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104: 19345-19350.
- (338) Griffiths, M. and Keast, D. (1990). The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens. *Immunol Cell Biol*. 68: 405-408.
- (339) Korotchkina, L.G. and Patel, M.S. (2001). Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 276: 37223-37229.
- (340) Board, M., Humm, S., and Newsholme, E.A. 1990. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J*. 265: 503-509.
- (341) Wise, D.R. and Thompson, C.B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem Sci*. 35: 427-433.
- (342) Lee, K.A.W., T.-Y. Hai, L. SivaRaman, B. Thimmappaya, H.C. Hurst, N.C. Jones, and M.R. Green. (1987). A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84: 8355-8359.
- (343) Montminy MR, Bilezikjian LM. (1987). Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328: 175-8.
- (344) Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U. (1999). ATF3 and stress responses. *Gene Expr*. 7: 321-35.
- (345) Lyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG, Scherer PE. (2003). Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*. 22: 6408-23.
- (346) Cho JW, Jeong YW, Kim KS, Oh JY, Park JC, Lee JC, Baek WK, Suh SI, Suh MH. (2001). p21(WAF1) is associated with CDK2 and CDK4 protein during HL-60 cell differentiation by TPA treatment. *Cell Prolif*. 34: 267-74.
- (347) Hai T. (2006). The ATF transcription factors in cellular adaptive responses. *Higher Education Press and Springer*. 322–333.;

- (348) Mo P, Wang H, Lu H, Boyd DD, Yan C. (2010). MDM2 mediates ubiquitination and degradation of activating transcription factor 3. *J Biol Chem.* 285: 26908-15.
- (349) Kool J, Hamdi M, Cornelissen-Steijger P, van der Eb AJ, Terleth C, van Dam H. (2003). Induction of ATF3 by ionizing radiation is mediated via a signaling pathway that includes ATM, Nibrin1, stress-induced MAPkinases and ATF-2. *Oncogene.* 22: 4235-42.
- (350) Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC. (2004). Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol.* 24: 1365-77.
- (351) Harper EG, Alvares SM, Carter WG. (2005). Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci.* 118: 3471-85.
- (352) Kang Y, Chen CR, Massagué J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* 11: 915-26.
- (353) Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Roach JC, Kennedy K, Hai T, Bolouri H, Aderem A. (2006). Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature.* 441: 173-8.
- (354) Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DD. (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J.* 24: 2425-35.
- (355) Hartman MG, Lu D, Kim ML, Kociba GJ, Shukri T, Buteau J, Wang X, Frankel WL, Guttridge D, Prentki M, Grey ST, Ron D, Hai T. (2004). Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis. *Mol Cell Biol.* 24: 5721-32.
- (356) Yan C, Lu D, Hai T, Boyd DD. (2005). Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO J.* 24: 2425-35.
- (357) Kang Y, Chen CR, Massagué J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* 11: 915-26.
- (358) Li HF, Cheng CF, Liao WJ, Lin H, Yang RB. (2010). ATF3-mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 21: 1003-13.
- (359) Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H. (2003). Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci.* 23: 5187-96.
- (360) Allan AL, Albanese C, Pestell RG, LaMarre J. (2001). Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes. *J Biol Chem.* 276: 27272-80.
- (361) Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan W, Zhao H, Zhu X, Mazzacurati L, Li X, Petrik KL, Fornace AJ Jr, Rajasekaran B, Zhan Q. (2002). ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and over-expression of ATF3 protein suppresses cells growth. *Oncogene.* 21: 7488-96.

- (362) Yan C, Boyd DD. (2006). ATF3 regulates the stability of p53: a link to cancer. *Cell Cycle*. 5: 926-9.
- (363) Ishiguro T, Nakajima M, Naito M, Muto T, Tsuruo T. (1996). Identification of genes differentially expressed in B16 murine melanoma sublines with different metastatic potentials. *Cancer Res*. 56: 875-9.
- (364) Bottone FG Jr, Moon Y, Kim JS, Alston-Mills B, Ishibashi M, Eling TE. (2005). The anti-invasive activity of cyclooxygenase inhibitors is regulated by the transcription factor ATF3 (activating transcription factor 3). *Mol Cancer Ther*. 4: 693-703.
- (365) Yuan X, Yu L, Li J, Xie G, Rong T, Zhang L, Chen J, Meng Q, Irving AT, Wang D, Williams ED, Liu JP, Sadler AJ, Williams BR, Shen L, Xu D. (2013). ATF3 suppresses metastasis of bladder cancer by regulating gelsolin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Res*. 73: 3625-37.
- (366) Wang H, Jiang M, Cui H, Chen M, Buttyan R, Hayward SW, Hai T, Wang Z, Yan C. (2012). The stress response mediator ATF3 represses androgen signaling by binding the androgen receptor. *Mol Cell Biol*. 32: 3190-202.
- (367) Zhao J, Li X, Guo M, Yu J, Yan C. (2016). The common stress responsive transcription factor ATF3 binds genomic sites enriched with p300 and H3K27ac for transcriptional regulation. *BMC Genomics*. 17: 335.
- (368) Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 10869-74.
- (369) Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 9212-7.
- (370) Higgins JP, Shinghal R, Gill H, Reese JH, Terris M, Cohen RJ, Fero M, Pollack JR, van de Rijn M, Brooks JD. (2003). Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol*. 162: 925-32.
- (371) Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO. (2002). Gene expression patterns in human liver cancers. *Mol Biol Cell*. 13: 1929-39.
- (372) Notterman DA, Alon U, Sierk AJ, Levine AJ. (2001). Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays. *Cancer Res*. 61: 3124-30.
- (373) Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 811-6.
- (374) Yin X 2008

- (375) Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D. (2002). Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 575-99.
- (376) Kaufman RJ. Regulation of mRNA translation by protein folding in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 29: 152-8.
- (377) Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras AC, Berlanga JJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D, Sonenberg N. (2002). Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol.* 12: 1279-86.
- (378) eIF2alpha kinases provide a new solution to the puzzle of substrate specificity. (2005). Hinnebusch AG. *Nat Struct Mol Biol.* 12: 835-8.
- (379) Jiang HY, Wek RC. (2005). GCN2 phosphorylation of eIF2alpha activates NF-kappaB in response to UV irradiation. *Biochem J.* 385: 371-80.
- (380) Chen JJ. (2007). Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias. *Blood.* 109: 2693-9.
- (381) García MA, Meurs EF, Esteban M. (2007). The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie.* 89: 799-811.
- (382) Lu PD, Harding HP, Ron D. (2004). Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol.* 167: 27-33.
- (383) Vattem KM, Wek RC. (2004). Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 11269-74.
- (384) Chaveroux C, Lambert-Langlais S, Cherasse Y, Averous J, Parry L, Carraro V, Jousse C, Maurin AC, Bruhat A, Fafournoux P. (2010). Molecular mechanisms involved in the adaptation to amino acid limitation in mammals. *Biochimie.* 92: 736-45.
- (385) Schoch S, Cibelli G, Magin A, Steinmüller L, Thiel G. (2001). Modular structure of cAMP response element binding protein 2 (CREB2). *Neurochem Int.* 38: 601-8.
- (386) Ameri K, Lewis CE, Raida M, Sowter H, Hai T, Harris AL. (2004). Anoxic induction of ATF-4 through HIF-1-independent pathways of protein stabilization in human cancer cells. *Blood.* 103: 1876-82.
- (387) Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11: 619-33.
- (388) Lassot I, Ségéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, Benarous R, Margottin-Goguet F. (2001). ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 21: 2192-202.
- (389) Lassot I, Estrabaud E, Emiliani S, Benkirane M, Benarous R, Margottin-Goguet F. (2005). p300 modulates ATF4 stability and transcriptional activity independently of its

acetyltransferase domain. *J Biol Chem.* 280: 41537-45.

(390) Bartsch, D., Ghirardi, M., Skehel, P.A., et al. (1995) Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 83, 979–992.

(391) Yang X, Karsenty G. (2004). ATF4, the osteoblast accumulation of which is determined post-translationally, can induce osteoblast-specific gene expression in non-osteoblastic cells. *J Biol Chem.* 279: 47109-14.

(392) Liang G, Hai T. (1997). Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein. *J Biol Chem.* 272: 24088-95.

(393) Roybal CN, Hunsaker LA, Barbash O, Vander Jagt DL, Abcouwer SF. (2005). The oxidative stressor arsenite activates vascular endothelial growth factor mRNA transcription by an ATF4-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 280: 20331-9.

(394) Chen H, Pan YX, Dudenhausen EE, Kilberg MS. (2004). Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J Biol Chem.* 279: 50829-39.

(395) Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, Kilberg MS. (2002). ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem.* 277: 24120-7.

(396) Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D. (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 11: 619-33.

(397) Ameri K, Harris AL. (2008). Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol.* 40: 14-21.

(398) Kilberg MS, Shan J, Su N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab.* 20: 436-43.

(399) Zhao E, Ding J, Xia Y, Liu M, Ye B, Choi JH, Yan C, Dong Z, Huang S, Zha Y, Yang L, Cui H, Ding HF. (2016). KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism. *Cell Rep.* 14: 506-19.

(400) Ding J, Li T, Wang X, Zhao E, Choi JH, Yang L, Zha Y, Dong Z, Huang S, Asara JM, Cui H, Ding HF. (2013). The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. *Cell Metab.* 18: 896-907.

- (401) He CH, Gong P, Hu B, Stewart D, Choi ME, Choi AM, Alam J. (2001). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem.* 276: 20858-65.
- (402) Afonyushkin T, Oskolkova OV, Philippova M, Resink TJ, Erne P, Binder BR, Bochkov VN. (2010). Oxidized phospholipids regulate expression of ATF4 and VEGF in endothelial cells via NRF2-dependent mechanism: novel point of convergence between electrophilic and unfolded protein stress pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 1007-13.
- (403) DeNicola GM, Chen PH, Mullarky E, Sudderth JA, Hu Z, Wu D, Tang H, Xie Y, Asara JM, Huffman KE, Wistuba II, Minna JD, DeBerardinis RJ, Cantley LC. (2015). NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer. *Nat Genet.* 47: 1475-81.
- (404) Ben-Sahra I, Hoxhaj G, Ricoult SJ, Asara JM, Manning BD. (2016). mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science.* 351: 728-33.
- (405) Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- (406) Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. (2003). Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res.* 93: 573-80.
- (407) Guzy RD, Schumacker PT. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 91: 807-19.
- (408) Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. (2011). Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 368276.
- (409) Halliwell B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35: 1147-50.
- (410) Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.
- (411) Singh, N., Dhalla, A.K., Seneviratne, C., Singal, P.K. (1995). Oxidative stress and heart failure. *Mol. Cell. Bioch.* 147, 77–81.
- (412) Ramond, A., Godin-Ribuot, D., Ribuot, C., Totoson, P., Koritchneva, I., Cachot, S., Levy, P., Joyeux-Faure, M. (2011). Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam. Clin. Pharmacol.*
- (413) Boskovic, M., Vovk, T., Kores Plesnicar, B., Grabnar, I. (2011). Oxidative Stress in Schizophrenia. *Current Neuropharmacology.* 9, 301–312.
- (414) Dean, O.M., Van Den Buuse, M., Berk, M., Copolov, D.L., Mavros, C., Bush, A.I. (2011). N-acetyl cysteine restores brain glutathione loss in combined 2-cyclohexene-1-one

- and D-amphetamine-treated rats: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci. Lett.* 499, 149–53.
- (415) De Diego-Otero, Y., Romero-Zerbo, Y., El Bekay, R., Decara, J., Sanchez, L., Rodriguez-de Fonseca, F., Del Arco-Herrera, I. (2009). Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency. *Neuropsych.* 34, 1011–26
- (416) Amer, J., Ghoti, H., Rachmilewitz, E., Koren, A., Levin, C. and Fibach, E. (2006). Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *British Journal of Haematology.* 132, 108–113.
- (417) Aly, D.G., & Shahin, R.S. (2010). Oxidative stress in lichen planus. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 19, 3–11
- (418) Arican, O., Kurutas, EB. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.* 17, 12-6 (2008).
- (419) James, S.J., Cutler, P., Melnyk, S., Jernigan, S., Janak, L., Gaylor, D.W., Neubrandner, J.A. (2004). Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1611-7.
- (420) Pangare, M., Makino, A. (2012). Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes. *J. Smooth Muscle Res.* 48, 1-26.
- (421) Kennedy, G., Spence, V.A., McLaren, M, Hill, A., Underwood, C., Belch, J.J. (2005). Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 584-9.
- (422) Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R.M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1441–1444.
- (423) Hileman, E.O., Liu, J., Albitar, M., Keating, M.J., and Huang, P. (2004). Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53, 209–219.
- (424) Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 21, 361–370.
- (425) Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MTD., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 39, 44–84.
- (426) Chandel, N.S., Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B., and Schumacker, P.T. (2000). Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene.* 19, 3840–3848.
- (427) Yusuf, M.A., Chuang, T., Bhat, G.J., and Srivenugopal, K.S. (2010). Cys-141 glutathionylation of human p53: studies using specific polyclonal antibodies in cancer samples and cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 908–917.
- (428) Ravi, D., Muniyappa, H., and Das, K.C. (2005). Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells. *J. Biol.*

Chem. 280, 40084–40096.

(429) Liu, B., Chen, Y., and St. Clair, D.K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1529–1535.

(430) Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 389, 300–305.

(431) Macip, S., Igarashi, M., Berggren, P., Yu, J., Lee, S.W., Aaronson, S.A. (2003). Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8576–8585.

(432) Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., Chumakov, P.M. (2004). Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science.* 304, 596–600.

(433) Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11, 1306–1313.

(434) Vurusaner, B., Poli, G., Basaga, H. (2012). Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol. Med.* 52, 7-18.

(435) Pikkarainen, S., Kennedy, R.A., Marshall, A.K., Thamel, L., Lay, K., Kriz, T.A., Handa, B.S., Clerk, A., Sugden, P.H. (2009). Regulation of expression of the rat orthologue of mouse double minute 2 (MDM2) by H₂O₂-induced oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 284, 27195-210.

(436) Malmlöf, M., Roudier, E., Högberg, J., Stenius, U. (2007). MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes. Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 2288-96.

(437) Brenkman, A.B., de Keizer, P.L., van den Broek, N.J., Jochemsen, A.G., Burgering, B.M. (2008). Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS One.* 3, e2819.

(438) Burhans, W.C., Heintz, N.H. (2009). The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1282-93.

(439) Pavlides, S., Vera, I., Gandara, R., Sneddon, S., Pestell, R.G., Mercier, I., Martinez-Outschoorn, U.E., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012). Warburg meets autophagy: cancer associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1264–1284.

(440) Coso, S., Harrison, I., Harrison, C.B., Vinh, A., Sobey, C., Drummond, G.R., Williams, E., and Selemidis, S. (2012). NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1229–1247.

(441) Shi, X., Zhang, Y., Zheng, J., and Pan, J. (2012). Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1215–1228.

- (442) Pan, J.S., Hong, M.Z., Ren, J.L. (2009). Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol.* 15, 1702-7.
- (443) Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., and Aggarwal, B.B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1295–1322.
- (444) Ramsey, M.R. and Sharpless, N.E. (2006). ROS as a tumour suppressor? *Nat. Cell. Biol.* 8, 1213–1215.
- (445) Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., and Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat. Cell. Biol.* 8, 1291–1297.
- (446) Watanabe, T., Ono, Y., Taniyama, Y., Hazama, K., Igarashi, K., Ogita, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10159-63 .
- (447) The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. (1994). The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *N. Engl. J. Med.* 330, 1029–1035.
- (448) Omenn, G.S. et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 334, 1150–1155.
- (449) Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *J. Biochem.* 401, 1–11
- (450) Gupta, S.C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., and Aggarwal, B.B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1295–1322.
- (451) Forman HJ, Zhang H, Rinna A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 30: 1-12.
- (452) Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.* 257: 1496-502.
- (453) Rauhala P, Andoh T, Chiueh CC. (2005). Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione. *Toxicol Appl Pharmacol.* 207: 91-5.
- (454) Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1830: 3143-53.
- (455) McCord JM, Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem.* 244: 6049-55.
- (456) Pamplona R, Barja G. (2011). An evolutionary comparative scan for longevity-related

oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology*. 12: 409-35.

(457) D.S. Frear, H.R. Swanson. (1970). Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase. *Phytochemistry*. 9: 2123-2132.

(458) Labuschagne et al. (2014). Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. *Cell Reports*. 7, 1–11.

(459) Cheng Q, Song T, Chen L, Chen J. (2014). Autoactivation of the MDM2 E3 ligase by intramolecular interaction. *Mol Cell Biol*. 34: 2800-10.

(460) Ladanyi, M., C. Cha, R. Lewis, S. C. Jhanwar, A. G. Huvos, and J. H. Healey. (1993). MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res*. 53:16-18

(461) Datta, M. W., E. Macri, S. Signoretti, A. A. Renshaw, and M. Loda. (2001). Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod. Pathol*. 14:437-442

(462) Jer-Yen Yang, Cong S. Zong, Weiya Xia, Yongkun Wei, Mohamed Ali-Seyed, Zheng Li, Kristine Broglio, Donald A. Berry, and Mien-Chie Hung. (2006). MDM2 Promotes Cell Motility and Invasiveness by Regulating E-Cadherin Degradation. *Mol Cell Biol*. 26: 7269–7282.

(463) Maddocks OD, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. (2016). Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. *Mol Cell*. 61: 210-21.

(464) Ding J, Li T, Wang X, Zhao E, Choi JH, Yang L, Zha Y, Dong Z, Huang S, Asara JM, Cui H, Ding HF. (2013). The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation. *Cell Metab*. 18: 896-907.

(465) Zhao E, Ding J, Xia Y, Liu M, Ye B, Choi JH, Yan C, Dong Z, Huang S, Zha Y, Yang L, Cui H, Ding HF. (2016). KDM4C and ATF4 Cooperate in Transcriptional Control of Amino Acid Metabolism. *Cell Rep*. 14: 506-19.

(466) Maddocks OD, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. (2016). Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells. *Mol Cell*. 61: 210-21.

(467) Kotake-Nara E, Saida K. (2006). Endothelin-2/vasoactive intestinal contractor: regulation of expression via reactive oxygen species induced by CoCl₂, and Biological activities including neurite outgrowth in PC12 cells. *ScientificWorldJournal*. 17: 176-86

(468) Kanda Y, Hinata T, Kang SW, Watanabe Y. (2011). Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 89: 250-8.

(469) Calzadilla P, Sapochnik D, Cosentino S, Diz V, Dixelio L, Calvo JC, Guerra LN. (2011). N-acetylcysteine reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Mol Sci*. 12: 6936-51.

(470) Hallenborg P, Feddersen S, Francoz S, Murano I, Sundekilde U, Petersen RK, Akimov V, Olson MV, Lozano G, Cinti S, Gjertsen BT, Madsen L, Marine JC, Blagoev B, Kristiansen K. (2012). Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation. *Cell Death Differ.* 19: 1381-9.

(471) Coindre JM. (2010). Molecular biology of soft-tissue sarcomas. *Bull Cancer.* 97: 1337-45.

(472) Way L, Faktor J, Dvorakova P, Nicholson J, Vojtesek B, Graham D, Ball KL, Hupp T. (2016). Rearrangement of Mitochondrial Pyruvate Dehydrogenase Subunit Dihydrolipoamide Dehydrogenase Protein-Protein Interactions by the MDM2 Ligand Nutlin-3. *Proteomics.*

Résumé:

L'oncoprotéine MDM2 est reconnue comme un régulateur négatif majeur du suppresseur de tumeur p53. Ici, nous montrons que MDM2 est recruté à la chromatine, indépendamment de p53 pour réguler un programme transcriptionnel impliqué dans le métabolisme des acides aminés et l'homéostasie rédox cellulaire. Des études sur le génome entier mettent en évidence un rôle important de facteurs de transcription membres de la famille ATF dans l'ancrage de MDM2 à ses gènes cibles. Le recrutement de MDM2 à la chromatine est un processus étroitement régulé qui se produit lors d'un stress oxydatif, de déprivation en sérine et glycine et qui est modulée par l'enzyme métabolique pyruvate kinase M2 (PKM2). Par ailleurs, en interférant avec la protéine MDM2 endogène et la disponibilité exogènes de sérine, on est capable de diminuer le flux de carbone provenant du glucose comme source pour le métabolisme du glutathion. Ceci a un impact sur l'état d'oxydo-réduction et la croissance des cellules cancéreuses. L'ensemble de nos données montrent une fonction précédemment insoupçonnée de l'oncoprotéine MDM2 dans le contrôle du statut rédox des cellules cancéreuses.

Abstract:

The Mouse Double Minute 2 (MDM2) oncoprotein is recognized as a major negative regulator of the p53 tumor suppressor. Here we show that MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 to regulate a transcriptional program implicated in amino acid metabolism and ROS homeostasis. Genome-wide studies highlight an important role for members of the ATF family of transcription factors in tethering MDM2 to its target genes. MDM2 recruitment to chromatin is a tightly regulated process that occurs during oxidative stress, serine/glycine deprivation and is modulated by the pyruvate kinase M2 (PKM2) metabolic enzyme. Moreover, interfering with endogenous MDM2 and exogenous serine availability impaired the channeling of glucose-derived carbon sources into glutathione (GSH) metabolism, impacting on the redox state and growth of cancer cells. Collectively, our data illustrate a previously unsuspected function of the MDM2 oncoprotein in the control of the redox state of cancer cells.