



HAL
open science

Etude des fonctions métaboliques de l'oncoprotéine MDM2 : vers de nouveaux traitements thérapeutiques pour le Liposarcome

Madi Cissé

► **To cite this version:**

Madi Cissé. Etude des fonctions métaboliques de l'oncoprotéine MDM2 : vers de nouveaux traitements thérapeutiques pour le Liposarcome. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT : 2019MONTT082 . tel-02868641

HAL Id: tel-02868641

<https://theses.hal.science/tel-02868641>

Submitted on 15 Jun 2020

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 DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale CBS2 N°168

Unité de recherche IRCM INSERM U1194

**Etude des fonctions métaboliques de l'oncoprotéine
MDM2 : vers de nouveaux traitements thérapeutiques
pour le Liposarcome.**

Présentée par Madi Cissé
Le 18 Décembre 2019

Sous la direction de Laëtitia LINARES

Devant le jury composé de

M. le Dr Marc SITBON

Mme. Le Dr Laëtitia LINARES

Mme. le Dr Sophie VASSEUR

M. le Dr Franck TOLEDO

M. le Dr Frédéric CHIBON

M. le Pr Jean-Charles PORTAIS

M. le Dr Laurent LE CAM

Président du jury

Directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Chef d'équipe



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Les personnes qui me connaissent bien diront que je suis un optimiste et rarement stressé. En réalité, je suis tout simplement un chanceux. J'ai eu de la chance tout au long de ma vie. Dans ces conditions, la vie semble tellement plus facile et stresser ne sert à rien. Même venir à bout d'une thèse n'est pas si compliqué pour un veinard comme moi.

Conscient de cette chance, je tiens à remercier tous ceux qui y ont largement contribué.

En tout premier lieu, je souhaite adresser mes remerciements aux membres du jury : Un grand merci au Dr Marc SITBON, Dr Sophie VASSEUR, Dr Franck TOLEDO, Dr Frédéric CHIBON et Pr Jean-Charles PORTAIS de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ces travaux.

J'aimerais également remercier l'université de Montpellier, l'école doctorale CBS2 ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale pour avoir accompagnés et financés mes recherches.

Ensuite je tiens à remercier chaleureusement les personnes qui m'ont fait confiance et sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour : le Dr Laëtitia Linares et le Dr Laurent Le Cam. Je ne vous remercierais jamais assez – quelle chance incroyable d'avoir croisé votre route.

Laëtitia, on ne peut pas rêver meilleure directrice de thèse. Tu m'as guidé quand j'en avais besoin tout en me laissant libre et autonome. Non seulement j'ai beaucoup appris à tes côtés mais j'ai aussi énormément apprécié travailler avec toi au quotidien. Que ce soit lors de nos voyages en congrès ou à l'animalerie où nous parlions de tout et de rien (surtout de tout). Tu donnes sans attendre en retour. Tu gardes ta bonne humeur même dans les moments moins drôles comme la fois où je me suis fait flashé avec ta voiture. Je te souhaite toute la réussite que tu mérites pour la suite de tes projets. Chanceux comme je suis, nos routes se croiseront forcément à nouveau.

Laurent, merci de m'avoir pris dans ton équipe pour mon stage de master. J'ai tout de suite senti qu'avec un breton à la direction, les choses devraient forcément bien se passer. Tu es un chef d'équipe à la fois exigeant et juste avec tes étudiants. Ta rigueur, ton professionnalisme à l'américaine m'ont impressionné. Grâce à toi j'ai pu progresser durant ces 4 années. Côté « sport » je n'oublierais jamais la fois où je t'ai battu au ping-pong (c'est vrai que tu gagnais tous les matchs à domicile).

Un grand merci d'avoir été présent pour m'écouter et me conseiller quand j'en avais besoin. Quelle chance d'avoir fait partie de ton équipe.

Un immense merci à toute l'équipe LLC grâce à qui j'ai pu profiter d'un cadre de travail idéal me facilitant grandement la tâche.

Merci Maryse : Avec toi j'ai fait mes premiers pas dans le labo. Tu es l'ange gardien des lieux ; sans toi notre vie à tous serait tellement plus difficile. Merci d'avoir été là pour moi tout au long de ma thèse.

Laurie, merci de m'avoir aidé avec la révision du papier. J'ai adoré travailler avec toi. Ne plus t'entendre chanter va me manquer beaucoup. Tu es quelqu'un de génial avec qui on rigole bien. Tous les labos devraient avoir une Laga2.

Sam, merci d'avoir rendu mes journées plus joyeuses (enfin un jour sur deux quand tu ne boudes pas) et pour ces quelques moments inoubliables : la fois où tu as brisé la tasse fétiche de Fred à Toulouse, le jour où tu as failli noyer le post-doc de Chris lors de la journée canoë et bien-sûr nos parties de fléchettes d'anthologies. Je te souhaite plein de bonnes choses sur le plan professionnel et familial.

Un grand merci à Matthieu. Du côté obscur du labo (E4F1) tu facilites tant le travail de toute l'équipe. Tu as toujours été disponible pour me donner un coup de main ou répondre à mes questions. J'ai adoré nos échanges qu'ils furent scientifiques ou non (mon meilleur adversaire de fléchettes). Merci papy !

Grazie Michaela, la mamma del laboratorio. La tua gioia e il tuo buon umore sono un piacere ogni giorno. Sono felice di conoscerti e di aver lavorato con te (non solo perché fai delle ottime torte).

Carlo, mister Dj, artigiani della qualità. Sono felice di conoscerti, sei un ragazzo eccezionale. Non dimenticherò mai che hai fatto il mio primo spritz.

Gracias Jaime. Estoy muy feliz de haberte conocido. Nunca olvidaré nuestras discusiones sobre la pronunciación de las V y B. Le deseo todo el éxito y el coraje para terminar esta tesis.

Merci Mélanie (la râleuse) d'avoir apporté une touche bretonne au laboratoire. Je te souhaite plein de succès pour ton projet.

Merci Caroline pour ta bonne humeur indéfectible.

Mes remerciements vont également aux stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler : Titouan et Gaultier.

Merci aussi à toi, Alix, pour ton amitié et tes rhums arrangés légendaires. Félicitation encore pour ta thèse et à bientôt.

Merci Nelly, pour ta bonne humeur et ta gentillesse notamment lors de mes comités de thèse. Merci d'avoir apporté ton œil de médecin et de m'avoir éclairé sur l'aspect clinique du sarcome.

Un immense merci aux anciens membres de l'équipe qui m'ont aidé dans mon projet. Merci Romain, tu as été un mentor en tant qu'étudiant en thèse. Tu es un super bosseur qui m'a énormément inspiré. J'espère que nos routes se croiseront à nouveau. Merci à toi, Giuseppe, quel plaisir de collaborer avec toi, tant sur le plan humain que sur le plan scientifique.

Enfin un merci tout particulier à celle que j'ai toujours considéré comme faisant partie de l'équipe : Myriam. Tu es une personne en or qui a grandement contribué à ma thèse (ne serait-ce qu'en me nourrissant). Tu as le don rare de rendre les gens qui t'entoure de meilleure humeur. Nos discussions et debriefs Top chef vont me manquer.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes de l'institut avec qui j'ai interagi tout au long de ces 4 années. Cathy, Abdel, Marina, Eric, Carmen, Naoill mais aussi les équipes du magasin de la laverie et de l'animalerie et tous les autres. Les doctorants, la bande du petit déjeuner, Habib et Valentin (toujours présents pour les apéros). Merci à tous les membres de l'IRCM.

J'aimerais aussi remercier chaleureusement les personnes extérieures à l'institut avec qui j'ai eu la chance de collaborer : la plateforme MétaToul, avec qui j'ai réalisé mes expériences de métabolomique (et pris des apéros mémorables au Dubliner). Merci Jean-Charles, Florian et Maud pour votre énergie et votre gentillesse. J'espère avoir la chance, un jour, de travailler à nouveau avec vous.

Merci à Marc Sitbon d'avoir été présent tout au long de ma thèse lors des comités. Tes conseils ont été très précieux. Il était tout bonnement inimaginable pour moi que tu ne sois pas le président de mon jury de thèse.

Merci à Frédéric Chibon pour son aide et son support en tant qu'expert du sarcome. Désolé pour la tasse.

Un immense merci à Jean-Emmanuel Sarry pour les échanges scientifiques ou non. Tu as aussi été un moteur pour mes recherches notamment lors de mes comités de thèse.

Enfin, pour finir, je tiens à remercier mes proches. Cette thèse n'aurait pas été possible si un jour 3 colocataires rennais n'avaient pas eu l'idée de venir s'installer à Montpellier. Merci Bobo et Helmi pour ces années incroyables vécues ensemble. Merci aussi à Martin, Toum, Guiboux, Chahid, Hervé, Vaness, Marie, Laury, Bobby et tous les autres (les gars du basket, les bretons). J'ai une chance incroyable de vous connaître (les points de vie que nous avons perdus ensemble tous ces week-end en valaient largement la peine).

Merci aux frères avec qui j'ai eu la chance de grandir : Sylvain (le meilleur parmi les meilleurs), Lucas (ma moelle, bouki) et Quentin (j'espère que tu ne lieras pas cette thèse, j'écris beaucoup moins bien que toi).

Un grand merci à mon frère Nico, la personne la plus intelligente que je connaisse. Courage pour la fin de ta thèse ; tu iras loin, c'est sûr.

Je n'aurais jamais fait cette thèse sans mes parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans tout ce que j'ai voulu entreprendre. Mon vieux lion, Thermü MERCI.

Et bien évidemment je remercie Nora, la plus grande chance de ma vie. Merci d'être à mes côtés tous les jours, de m'avoir soutenu pendant ces 4 années de thèse, de m'avoir supporté quand je rentrais tard ou quand je travaillais le week-end. Merci de m'avoir donnée Mara, la plus belle manip de ma vie ! Quelle chance! Merci!

Avant-propos

Au niveau moléculaire, les propriétés oncogéniques de la protéine MDM2 ont été jusqu'à présent principalement attribuées à son activité E3 ubiquitine ligase qui conduit à la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 par le protéasome. Cette fonction de MDM2 fut à la base du développement de thérapies ciblées reposant sur différentes molécules, telles que celles de la famille des nutlines, capables de bloquer l'interaction entre p53 et MDM2 et de réactiver les fonctions suppresseur de tumeurs de p53. Malheureusement, la plupart des essais cliniques réalisés avec ces inhibiteurs pharmacologiques ont révélé un bénéfice thérapeutique faible, voire inexistant, pour les patients atteints de liposarcomes. Aujourd'hui, des preuves croissantes suggèrent que les fonctions oncogéniques de MDM2 s'étendent au-delà de son rôle de régulateur négatif de p53. Parmi ces fonctions de MDM2 indépendantes de p53, notre laboratoire a récemment confirmé que MDM2 était capable d'être recruté à la chromatine afin de réguler un programme transcriptionnel impliqué dans le métabolisme des acides aminés et plus particulièrement dans celui de la sérine et de la glycine (Riscal et al., Mol. Cell. 2016). Nous avons également montré que MDM2 pouvait avoir une activité mitochondriale, où il réprimait la transcription du complexe I de la chaîne respiratoire (codé par le génome mitochondrial), contrôlant ainsi la respiration, les fonctions du muscle squelettique et la migration des cellules cancéreuses (Arena et al., Mol. Cell. 2018).

L'analyse d'échantillons frais de tumeurs humaines issus d'une collection unique de sarcomes (banque clinico-biologique créée en 2016 au Centre régional de lutte contre le cancer de Montpellier / ICM) m'a permis d'attester que MDM2 est fortement recruté à la chromatine dans les liposarcomes (LPS) mais pas dans d'autres types de sarcomes. Mon projet de thèse vise à étudier le rôle de MDM2 dans le développement des LPS et à mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à son amplification systématique dans ce type tumoral. Exploitant une collection unique de lignées cellulaires dérivées de patients LPS et de modèles de xénogreffes de tumeurs dérivées directement de patients (PDX), mes travaux ont permis de montrer pour la première fois que le rôle de MDM2 dans le contrôle du métabolisme de la sérine joue un rôle essentiel dans le développement des liposarcomes. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de MDM2 induisant sa dégradation (SP141) constitue une nouvelle cible thérapeutique dans ce type tumoral.

Dans ce manuscrit, après une mise en contexte de la voie p53, je détaillerai nos connaissances de l'onco-protéine MDM2, ainsi que les différentes approches thérapeutiques qui visent à perturber ses fonctions dans les cellules cancéreuses. L'introduction offrira ensuite un aperçu général du métabolisme tumoral, et plus particulièrement celui lié au métabolisme de la sérine, puis se conclura par une description clinique et biologique du liposarcome. Dans une deuxième partie, je présenterai mes travaux de thèse au travers d'un article, pour lequel je suis premier auteur, et du dépôt de brevet qui en résulte, ainsi que les articles auxquels j'ai

participé au sein de l'équipe. Enfin, la dernière partie sera consacrée à une discussion générale et une mise en perspective de l'ensemble de mes recherches.

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| 1C = one carbon metabolism | GR = glutathion réductase |
| 3-PPyr = 3-phosphohydroxypyruvate | GS = glutathion synthase |
| ADN = Acide désoxyribonucléique | GSH = Glutathione |
| AIF = Facteur induisant l'apoptose | GSK3β = glycogène synthase kinase 3 β |
| AKT = ou PKB pour « protein kinase B » | GST = glutathion S- transférase |
| ARF = Alternative Reading Frame | GTP = Guanosine triphosphate |
| ARN = Acide ribonucléique | ALAT = alanine amino transférase |
| ARNm = ARN messenger | H3K9 = méthyltransférase G9A de l'histone H3 Lysine 9 |
| ATF4 = Activating transcription factor | HIF-1 = Hypoxia Inducible Factors 1 |
| ATGL = adipose triglyceride lipase | HSL = hormone-sensitive lipase |
| ATM = ataxia telangiectasia-mutated | IRF8 = IFN regulatory factor 8 |
| ATP = Adenosine Triphosphate | KO = Knock out |
| CAT = catalase | KRAS = Kirsten rat sarcoma |
| CBS = cystathionine synthase | MAT = méthionine adényltransférase |
| CKI = casein kinase 1 | MDH = malate déshydrogénase |
| CRE = cAMP respond element | MDM2 = Murin double minute 2 |
| CTH = cystathionine gamma-lyase | MDM2-FL = Murin double minute 2 full Length |
| DNA-PK = DNA activated protein kinase | MDMX = Murin double minute x |
| E4F1 = E4F Transcription Factor 1 | ME = enzymes maliques |
| EGF = epidermal growth factor | MEF = Mouse embryonic fibroblast |
| ETC = electron transport chain | MTHFD2 = |
| FACS = Flow cytometry | methylenetetrahydrofolate |
| FAD(P) = Flavine adenine dinucléotide (phosphate) | déshydrogénase 2 |
| FADH2 = Flavine adénine dinucléotide | MTHFR = méthylène tétrahydrofolate réductase |
| G3P = Glycéraldéhyde-3-phosphate | NAC = N-acetyl-L-cysteine |
| G6P = Glucose-6-phosphate | NADH = Nicotinamide adénine dinucléotide |
| GAPDH = Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase | NADPH = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| GAR = glycineamide ribonucléotide | NES = Nuclear Exclusion Signal |
| GCL = glutamate-cystéine ligase | NFAT1 = nuclear factor of activated T cells 1 |
| GCN2 = general control non derepressible 2 kinase | NICD = Notch intracellular domain |
| GDH = glutamate déshydrogénase | NLS = Nuclear Localization Signal |
| GLDC = glycine décarboxylase | NOS =nitrogen oxygen species |
| GLS = glutaminase | OAA = oxaloacétate |
| GLUT = Glucose transporter | OXPHOS = Phosphorylation oxydative |
| Gly = Glycine | |
| GPX = glutathion peroxydase | |

PC = pyruvate carboxylase
PCAF = p300/CBP-associated factor
PDGF = Platelet Derived Growth Factor
PDH = pyruvate déshydrogénase
PDK = pyruvate déshydrogénase kinase
PEP = Acide phosphoénolpyruvique
PFK2 = Phosphofructokinase-2
TCA = tricarboxylic acid cycle ou cycle de Krebs en français
PET (scan) = positron emission tomography
PHGDH = phosphoglycérate déshydrogénase
PI3K = phosphoinositide 3-kinase
PKB = protein kinase B
PKC- ζ = Protein kinase C, zeta
PROTAC = proteolysis targeting chimera
PRPP = phosphoribosyl pyrophosphate
PSAT-1 = phosphosérine aminotransférase 1
PSPH = phosphosérine phosphatase
PTEN = Phosphatase and TENSin homolog
R5P = ribose 5-phosphate
RING = Really Interesting Novel Gene
ROS = reactive oxygen species
SAH = S-adénosylhomocystéine
SAHH = S-adénosyl homocystéine hydrolase
SAM = S-adénosylméthionine
Ser = sérine
SHMT = sérine hydroxyméthyltransférase
shRNA = Small hairpin RNA
SLC = solute carrier
SNP = single nucleotide polymorphism
SOD = superoxyde dismutase
SSP = serin synthesis pathway
SUMO = pour Small Ubiquitin-like Modifier

THF = tétrahydrofolate
TP53 = transformation related protein p53
TS = thymidylate synthase
TSG101 = Tumor Susceptibility Gene 101
UMP = uridine 5'-monophosphate
UPS = ubiquitine-protéasome
UTR = Untranslated Transcribed Region
 α -KG = α -cétoglutarate
 α KB = alpha-Kétobuty

Table des matières

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Remerciments: | 1-4 |
| Avant propos: | 5-6 |
| Liste des abréviations: | 7-8 |

I - Le métabolisme des cellules cancéreuses:

| | |
|---|-------|
| 1. La glycolyse | 14-15 |
| 2. La glutaminolyse | 16 |
| 3. La voie des pentoses phosphates | 17-18 |
| 4. Le cycle de Krebs | 19-20 |
| 5. La phosphorylation oxydative | 21 |
| 6. Le métabolisme de la sérine | |
| a) La biosynthèse <i>de novo</i> de sérine | 22-25 |
| b) Le transport de la sérine exogène..... | 26-27 |
| c) La sérine, la glycine et le métabolisme à un carbone (1C)..... | 28-30 |
| 7. La balance redox | |
| a) Les ROS | 31-34 |
| b) Le glutathion, la défense cellulaire contre les ROS..... | 35-38 |
| c) Les ROS et le cancer | 39-40 |
| d) Cibler les ROS comme stratégie thérapeutique..... | 41-42 |
| 8. La biosynthèse des acides nucléiques | 43-45 |

II - Le suppresseur de tumeur p53:

| | |
|---|-------|
| 1. Les fonctions de p53 | 46-48 |
| 2. p53 et le contrôle du métabolisme | 49-51 |
| 3. La régulation de p53 | 52 |

III - L'oncoprotéine MDM2:

| | |
|---|-------|
| 1. Le gène <i>MDM2</i> | 53-54 |
| 2. Les motifs protéiques de <i>MDM2</i> | 55-56 |
| 3. <i>MDM2</i>, une E3-ligase de la famille RING | 57-58 |
| 4. Les régulateurs de <i>MDM2</i> | |
| a) Au niveau transcriptionnel | 59 |
| b) Mécanismes de contrôle post-transcriptionnel du gène <i>MDM2</i> | 60 |
| c) Mécanismes de contrôle post-traductionnel de <i>MDM2</i> | 61-64 |
| d) Régulation de la localisation subcellulaire de <i>MDM2</i> | 65 |
| 5. <i>MDMX</i>, l'homologue de <i>MDM2</i> | 66-67 |
| 6. <i>MDM2</i>, le régulateur principal de p53 | 68-70 |
| 7. <i>MDM2</i>, une vie sans p53 | 71 |

| | |
|--|-------|
| a) Contrôle du cycle cellulaire | 72 |
| b) Différenciation cellulaire | 73 |
| c) Régulation transcriptionnelle | 74 |
| d) Réparation de l'ADN | 75 |
| e) Biosynthèse des ribosomes | 75 |
| f) Hypoxie | 75 |
| g) Apoptose et arrêt du cycle cellulaire | 75 |
| h) La migration et l'invasion..... | 75-76 |

IV - MDM2, une cible thérapeutique pour le cancer:

| | |
|--|-------|
| 1. Les nutlines | 77-78 |
| 2. Les imidazoles | 79 |
| 3. Les benzodiazépines | 80 |
| 4. Les spiro-oxindoles et indoles | 81-84 |
| 5. Les pyrido-indoles | 85-86 |

V - Le liposarcome:.....87

| | |
|---|-------|
| 1. Caractéristiques cliniques | 88-91 |
| 2. Génétique | 92 |
| 3. Diagnostic | 93 |
| 4. Prise en charge, traitements et thérapies futures | 94 |

VI - Objectif de la thèse: 95-96

VII - Résultats:..... 98-247

VIII - Discussion et perspectives:248

| | |
|---|---------|
| 1. La localisation chromatinienne de MDM2 dans les LPS | 249-252 |
| 2. MDM2 à la mitochondrie dans les LPS, un rôle important pour le métabolisme du 1C? | 253-254 |
| 3. Une carte du métabolisme des Liposarcomes | 255-256 |
| 4. Des biomarqueurs métaboliques pour améliorer la prise en charge des LPS | 257-258 |
| 5. Un dialogue métabolique entre la tumeur et les organes | 259-261 |
| 6. Un modèle murin de liposarcome | 262-265 |
| 7. MDM2, une cible thérapeutique pour le liposarcome | 266-268 |
| 8. Cibler le métabolisme comme stratégie thérapeutique pour le liposarcome | |
| a) PHGDH une piste thérapeutique prometteuse..... | 269-272 |
| a) Cibler le métabolisme du 1C..... | 273-274 |
| a) Des régimes alimentaires en association à la thérapie ciblée..... | 275-277 |

Bibliographie: 279-305

INTRODUCTION

I - Le métabolisme des cellules cancéreuses

Au même titre que Michael Jordan dans le basket-ball, les noms de Douglas Hanahan et Robert Weinberg sont très souvent évoqués dans la biologie du cancer. Ceux-ci ont, en effet, regroupé des séries d'événements génétiques et épigénétiques bouleversant de grandes capacités biologiques et ainsi listé les processus par lesquels une cellule devient cancéreuse. « The hallmarks of cancer », que l'on peut traduire par « les capacités distinctives du cancer », est l'article le plus cité de la revue *Cell* et est devenu une référence dans le domaine de la biologie cellulaire. Selon ses auteurs, l'instabilité génomique résultant de l'accumulation de multiples lésions conduit à des changements majeurs dans la signalisation cellulaire, la progression au travers du cycle cellulaire, à la résistance à la mort cellulaire et à la mort répliquative, à l'augmentation de l'angiogenèse, à l'activation de l'invasion et donc à l'apparition de métastases. En 2011, avec les progrès de nos connaissances conceptuels sur les mécanismes cellulaires, Hanahan et Weinberg proposent d'étendre cette liste avec l'ajout de 2 « capacités » cruciales que sont la possibilité d'échapper au système immunitaire et celle de reprogrammer le métabolisme énergétique (**Figure 1**). C'est l'ensemble de ce processus multi-étapes qui permet à une cellule de devenir maligne [1].

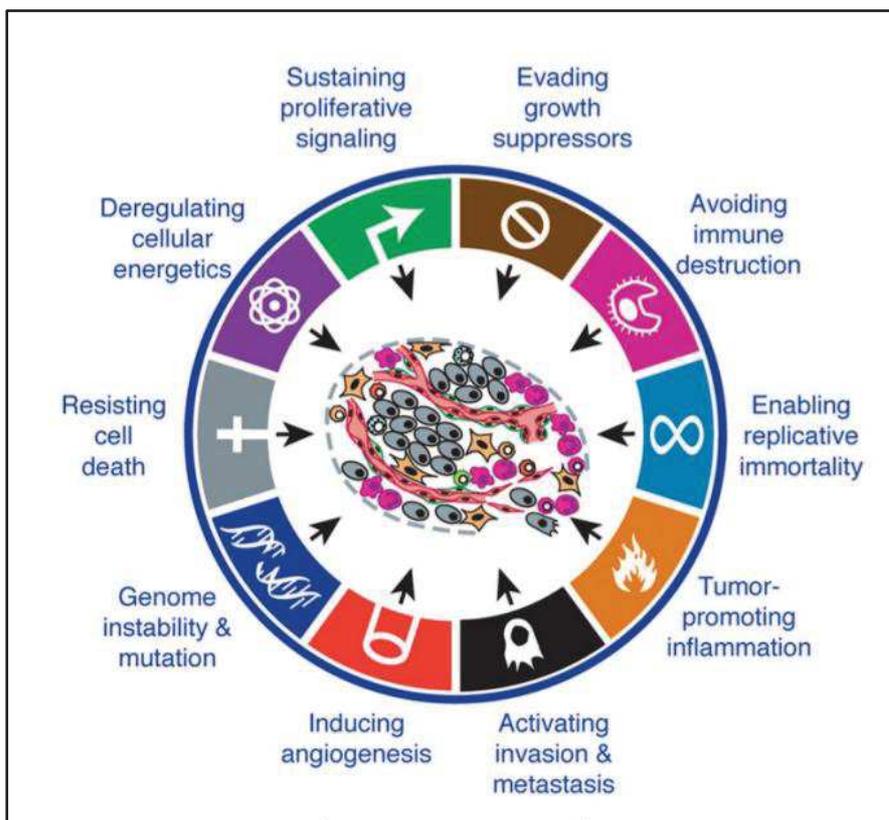


Figure 1: The hallmarks of cancer. Les différentes propriétés qu'acquiert une cellule cancéreuse lui servent à échapper aux différents contrôles de l'organisme, comme l'apoptose, les suppresseurs de tumeurs ou encore le système immunitaire. Adapté de Hanahan et Weinberg (2011) [1].

La reprogrammation métabolique par les cellules cancéreuses est devenue une étape de la tumorigenèse de plus en plus étudiée. Cette étape consiste, pour la cellule cancéreuse, à augmenter son apport de métabolites et nutriments, constituant la biomasse qui lui permettra de proliférer. L'une des premières observations de reprogrammation métabolique est ce qu'on appelle encore aujourd'hui l'effet « Warburg », découvert il y a près d'un siècle. Otto Warburg a montré que même en présence d'oxygène, les cellules cancéreuses peuvent reprogrammer leur métabolisme du glucose, et donc leur production d'énergie, en limitant leur métabolisme énergétique en grande partie à la glycolyse, ce qui conduit à un état dit de « glycolyse aérobie ».

Les deux nutriments principalement utilisés par les cellules tumorales sont le glucose et la glutamine. Ces deux métabolites sont en effet au cœur de plusieurs carrefours métaboliques et permettent ainsi aux cellules de maintenir ou générer l'assemblage de nombreuses macromolécules. Bien évidemment, ce ne sont pas les seules ressources des cellules cancéreuses, qui peuvent utiliser une multitude d'autres molécules, comme les acides aminés, les vitamines ou encore les lipides. Ainsi, les études visant à mieux comprendre l'importance des réseaux métaboliques dans les cellules cancéreuses sont aujourd'hui source de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses et passionnantes.

Dans ce chapitre, j'aborderai dans un premier temps les principales voies métaboliques empruntées par les cellules cancéreuses, puis je développerai plus en détail le métabolisme de la sérine, une voie métabolique pouvant être régulée, entre autres, par l'oncogène MDM2.

1) La glycolyse

Le glucose est la principale source d'énergie des cellules eucaryotes. La source de carbone qu'elle génère grâce à la glycolyse est retrouvée dans de nombreuses voies métaboliques, telles que la voie des pentoses phosphates, le cycle de Krebs, la synthèse de nombreux acides aminés ou encore la glycosylation des lipides.

La glycolyse qui a lieu dans le cytoplasme est une suite de réactions chimiques en 10 étapes que l'on peut diviser en trois phases permettant *in fine* de produire du pyruvate et de générer de l'énergie. La première phase, qui comprend les réactions 1, 2 et 3, est une phase d'investissement énergétique puisqu'elle « coûte » à la cellule 2 molécules d'ATP pour 1 molécule de glucose. Cette étape permet l'activation des hexoses par phosphorylations successives, ce qui génère par ailleurs du glucose-6-phosphate pouvant emprunter la voie des pentoses phosphates. La deuxième phase (réactions 4 et 5) correspond au clivage du fructose-1,6-bisphosphate en 2 molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate. Enfin, la troisième phase, qui génère 4 molécules d'ATP pour 1 molécule de glucose et offre un « retour sur investissement » énergétique, aboutit à la synthèse de 2 molécules de pyruvate (Figure 2).

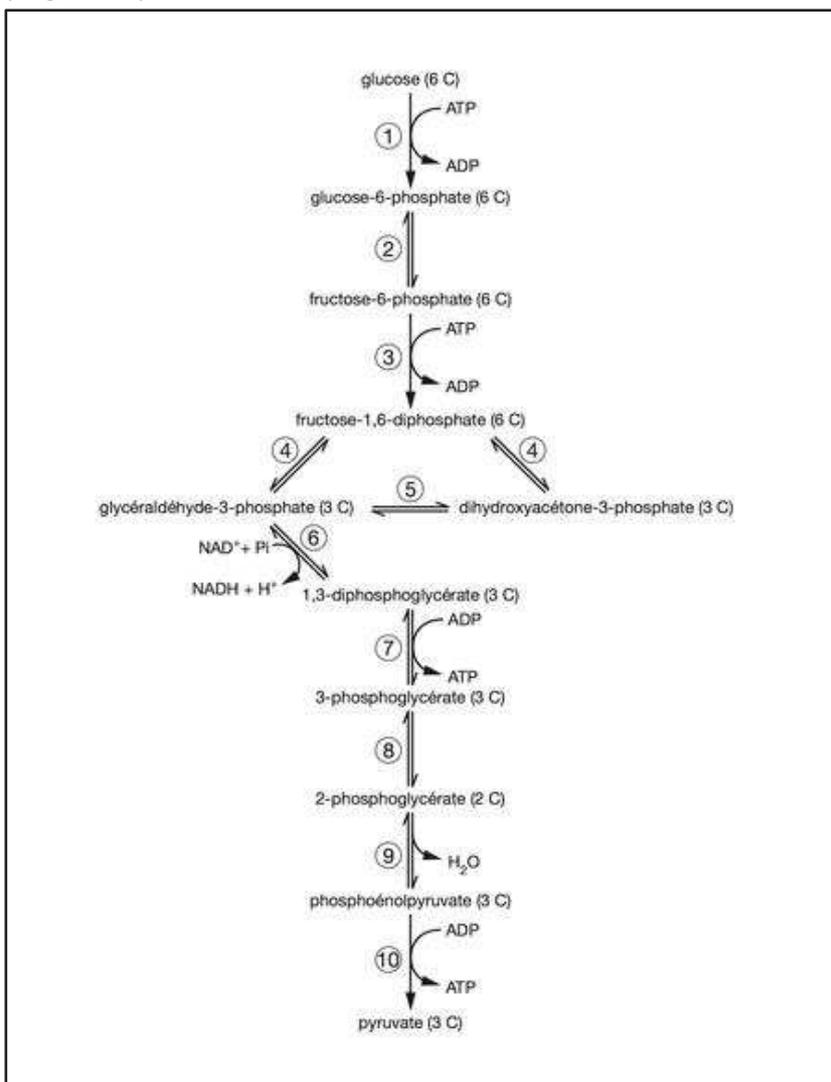


Figure 2 : Schéma des étapes de la glycolyse.

De par leur demande énergétique et de biosynthèse de macromolécules, les cellules hyper-prolifératives des tumeurs absorbent plus de glucose que le tissu sain environnant [2]. Cette observation est d'ailleurs à la base d'un outil diagnostique utilisé en routine pour détecter la présence de cellules cancéreuses. En effet, le PET scan est un appareil d'imagerie consistant à mesurer l'incorporation d'un produit de contraste, le ^{18}F fluorodeoxyglucose, un analogue radiomarqué du glucose, qui n'est pas métabolisé au-delà des premières étapes de la glycolyse [3]. Cette augmentation de l'absorption du glucose corrèle également souvent avec l'augmentation de l'expression du transporteur GLUT1 [4], qui peut être notamment régulé par la mutation KRAS [5].

Comme évoqué précédemment, il est intéressant de noter que la dernière étape de la glycolyse est médiée par la pyruvate kinase (PK), qui convertit le PEP en pyruvate. Cette enzyme existe sous deux isoformes : PKM1 et PKM2. Ce dernier est retrouvé de façon plus abondante dans les cellules cancéreuses [6] [7], mais aussi sous une forme dimérique dite « inactive » qui ralentit le flux glycolytique, permettant une utilisation plus facile des intermédiaires de la glycolyse vers des voies branchées, telles que la voie des pentoses phosphates [8].

La glycolyse est une voie métabolique clef soumise à une régulation fine, qu'elle soit de type enzymatique (PFK2, PK), hormonal (insuline, glucagon) ou encore transcriptionnel (PK, p53). De nombreuses études montrent que, lors de la mise en place de l'effet Warburg, un grand nombre de gènes impliqués dans le transport du glucose et dans la glycolyse sont surexprimés dans différents types tumoraux [9] [10]. Cibler certaines des enzymes de la glycolyse représente une approche prometteuse dans les traitements anticancéreux [11].

2) La glutaminolyse

La glutaminolyse est une voie métabolique dans laquelle la glutamine est lysée pour aboutir à la formation de glutamate, α -kétoglutarate, aspartate, pyruvate, lactate, alanine ou encore citrate. La glutamine, qui est l'acide aminé le plus abondant de notre organisme [12], va participer à l'équilibre de la balance redox (biosynthèse de glutathion via le glutamate) mais aussi à la production de biomasse.

Dans la mesure où, dans les cellules cancéreuses, le pyruvate est majoritairement converti en lactate plutôt qu'utilisé pour alimenter le TCA, les besoins de production d'ATP mitochondrial diminuent. Pour compenser ces changements et maintenir un cycle de Krebs fonctionnel, les cellules cancéreuses ont une glutaminolyse élevée. La glutamine est transportée dans les cellules à travers des transporteurs, comme SLC1A5 et SLC7A5, pour être convertie en glutamate, puis en α -kétoglutarate par la glutaminase (GLS) et la glutamate déshydrogénase (GDH), respectivement.

Aujourd'hui, différents inhibiteurs d'enzymes de cette voie métabolique (notamment de GLS) ont été mis au point en tant que cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer [13] [14] (**Figure 3**).

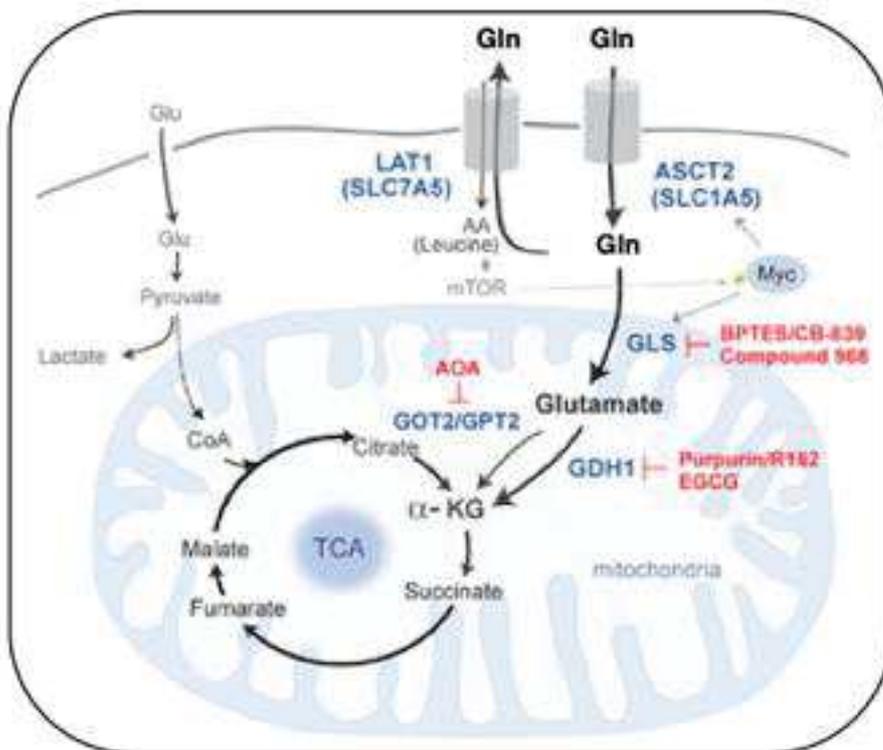


Figure 3 : La glutaminolyse. Représentation schématique de la glutaminolyse dans les cellules cancéreuses. Les enzymes de la glutaminolyse (en bleu) sont des cibles potentielles dans la lutte contre le cancer (inhibiteurs connus en rouge).

3) La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est une voie métabolique qui dérive de la glycolyse au niveau du glucose-6-phosphate et qui permet l'inter-conversion des hexoses phosphates en pentoses phosphates (**Figure 4**). Cette voie ne produit cependant ni ATP ni NADH, mais permet de générer du NADPH, qui est utilisé pour son pouvoir réducteur dans le cycle du glutathion (dans la lutte antioxydante) et pour la biosynthèse des acides gras et des stéroïdes. Outre le NADPH, la voie des pentoses phosphates fournit du ribose 5-phosphate (R5P) précurseur de la synthèse des nucléotides. Cette voie, qui s'effectue dans le cytoplasme, est composée de deux branches, une oxydative et l'autre non oxydative [15]. La branche oxydative commence par l'entrée du G6P via la G6PDH pour donner *in fine* du R5P et deux molécules de NADPH. Le R5P est le précurseur de phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP), lui-même précurseur des nucléotides. La branche non oxydative produit aussi du R5P mais à partir du F6P ou du G3P. L'avantage de cette branche réside dans sa réversibilité. Lorsque 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 [16]. Cependant, contrairement aux 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 source principale de R5P [17] [18] [19]. Deux enzymes importantes de cette branche non oxydative – transcétolase et transaldolase – sont souvent surexprimées dans les cellules tumorales [20]. 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 G3P et donc, à terme, de F-1,6BP, connu pour être un régulateur négatif de la G6PDH. Ainsi, la dépendance des cellules cancéreuses vis-à-vis de ces enzymes permettant de produire des riboses suggère que ces enzymes peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer.

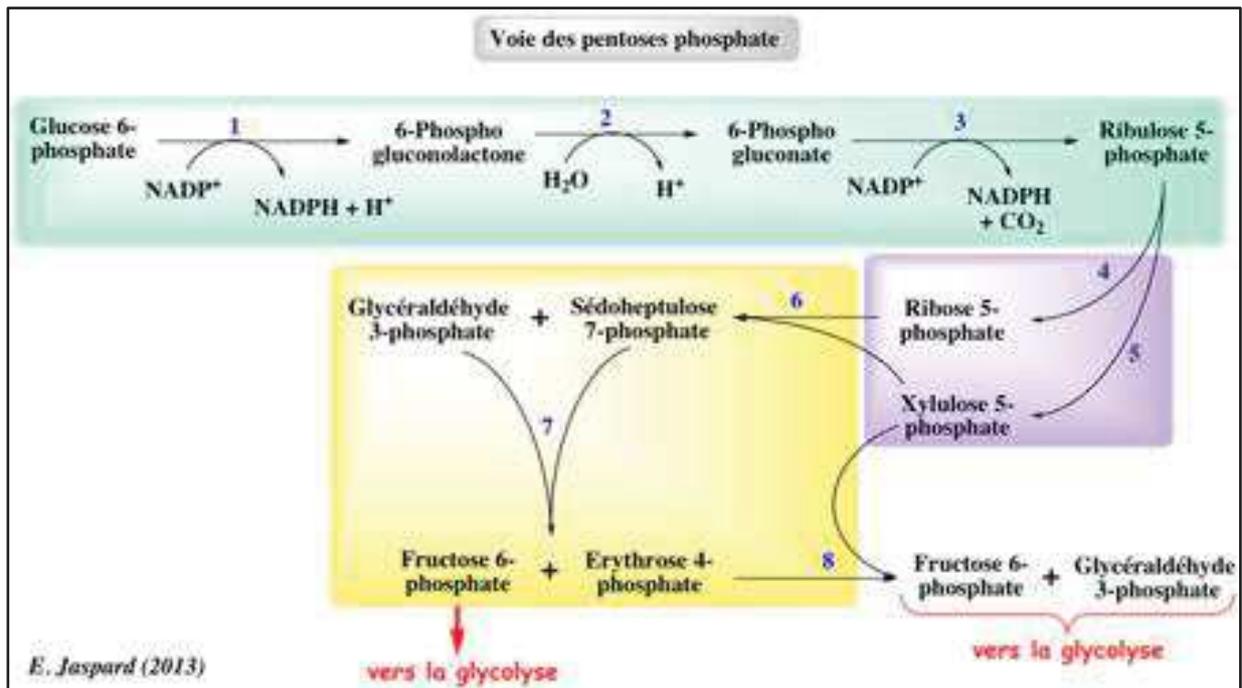


Figure 4 : La voie des pentoses phosphates. Schématisation des deux branches de la voie des pentoses phosphates. La branche oxydative composée de la phase 1 d'oxydation (verte), et la branche non oxydative composée de la phase 2 d'isomérisation (violette) et de la phase 3 de transfert des unités carbonées (jaune). Adapté de Jaspard et al (2013).

4) Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, ou « Tricarboxyl Acid Cycle » (TCA), est une voie métabolique découverte en 1930 [21]. Elle constitue un ensemble de 8 réactions à l'intérieur de la mitochondrie, aboutissant *in fine* à la synthèse d'ATP et de précurseurs biosynthétiques nécessaires à la synthèse des lipides, des acides aminés ou des acides nucléiques (**Figure 5**).

Bien que, dans les cellules cancéreuses, une majorité du pyruvate généré par la glycolyse soit convertie en lactate, une partie de ce pyruvate entre dans la mitochondrie pour être soit converti en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase (PC) soit converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le complexe de la PDH représente un carrefour clef pour le destin du pyruvate. Son activité est contrôlée principalement par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). Quand la PDK est active, elle phosphoryle la sous-unité α de la PDH du complexe E1, entraînant une inhibition de son activité [22]. L'activité de la PDK est typiquement plus élevée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales, suggérant que la conversion du pyruvate en acétyl-CoA est plus faible dans les cellules cancéreuses [23]. De plus, notre laboratoire a récemment montré que le facteur de transcription E4F1 était impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes codant pour des sous-unités enzymatiques et des régulateurs de la PDH [24] [25].

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. On comprend donc pourquoi il est important pour les cellules cancéreuses d'alimenter le cycle de Krebs. La cellule va utiliser des sources alternatives afin de garder ce TCA viable. Par exemple, il est possible de synthétiser du pyruvate à partir de l'alanine (Ala) via l'alanine amino transférase (ALAT) qui produit glutamate et 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 dispose, là, de deux entrées possibles : directement sous forme de malate en pénétrant dans la mitochondrie par la navette malate-aspartate ou sous forme de pyruvate lors de la conversion de ce malate en pyruvate par les enzymes maliques (ME). Comme évoqué plus haut, l'autre source qui alimente le TCA est la glutamine. L'oxydation de la glutamine produit de l' α -kétoglutarate qui est un intermédiaire du TCA [26]. On comprend alors mieux pourquoi les cellules cancéreuses sont dépendantes de cet acide aminé pour leur prolifération [26].

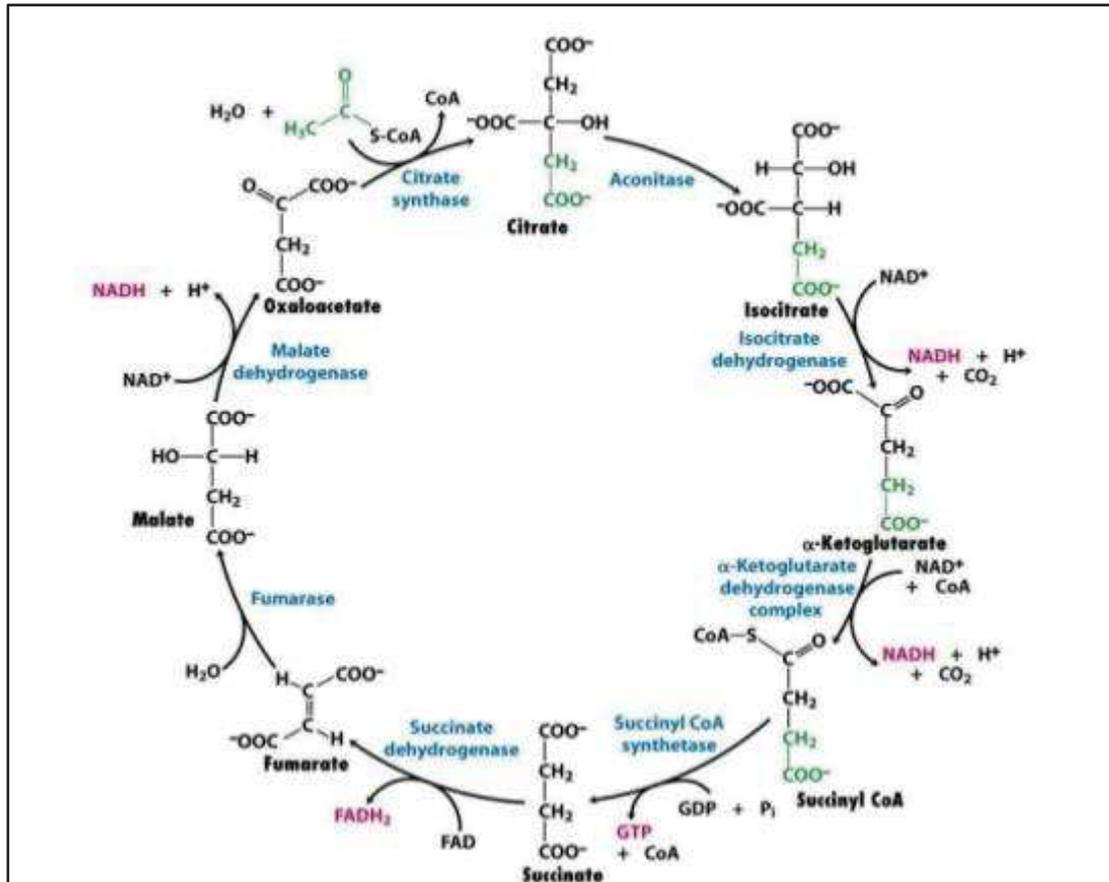


Figure 5 : Le cycle de Krebs. Ensemble des différentes réactions du cycle de Krebs. La décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA, ainsi que les réactions du TCA se produisent dans la matrice mitochondriale. Adapté de Freeman et al. (2012).

5) La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est un processus permettant la conversion de l'ADP en ATP grâce à l'énergie libérée par l'oxydation de donneurs d'électrons par la chaîne respiratoire située au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (**Figure 6**). Ce processus, qui nécessite de l'oxygène, fait intervenir 4 complexes protéiques : le complexe I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase), le complexe II (ou succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ou cytochrome b et c1) et le complexe IV (ou cytochrome c oxydase). Il permet aux cellules de régénérer leurs coenzymes réduites issues, par exemple, du cycle de Krebs ou de la β -oxydation des acides gras, et, grâce à un gradient électrochimique (généralisé par les différents complexes), de convertir l'ADP et le phosphate inorganique en ATP via l'ATP synthase.

Il est intéressant de noter que, dans des travaux récents auxquels j'ai contribué et qui seront détaillés dans la partie « Résultats », le laboratoire a montré que MDM2 pouvait avoir une activité au niveau de la mitochondrie et perturber l'activité du complexe I. Ces fonctions de MDM2 sur la respiration ont des effets physiologiques sur des cellules normales mais pourraient également être impliquées dans le développement tumoral [27].

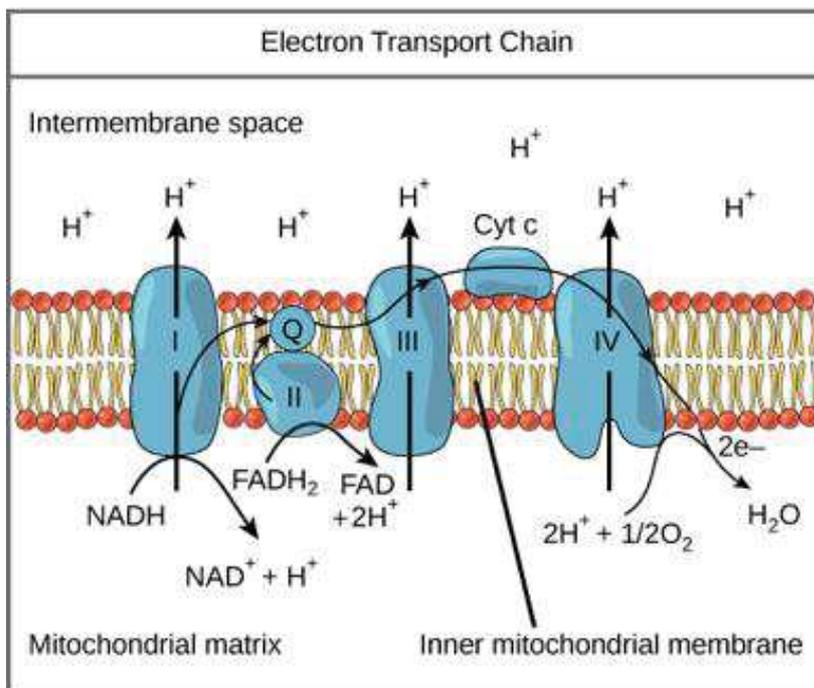


Figure 6 : Schéma de la chaîne respiratoire (Adapté de K. Hoffmeier [28]).

De manière générale, le rendement en ATP par molécule de glucose est beaucoup plus faible lorsque la glycolyse n'est pas couplée au TCA. Cependant, la production est en réalité beaucoup plus rapide que lorsque l'OXPPOS est impliquée. Cette production rapide d'ATP et, par conséquent, la production d'intermédiaires de biosynthèse rendent la glycolyse particulièrement adaptée au soutien de la croissance des cellules cancéreuses [29].

6) Le métabolisme de la sérine

Comme évoqué précédemment et décrit par Hannahan et Weinberg, les cellules cancéreuses présentent une reprogrammation métabolique avec notamment, dans la plupart des cas, une glycolyse accrue par rapport aux cellules saines. Les intermédiaires glycolytiques peuvent être intégrés à diverses voies métaboliques pour générer des nucléotides, des lipides, des acides aminés ou encore du NADPH, afin de répondre aux besoins de synthèse de biomasse. Parmi les voies métaboliques qui dérivent d'intermédiaires de la glycolyse, on retrouve la voie de la synthèse de la sérine.

La sérine est considérée comme un acide aminé non essentiel sur le plan nutritionnel, mais elle est indispensable sur le plan métabolique et joue un rôle majeur dans plusieurs processus cellulaires [30]. Il s'agit, en effet, d'un précurseur de plusieurs acides aminés, tels que la glycine et la cystéine, indispensables à l'élaboration des protéines. La sérine intervient aussi dans la régulation du statut redox, dans la mesure où elle est impliquée dans la production de NADPH, ainsi que dans la synthèse des précurseurs du glutathion. De par son importance pour le métabolisme du 1C, elle peut également fournir des éléments constitutifs des nucléotides, des lipides, des acides aminés et des cofacteurs, contribuant ainsi à la prolifération cellulaire [31] [32].

a) La biosynthèse *de novo* de sérine

La sérine peut être importée du compartiment extracellulaire, mais peut également être synthétisée par une voie intracellulaire. Même si la biosynthèse *de novo* de sérine, ou « Serin Synthesis Pathway » en anglais (SSP), ne contribue que faiblement à la quantité de sérine présente dans les cellules, elle constitue une voie métabolique majeure (**Figure 7**). Elle détourne environ 10 % du 3-PG de la glycolyse pour générer de la sérine, ainsi que des quantités équimolaires de NADH et d' α -cétoglutarate (α -KG) réduits. Elle consiste en trois réactions enzymatiques successives.

La phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) catalyse la première étape et produit le 3-phosphohydroxypyruvate (3-PPyr) par oxydation de la 3-PG couplé au NAD. Ensuite, le 3-PPyr est converti en phosphosérine par la phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT-1). Cette réaction, qui utilise comme cofacteur le glutamate, conduit à la production d' α -cétoglutarate. Enfin, par l'action de la phosphosérine phosphatase (PSPH), la phosphosérine est convertie en sérine.

Il est intéressant de noter que de nombreuses études font mention d'une activité élevée de la biosynthèse de la sérine dans plusieurs cancers, notamment le cancer du sein et le mélanome [33] [34]. Ainsi, cette voie métabolique contribuerait à la tumorigénèse [20]. En effet, il a été montré que *PHGDH* était amplifié de façon récurrente dans différents types de cancers [35] [36] [37]. D'autre part, des résultats récents ont révélé que dans les cellules cancéreuses, plusieurs facteurs pouvaient agir en tant qu'activateurs de la SSP. Par exemple, le faible niveau de sérine

intracellulaire conduit à l'activation de la kinase GCN2 (« General Control Non derepressible 2 kinase ») et améliore la traduction du facteur de transcription ATF4. Ces résultats font écho aux travaux du laboratoire sur la régulation de la SSP par le couple MDM2 / ATF4, décrits dans la partie « Résultats ». L'induction d'ATF4 augmente ensuite la transcription des gènes de l'enzyme SSP [38] [39].

L'activation directe des enzymes de la SSP est également associée à la capacité de PKM2 à maintenir la prolifération cellulaire dans un milieu dépourvu de sérine. En effet, l'isoforme PKM2 est le variant d'épissage du gène Pkm le plus répandu dans les tissus prolifératifs [40]. 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, telles que la voie de biosynthèse de la sérine. Il a été montré que la sérine était 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. À l'inverse, lors de carence en sérine, l'activité de PKM2 est réduite, et les intermédiaires de la glycolyse s'accumulent en vue d'alimenter la biosynthèse de la sérine et de maintenir l'état prolifératif des cellules [41] [42].

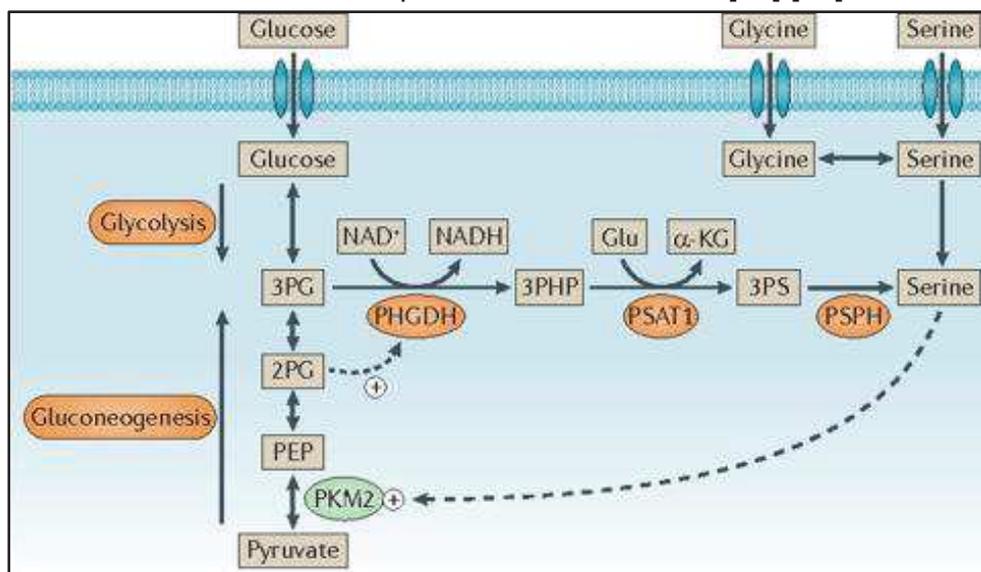


Figure 7 : La voie de synthèse de la sérine.

La sérine et la glycine peuvent être absorbées par les cellules ou synthétisées *de novo*. La voie de synthèse de la sérine (SSP) utilise le 3-phosphoglycérate (3PG) pour synthétiser de la sérine en trois grâce à la phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), à la phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT1) et à la phosphosérine phosphatase (PSPH). Aux concentrations physiologiques, la sérine est un activateur allostérique de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PKM2), qui catalyse la dernière étape de la glycolyse. Lorsque les cellules manquent de sérine, l'activité de PKM2 est réduite, ce qui entraîne le détournement du pool de 3PG dans la SSP. De plus, le 2-phosphoglycérate (2PG) est un activateur de la PHGDH. « + » Désigne un activateur. Les flèches en pointillé indiquent les régulations allostériques. (Adapté de Vousden et al (2016) [43].

La SSP peut également être régulée épigénétiquement. En effet, il a été prouvé que la méthyltransférase G9A de l'histone H3 Lysine 9 (H3K9) répondait à une déprivation en sérine nécessaire pour l'activation transcriptionnelle de cette voie [44]. De plus, une étude récente a montré que dans un large panel de lignées cellulaires du cancer du sein, l'hypoxie pouvait induire l'expression des enzymes de la SSP et que ce phénomène était médiée par HIF-1 et HIF-2 [45].

Enfin, il a été signalé que les suppresseurs de tumeur PKC- ζ et p53 réprimaient l'expression de PHGDH [46] [47] [48]. En effet, un déficit en PKC- ζ ou p53 dans les cellules cancéreuses favorise l'activité de PHGDH et entraîne l'activation de la SSP. Récemment, l'équipe du docteur K. Vousden a confirmé que des cellules déficientes pour p53 n'arrivaient pas à surmonter une carence en sérine et en glycine et subissaient 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, la cellule privilégiant alors l'utilisation du flux de sérine / glycine pour la synthèse du glutathion plutôt que pour la synthèse des nucléotides. Cet effet permet aux cellules tumorales de surmonter le stress oxydatif découlant de la carence en sérine, mais intervient, paradoxalement, au détriment de ses capacités prolifératives [49]. Ces expériences montrent, encore ici, qu'au-delà de ses fonctions dans des voies de réponses à des stress de natures variées, le suppresseur de tumeur p53 est un régulateur important du métabolisme cellulaire.

De manière générale, l'amplification génomique des enzymes de la SSP augmente l'activation de la voie de biosynthèse de la sérine-glycine dans les cellules cancéreuses. Cette activation élevée entraîne une multitude de conséquences métaboliques, telles que la synthèse accrue de macromolécules nécessaires à la prolifération des cellules tumorales. L'inhibition de PHGDH induit une diminution de la croissance des lignées de cellules cancéreuses qui arborent une amplification ou une surexpression de PHGDH, mais n'a eu aucun effet sur les lignées exprimant PHGDH à un niveau normal [50].

Sur la base de ces observations, on peut dire que les enzymes de la SSP semblent être des cibles thérapeutiques prometteuses pour la mise au point de nouveaux traitements anticancéreux [51]. L'élaboration de médicaments contre les enzymes de la SSP en est encore à ses balbutiements, et la recherche d'agents inhibiteurs appropriés pourrait aider à comprendre la biologie émergente de ces enzymes métaboliques (**Figure 8**).

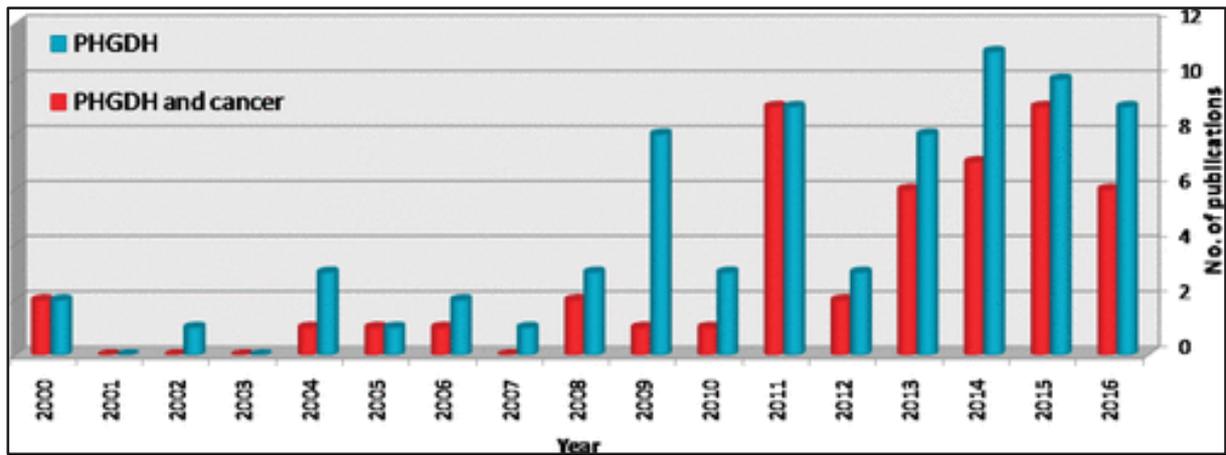


Figure 8 : Nombre de publications en lien avec PHGDH ou PHGDH et cancer depuis les années 2000. (Adapté de Feron, Frédérick et al 2017 [52])

b) Le transport de la sérine exogène

Comme évoqué précédemment, les cellules peuvent acquérir de la sérine par la synthèse *de novo* ou en l'important de l'environnement par auxotrophie. La sérine est un petit acide aminé neutre et, en tant que tel, peut être transportée par trois systèmes, les deux premiers étant des systèmes de transport dépendant du sodium. Le premier, ASC (alanine, sérine et cystéine), comprend deux membres : ASCT1 (codé par le gène *SLC1A4*) et ASCT2 (codé par le gène *SLC1A5*). Le second est le système de transport dépendant du sodium (préférant l'alanine), qui comprend SAT1 (ATA1) (codé par le gène *SLC38A1*) et SAT2 (ATA2) (codé par le gène *SLC38A2*). Le troisième est le système de transport alanine / sérine / cystéine (ASC) non dépendant du sodium, une famille d'antiporteurs neutres d'acides aminés [32], qui comprend Asc-1 (codé par le gène *SLC7A10*). Ces antiporteurs présentent un intérêt particulier car ils sont actifs même à l'état d'équilibre. Ainsi, par exemple, une molécule de sérine intracellulaire peut être remplacée par une molécule de sérine extracellulaire. Normalement, ce processus passe inaperçu, mais une étude récente [38] indique qu'il peut compliquer l'interprétation d'expériences de marquage d'isotopes lourds en établissant un flux d'échanges entre des espèces marquées et non marquées à travers la membrane plasmique.

Parmi les transporteurs de sérine, on peut également citer les serinC1-5. Cette famille de transporteurs membranaires permet l'incorporation de la sérine à travers les membranes et facilite la synthèse de deux lipides dérivés de la sérine : la phosphatidylsérine et les sphingolipides [53].

Les défauts de transport de la sérine résultent principalement d'une déficience en ASCT1, le principal transporteur de la sérine. Des études du système nerveux central ont récemment montré que chez des enfants présentant des mutations perte de fonction du gène *SLC1A4*, on pouvait observer des manifestations de pathologies neurologiques comparables à celles observées dans des anomalies de la voie de synthèse de sérine *de novo* [54] [55] [56].

De nombreuses tumeurs dépendent de la disponibilité en sérine extracellulaire étant donné son rôle dans de nombreuses voies de biosynthèse. Les xénogreffes de cellules cancéreuses du côlon HCT116 se développent environ deux fois moins vite lorsque les souris suivent un régime sans sérine ni glycine, par opposition à un régime normal [48]. Dans les lignées cellulaires humaines de cancer du côlon et de cancer du poumon, la prolifération dans un milieu contenant de la sérine sans glycine est identique à la prolifération dans un milieu contenant les deux acides aminés, Tandis qu'une déprivation de la sérine seule affecte autant la prolifération que le retrait des deux acides aminés ensemble [57]. Ces résultats soutiennent la notion selon laquelle la sérine est un acide aminé d'importance vitale, et cette conclusion est confortée par l'observation selon laquelle les cellules absorbent préférentiellement la sérine et excrètent de la glycine lorsque la sérine est disponible et ne consomment de la glycine que lorsque la sérine est épuisée. Cela pourrait

expliquer pourquoi l'appauvrissement en glycine est fortement corrélé au taux de prolifération de cellules cancéreuses [58], car les cellules qui prolifèrent le plus rapidement vont épuiser la sérine du milieu plus vite, puis passer à la consommation de glycine [57].

Moléculairement parlant, la consommation préférentielle de sérine par rapport à la glycine vient du fait que la conversion de sérine en glycine génère une unité carbonée pour le pool de folates. À l'inverse, la conversion de la glycine en sérine consomme une unité carbonée. De ce fait, un environnement riche en glycine pourrait limiter la disponibilité d'unités à un carbone pour la biosynthèse des nucléotides. Dans la biosynthèse des purines, la conversion du précurseur glycine-amide ribonucléotide (GAR) en AMP ou en GMP nécessite l'ajout de deux unités monocarbonées provenant du pool de folates. Les cellules alimentées avec de la glycine, mais pas de sérine, présentent une accumulation de GAR et un appauvrissement en AMP et en GMP, ce qui implique qu'elles ne possèdent pas suffisamment d'unités monocarbonées. Le formate exogène peut fournir des unités monocarbonées, et l'administration de glycine simultanément au formate peut favoriser la croissance des cellules [57]. Ces données indiquent que l'équilibre entre sérine et glycine affecte la disponibilité en folates et influence la capacité de prolifération des cellules cancéreuses.

Il est intéressant de noter que la présence ou l'absence du suppresseur de tumeur p53 est également un facteur déterminant dans la capacité d'une cellule à faire face à la déplétion de sérine extracellulaire. Lors de la croissance dans un milieu dépourvu de sérine et de glycine, les cellules cancéreuses du côlon humain p53 +/+ et p53 -/- montrent une augmentation de la production de sérine à partir d'intermédiaires glycolytiques et une diminution des taux d'ATP [48]. Toutefois, contrairement aux cellules p53 -/-, les cellules p53 +/+ s'adaptent à l'état de carence en sérine en subissant un arrêt transitoire du cycle cellulaire dépendant de p53 et p21 [48]. Alors que les cellules p53 -/- utilisent les faibles niveaux de sérine dont elles disposent pour poursuivre la biosynthèse des nucléotides, les cellules p53 +/+ dirigent temporairement leurs réserves de sérine vers la production de l'antioxydant GSH, ce qui permet aux cellules p53 +/+ de limiter leur stress oxydatif et de s'adapter à la privation de sérine. La prolifération de cellules p53 -/- privées de sérine peut être presque totalement rétablie si du pyruvate exogène est fourni en tant que source d'ATP via la phosphorylation oxydative et du GSH exogène ou de la N-acétylcystéine (NAC), un autre antioxydant, pour lutter contre les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

c) La sérine, la glycine et le métabolisme à un carbone (1C)

Le métabolisme du 1C impliquant les cycles du folate, le cycle de la méthionine et la transsulfuration, consiste en l'intégration d'unités carbonées issues d'acides aminés, notamment la sérine et la glycine, pour générer la biosynthèse de divers produits, comme des lipides, des nucléotides et des protéines, mais aussi pour maintenir l'état d'oxydo-réduction de la cellule ainsi que les substrats des réactions de méthylation [59]. Le rôle clé de ce cycle métabolique dans les cellules cancéreuses, longtemps considéré comme un processus de « gestion interne », commence à devenir plus clair du fait de sa capacité à l'élaboration de biomasse nécessaire à la croissance et la prolifération [60] (**Figure 9**).

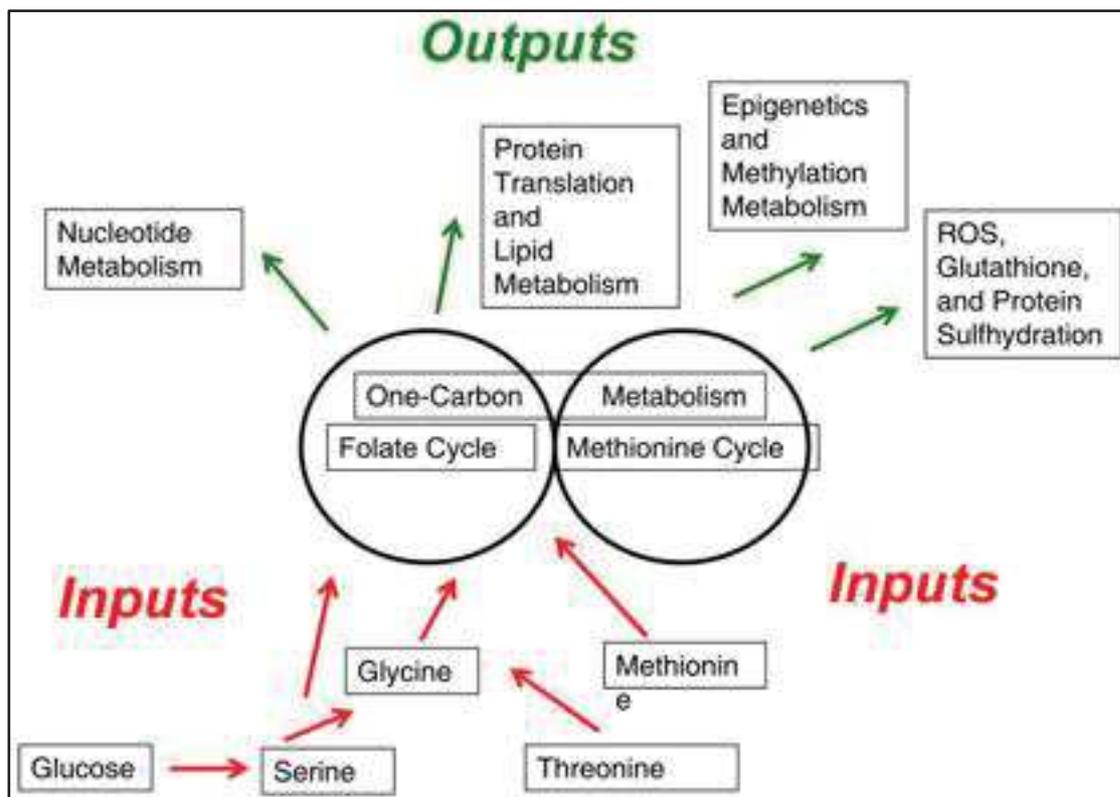


Figure 9 : Le métabolisme du 1C est un intégrateur du statut nutritionnel.

Les sources de nutriments de type acides aminés, soit importées, soit synthétisées *de novo* par la cellule, entrent dans le métabolisme d'un carbone. Cette voie métabolique peut être considérée comme un ensemble de deux unités (c'est-à-dire deux voies existant séparément) englobant les cycles du folate et de la méthionine. Au cours de ces cycles métaboliques, les nutriments sont transformés. Ce processus permet plusieurs sorties, notamment vers la synthèse des nucléotides, des protéines, des lipides, mais aussi de composés aux pouvoirs réducteurs ou des substrats pour les réactions de méthylation. (Adapté de Locasale (2013) [60]).

Une des réactions clés dans cette voie métabolique est la conversion de la sérine en glycine par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Cette réaction représente la source majeure de groupement méthyle du métabolisme 1C requis pour la synthèse *de novo* de nucléotides et la méthylation de l'ADN. Dans le génome humain, deux gènes *Shmt* ont été identifiés : *Shmt1*, qui code pour l'enzyme cytoplasmique (SHMT1), et *Shmt2*, qui code pour une forme mitochondriale (SHMT2) [61]. 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 folates provenant de la réaction dépendante des SHMT ainsi que du clivage de la glycine sont importants pour le maintien du pool de précurseurs servant de cofacteurs pour les réactions de méthylation et donc pour la stabilité de l'ADN.

La glycine est importante pour le maintien de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, elle participe à la biosynthèse de l'anneau des bases purines de par ses deux atomes de carbone et son atome d'azote. Elle 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 [58].

Le cycle du folate : le folate est importé dans les cellules et réduit par une série d'enzyme en tétrahydrofolate (THF). Le THF est converti en 5,10-méthylène-THF (me-THF) par SHMT. Cette étape est couplée au clivage de la glycine qui va fournir une unité carbonée importante pour la méthylation du THF. Ce produit est ensuite soit réduit en 5-méthyltétrahydrofolate (mTHF) par la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR), soit converti en 10-Formyltétrahydrofolate (F-THF). Le mTHF est déméthylé pour terminer le cycle du folate. Avec la déméthylation du mTHF, le carbone est donné dans le cycle de la méthionine par la méthylation de l'homocystéine par la méthionine synthase et son cofacteur Vitamine B12.

Le cycle de la méthionine : le cycle de la méthionine commence par le transfert, sur l'homocystéine, d'un carbone provenant du folate via le mTHF pour ainsi générer de la méthionine. La méthionine, à travers la méthionine adényltransférase (MAT), est utilisée pour générer la S-adénylméthionine (SAM), qui est déméthylée pour former la S-adénylhomocystéine (SAH). Après déadénylation par la S-adénylhomocystéine hydrolase (SAHH), la SAH est reconvertie en homocystéine, ce qui entraîne un cycle complet de la méthionine. On peut noter que SAM est utilisé en tant que donneur de méthyle dans les réactions de méthylation, soit pour les protéines (notamment les histones), soit pour les acides nucléiques (ADN, ARN) [62] [63]. De plus, une étude récente montre que l'absence de sérine exogène diminue fortement la synthèse de SAM et ainsi la méthylation de l'ADN et l'ARN (281), soulignant le rôle crucial de la sérine dans le métabolisme du 1C des cellules cancéreuses.

Enfin, une autre branche du métabolisme du 1C est la voie de transsulfuration. Cette voie est reliée au cycle de la méthionine par l'intermédiaire de l'homocystéine. La sérine peut se condenser enzymatiquement avec l'homocystéine pour générer de la cystathionine par la cystathionine synthase (CBS). La cystathionine est ensuite clivée par la cystathionine gamma-lyase (CTH) pour générer de l'alpha-Kétobutyrate (α KB) et de la cystéine, qui peuvent être utilisés pour la production de glutathion et par le métabolisme de la taurine.

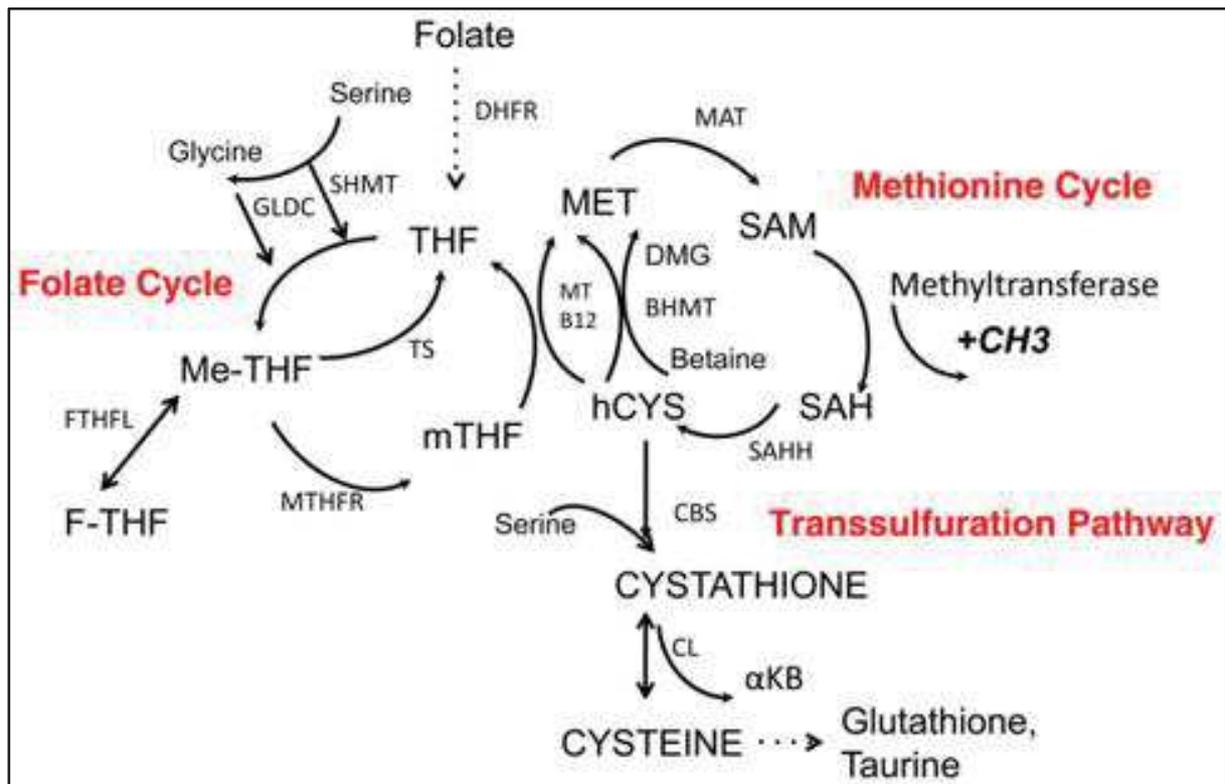


Figure 10 : Schéma du métabolisme à 1 carbone. (Adapté de Locasale (2013) [60]).

Il est intéressant de noter que de nombreuses études montrent que des mutations perte de fonctions sur des enzymes du métabolisme du 1C entraînent des défauts importants de croissance, soulignant ainsi le rôle clé de cette voie métabolique dans la modulation de la croissance cellulaire [60].

Des preuves génétiques et fonctionnelles récentes suggèrent également que l'hyper activation de cette voie est un moteur possible de l'oncogenèse et établit des liens avec le statut épigénétique cellulaire. C'est pour cette raison que de nombreux agents cliniques ciblant le métabolisme du 1C ont été développés ces dernières années.

7) La balance redox

Le métabolisme du 1C joue un rôle primordial dans les modifications du statut redox. Ses effets passent par la réduction de NADPH et l'oxydation de NADP⁺ : la tétrahydrofolate réductase réduit le THF, et cette réaction consomme une molécule de NADPH à chaque tour du cycle du folate [64]. Ils passent aussi par la production de glutathion, une des sorties de la voie de transsulfuration, également important pour le maintien du rapport NADPH et NADP⁺. Ce tripeptide est l'un des métabolites les plus abondants dans les cellules, atteignant souvent des concentrations jusqu'à cinq millimolaires [65]. Il contribue ainsi grandement à l'équilibre redox dans les cellules grâce à sa capacité à piéger et à réduire les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à maintenir le rapport NADPH / NADP⁺ approprié, indispensable au métabolisme anabolique [66]. Enfin, les produits de désulfhydratation dans la voie de transsulfuration conduisent également à la sulfhydratation des protéines. Ces modifications post-traductionnelles encore peu étudiées sont considérées comme un mécanisme de transduction de signal majeur, permettant entre autres des reprogrammations métaboliques en réponse à différents stress [67].

Dans cette partie, je décrirai tout d'abord comment le stress oxydant se manifeste dans la cellule via les ROS et son rôle dans le développement du cancer, puis comment le métabolisme de la sérine peut, via le glutathion, apporter une réponse de défense contre ces éléments toxiques pour la cellule.

a) Les ROS

Les ROS sont des sous-produits du métabolisme aérobie. En effet, ils comprennent l'ion superoxyde (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les radicaux hydroxyles (OH⁻), qui possèdent tous des propriétés chimiques leur permettant de réagir avec différentes cibles biologiques. Les ROS sont souvent associés au stress oxydatif, une situation délétère pour la cellule, induisant notamment des dommages sur les lipides, les protéines ou encore l'ADN [68]. Cependant, au cours des deux dernières décennies, il est devenu évident que les ROS servent également de molécules de signalisation pour réguler des processus biologiques et physiologiques [69]. C'est très tôt dans l'évolution que la nature a sélectionné un mécanisme de transduction du signal par lequel les ROS permettent à la cellule de s'adapter aux changements environnementaux que ce soit du type diminution en nutriments ou présence d'un environnement oxydant [70]. En effet, chez les procaryotes, il existe des mécanismes bien décrits dans lesquels les ROS activent directement les facteurs de transcription pour l'adaptation au stress [71] : on parle de signal redox.

Il est important de noter qu'au-delà de la spécificité des ROS sur leurs cibles, la compartimentation de la production de ROS dans les cellules est un facteur déterminant qui engendrera soit l'activation d'un signal redox, soit simplement l'apparition de dommages. En effet, pour que la signalisation redox soit efficace,

l'oxydation d'une protéine cible dépendant par exemple de H_2O_2 , est susceptible d'être proche de la source de production de H_2O_2 . Les protéines cibles de H_2O_2 (générées par les NADPH oxydases de la membrane plasmique) sont également situées sur la membrane plasmique. De plus, les mitochondries sont connues pour se déplacer de manière dynamique vers leurs cibles, permettant ainsi à H_2O_2 généré par les mitochondries d'activer certaines voies de signalisation [72]. De même, l'accumulation de superoxyde dans la matrice mitochondriale offre des résultats différents de ceux de l'accumulation de superoxyde dans le cytosol. En conséquence, le type de ROS et sa concentration locale déterminent ensemble si des dommages de type stress oxydatif ou une signalisation redox se produisent. Il semble donc logique que les organismes vivants doivent posséder des mécanismes de contrôles étroits pour maîtriser ces molécules réactives et ainsi maintenir l'homéostasie. Le niveau de ROS dépend d'une balance fine entre les mécanismes de production de ROS et les systèmes de défense antioxydants.

Ces dernières années, de nombreuses études ont mis en avant le rôle des ROS dans la régulation et le maintien de plusieurs processus physiologiques, parmi lesquels :

- La régulation du diamètre des vaisseaux sanguins par des niveaux modérés de ROS [73].

- La réponse immunitaire et l'inflammation. Au cours des deux dernières décennies, il a été largement démontré que les ROS sont des seconds messagers essentiels des cellules immunitaires innées et adaptatives [74][75]. En effet, les ROS sont impliquées lors de l'exposition à des pathogènes. La libération 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 [76].

Cependant, une augmentation des niveaux de ROS dans les cellules immunitaires peut aussi conduire à une hyperactivation des réponses inflammatoires, entraînant des lésions tissulaires et d'autres pathologies [77]. De plus, l'exposition des cellules à des excès de ROS aboutit à des modifications post-traductionnelles sur des protéines clés impliquées dans des processus vitaux, comme l'inflammation ou les maladies liées à l'âge, telles que le cancer [78].

- Le vieillissement cellulaire. La capacité de régénération des tissus et de prévention des dommages à ces tissus sont deux déterminants clés du vieillissement. L'une des théories originales sur le vieillissement, formulée il y a plus de 50 ans, est « la théorie radicalaire du vieillissement » de Denham Harman, qui propose que les ROS contribuent au vieillissement par leur réactivité vis-à-vis des macromolécules cellulaires, en particulier dans les mitochondries [79]. Les mitochondries endommagées suite à des défauts de phosphorylation oxydative produisent des quantités croissantes de ROS, altérant inévitablement la fonction cellulaire [80]. Cependant, les expériences visant à réduire les niveaux de ROS ont eu des résultats

mitigés, et on ne peut pas clairement établir que les dommages induits par les ROS sont la cause directe du vieillissement [81]. Au contraire, des preuves récentes suggèrent que la signalisation liée aux ROS est nécessaire pour le maintien des tissus et que l'augmentation des ROS peut activer des voies de stress cellulaires afin d'atténuer la dégénérescence des tissus et favoriser ainsi un vieillissement plus « sain » [82].

- La prolifération cellulaire. Des expériences ont prouvé que des facteurs de croissance, comme PDGF et EGF, peuvent augmenter rapidement et de façon transitoire la production de ROS, et que ces ROS étaient nécessaires pour la phosphorylation des récepteurs de ces facteurs de croissance [83]. Ces données proposent donc un modèle dans lequel l'activation du facteur de croissance doit s'accompagner d'un pic localisé de la production de ROS au niveau de la membrane plasmique. Les ROS inactivent alors l'action des phosphatases, renforçant ainsi les voies de signalisation prolifératives [84].

- La réponse à l'hypoxie (**Figure 11**). 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 qui, à son tour, va permettre une réponse métabolique adaptative [85].

En effet, les travaux de Ye [86] ont montré que l'expression de SHMT2 était positivement corrélée à l'expression des enzymes régulées par HIF en conditions d'hypoxie, confirmant ainsi la régulation de SHMT2 de manière dépendante de HIF-1 dans des cellules cancéreuses.

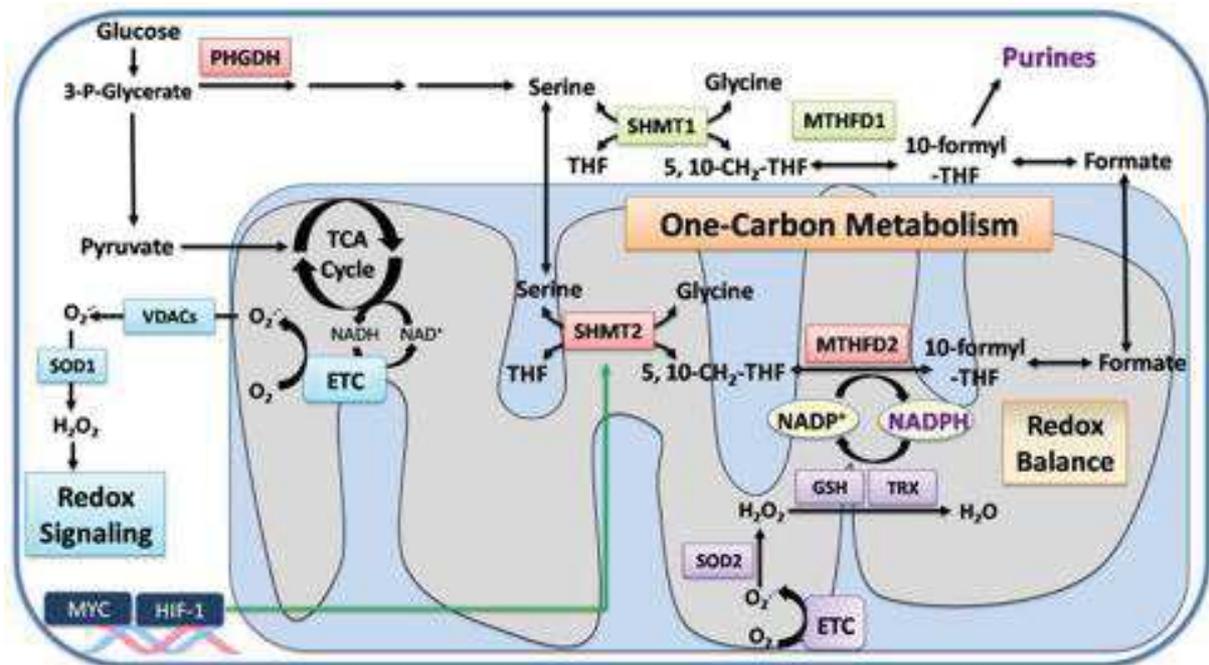


Figure 11 : Le catabolisme de la sérine maintient l'équilibre redox en condition d'hypoxie. Pendant l'hypoxie, les facteurs de transcription HIF-1 et MYC coopèrent pour réguler positivement SHMT2 dans la matrice mitochondriale des cellules et ainsi prévenir des niveaux incontrôlés de H_2O_2 potentiellement néfastes. L'hypoxie déclenche la production de superoxyde (O_2^-) dans les mitochondries par la chaîne de transport d'électrons (ETC). O_2^- est transporté vers le cytosol par des canaux anioniques dépendant de la tension (VDAC) et converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par SOD1. H_2O_2 agit en tant que molécule de signalisation pour promouvoir l'activation de (HIF). (Adapté de Martinez-Reyes et al. [87])

Au-delà de toutes ces 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 production de ROS ont été reportées dans la littérature. Parmi ces pathologies figurent le cancer [88], la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer [89], la crise cardiaque et l'infarctus du myocarde [90], la schizophrénie [91], les troubles bipolaires [92], le syndrome du X fragile [93], la drépanocytose [94], le lichen plan [95], le vitiligo [96], l'autisme [97], le diabète [98] et le syndrome de fatigue chronique [99].

b) Le glutathion, la défense cellulaire contre les ROS

Pour empêcher ou limiter les dommages cellulaires liés aux ROS, les cellules ont développé des systèmes de défense antioxydants très complexes faisant intervenir des systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Parmi les molécules dites « antioxydantes », on trouve la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, l'acide urique et le glutathion. Ce dernier est considéré comme principal antioxydant cellulaire.

Le glutathion (GSH) est un tripeptide composé d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine), requis lors de nombreux processus cellulaires pour le maintien et la régulation du statut redox des cellules. Il est présent dans tous les organismes eucaryotes, de la levure à l'homme. Il n'est absent que chez les protozoaires amitochondriaux. Il s'agit également d'un métabolite essentiel puisqu'en l'absence de biosynthèse du glutathion, une létalité embryonnaire a été observée chez la souris et des plantes. Dans les levures également, en l'absence de glutathion, la croissance cesse, sauf si le glutathion est fourni de l'extérieur. La fonction essentielle du glutathion réside dans son rôle dans les propriétés redox, la détoxification, la réponse au stress oxydatif et la fonction majeure de stockage de la cystéine. On trouve le glutathion principalement dans le cytosol, où a lieu sa synthèse, puis il est redistribué dans les différentes organelles cellulaires, telles que la mitochondrie, le noyau et le réticulum endoplasmique [100]. 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 au repliement correct des protéines [101]. 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) [102]. 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 12**) –, pouvant eux-mêmes être issus de voies métaboliques diverses (**Figure 13**). 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 [103]. La seconde enzyme requise pour cette synthèse *de novo* est la glutathion synthase (GS). Celle-ci catalyse l'addition de glycine au dipeptide formé précédemment par la GCL pour 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.

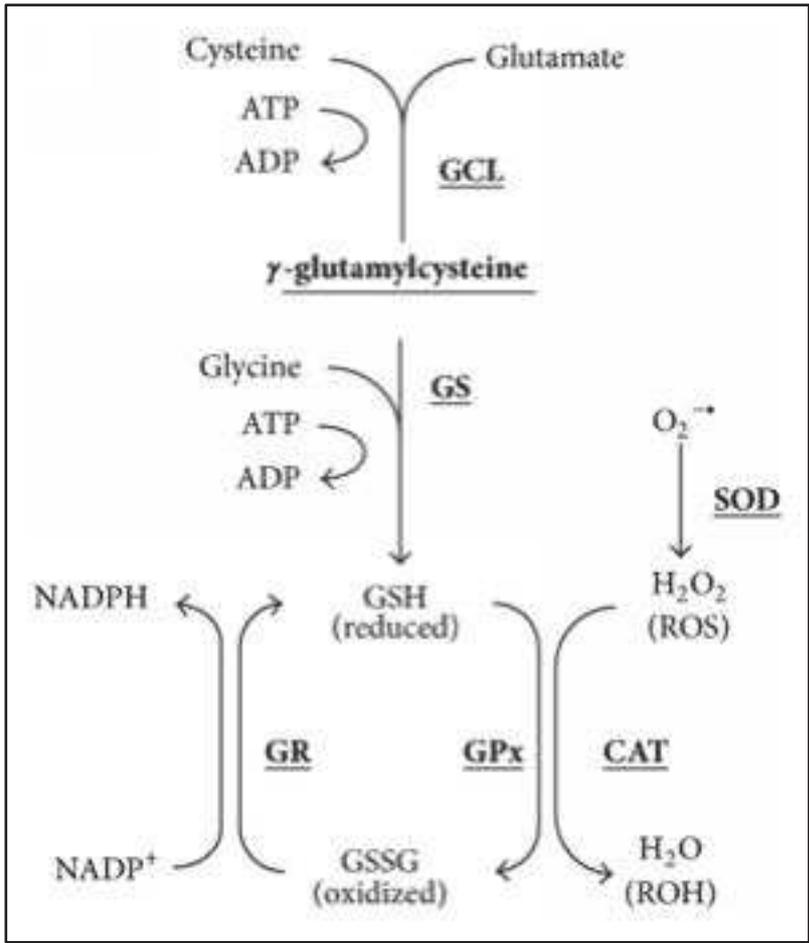


Figure 12 : Cycle du glutathion.
 Schéma de la formation du glutathion faisant intervenir les acides aminés glutamate, cystéine et glycine, et du cycle permettant de détoxifier la cellule des ROS à partir du GSH.
 (Adapté de Simpson, Pase et al. [104])

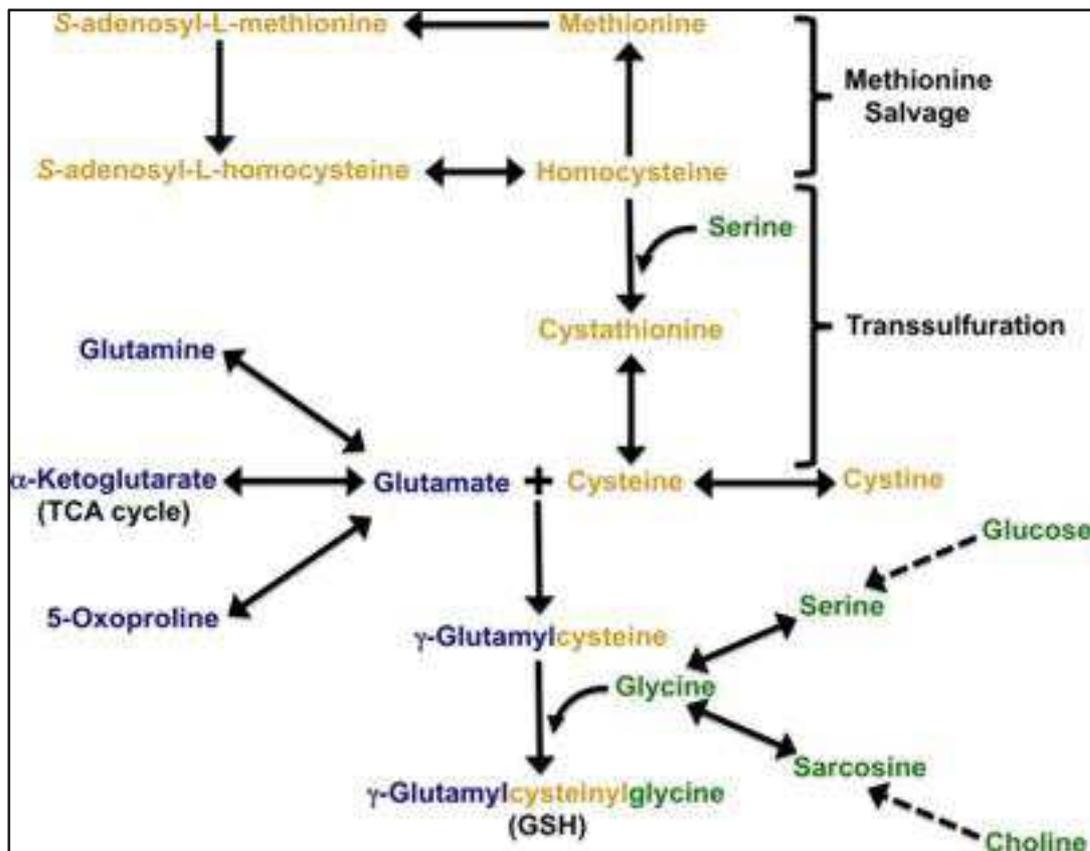


Figure 13 : Les voies métaboliques pour les trois acides aminés nécessaires à la biosynthèse du GSH sont décrites et codées par couleur selon les voies d'approvisionnement. En jaune, la cystéine, liée au métabolisme de la méthionine et la voie de transsulfuration [105][106] ; en vert, la glycine, directement liée aux niveaux de glucides, de sérine et de choline [60], et en bleu, le glutamate, lié aux niveaux de glutamine et pouvant provenir du cycle de la proline ou encore du TCA [107]. Comme évoqué précédemment, le métabolisme du 1C est essentiel à la voie de la méthionine et de la glycine et, de fait, à la synthèse du glutathion. (Adapté de Lu (2013) [103].

Pour lutter contre les ROS, la cellule fait également intervenir des enzymes anti-oxydantes. On peut citer la superoxyde dismutase (SOD), une métalloprotéine qui existe sous plusieurs formes se distinguant 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 [108]. On retrouve aussi la catalase ou CAT, 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 [109].

Les autres enzymes majeures intervenant dans le contrôle de la balance redox sont présentes dans le métabolisme du glutathion. La glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST) sont des enzymes qui agissent de manière coordonnée (**Figure 12**).

GPX est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais présente 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.

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.

GST 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 [110].

c) Les ROS et le cancer

Les cellules cancéreuses « détournent » la machinerie cellulaire en activant de manière constitutive les voies des facteurs de croissance afin de soutenir la croissance et la prolifération cellulaires. Cela permet aux cellules cancéreuses de s'adapter aux conditions nutritionnelles environnantes, de survivre au stress et de proliférer en permanence. En conséquence, l'hyper métabolisme des cellules cancéreuses provoque une génération abondante de ROS provenant des mitochondries, du réticulum endoplasmique et des oxydases du NADPH [111]. Les premières observations réalisées il y a plus de 20 ans ont montré que les cellules cancéreuses généraient des taux de ROS plus élevés que leurs homologues non transformés [112]. Il a été supposé que ces niveaux élevés de ROS provoquaient une instabilité génomique favorisant la tumorigenèse [113]. Cependant, l'instabilité chromosomique fut, peu de temps après, imputable à la perte de p53 et à d'autres mécanismes favorisant l'aneuploïdie. Dans la littérature, il est encore compliqué aujourd'hui d'évaluer si les ROS sont, de manière générale, la cause ou une conséquence des processus de développements tumoraux du fait de leurs interconnexions avec des suppresseurs de tumeur tels que pRB, PTEN et p53. On peut néanmoins affirmer que suivant les situations, les ROS peuvent être les deux.

Les cellules cancéreuses génèrent des niveaux élevés de ROS pour activer les voies de signalisation proximales qui favorisent la prolifération, la survie et l'adaptation métabolique (c'est-à-dire la biologie redox). Cependant, cette production de ROS est contrebalancée par un taux tout aussi élevé d'activité antioxydante afin de maintenir l'équilibre redox [45]. Si les cellules cancéreuses ne contrôlent pas leurs niveaux de ROS, elles sont alors susceptibles de mourir des suites du stress oxydatif [46, 47]. Les niveaux de ROS à l'état d'équilibre dans les cellules cancéreuses sont déterminés à la fois par le taux de production de ROS et par le taux de piégeage des ROS (**Figure 14**). Ainsi, à l'état d'équilibre, les cellules cancéreuses peuvent présenter une augmentation ou une diminution globale des ROS par rapport aux cellules normales. De plus, les voies de signalisation sensibles au peroxyde d'hydrogène sont localisées aux sources de génération des ROS, ce qui permet leur activation malgré l'activité antioxydante globale élevée des cellules cancéreuses qui protège contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif.

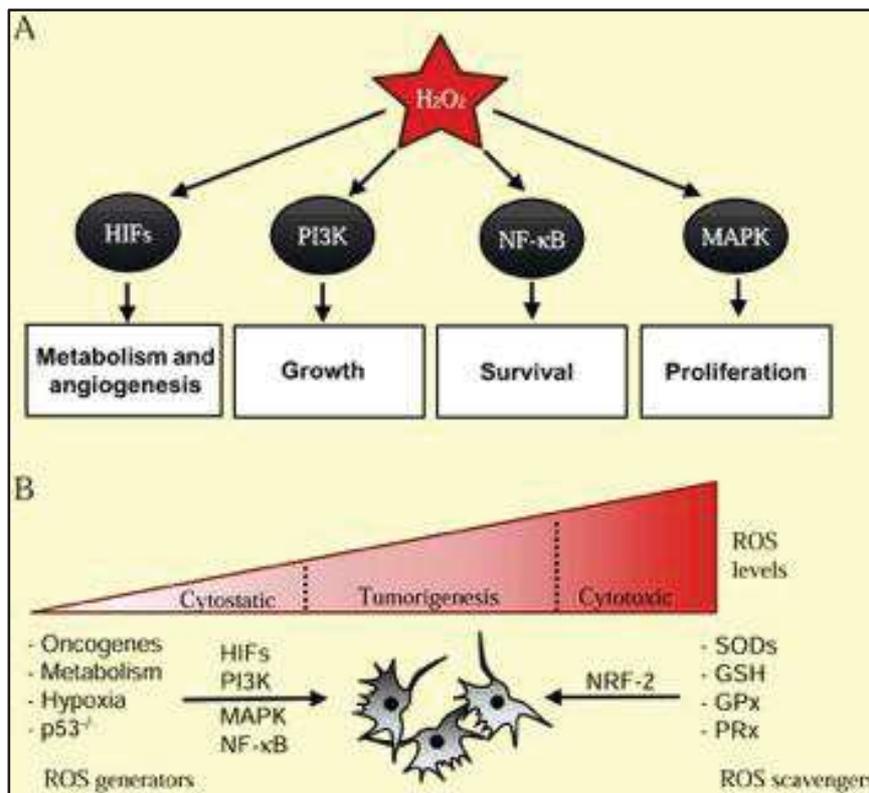


Figure 14 : La réponse antioxydante, une balance complexe.

(A) Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est nécessaire à l'activation d'un certain nombre de voies impliquées dans la prolifération cellulaire. (B) Les cellules cancéreuses génèrent des niveaux plus élevés de ROS, qui sont essentiels pour la tumorigenèse. Des altérations génétiques menant à l'activation d'oncogènes (PI3K, MAPK, HIF, NF-κB) et une perte de suppresseurs de tumeurs (p53) coordonnent un état d'oxydoréduction élevée. Les ROS sont également générés par une augmentation du métabolisme oxydatif et une hypoxie dans les tumeurs à croissance rapide. Les cellules cancéreuses expriment également des niveaux élevés d'antioxydants cellulaires (SOD, GSH, GPx, PRx) en partie par le biais de NRF-2 afin de se protéger contre la mort cellulaire induite par le stress oxydatif.

Le principal mécanisme par lequel les cellules cancéreuses augmentent leurs protéines antioxydantes consiste à activer le facteur de transcription facteur nucléaire 2 (NRF2) lié au facteur nucléaire de transcription érythroïde 2 [48]. Un taux de ROS élevé oxyde les résidus de cystéine sensibles au rédox sur KEAP1, ce qui entraîne la dissociation de KEAP1 et de NRF2. Par la suite, NRF2 effectue une translocation vers le noyau, une hétérodimérisation avec une petite protéine MAF et une liaison à des éléments sensibles aux antioxydants (ARE) au sein de la région régulatrice de plusieurs gènes antioxydants. Outre les ROS élevés, les voies de signalisation, telles que ERK MAPK et PI3K, peuvent activer NRF2. De plus, certaines cellules tumorales présentent des mutations de KEAP1, ce qui entraîne l'activation constitutive de NRF2 [49]. La perte de NRF2 dans les cellules cancéreuses augmente le stress oxydatif, entraînant une diminution de la tumorigenèse [50]. Il est important de noter que la perte de NRF2 diminue plusieurs systèmes de défense antioxydants, faisant ainsi augmenter plusieurs types de ROS (c'est-à-dire les radicaux superoxyde, peroxyde et hydroxyle) à un seuil qui provoque des lésions des cellules cancéreuses. Cependant, la perte d'un système de défense antioxydant spécifique peut entraîner une élévation des niveaux de ROS à des niveaux inférieurs au seuil de dommages. Dans ce scénario, les niveaux élevés de ROS hyper-activent les voies de signalisation pour favoriser la tumorigenèse, tel qu'il est observé lors de la perte de peroxirédoxine I, qui augmente la tumorigenèse [51, 52]. On peut également rappeler que le catabolisme de la sérine par le biais du métabolisme monocarboné maintient l'équilibre redox mitochondrial au cours de l'hypoxie (via HIF). (Adapté de Schieber et Chandel (2014) [114].

d) Cibler les ROS comme stratégie thérapeutique

Les ROS jouent un double rôle dans les cancers. Ils peuvent contribuer à leur développement, mais paradoxalement, différentes études ont montré que les ROS pouvaient également inhiber la prolifération tumorale dans différentes cellules cancéreuses [115] [116]. Cette dualité peut se retrouver dans les voies de signalisation activées au cours de la progression tumorale. Par exemple, les ROS participent à l'activation de la voie Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 et de la voie p38MAPK, dont les effets sont 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 mis en évidence que de fortes quantités de ROS pouvaient activer plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p16INK4A, pRb, et PKC δ [117][118][119], conduisant alors à la sénescence des cellules cancéreuses.

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.

Il devient ainsi problématique d'aborder le traitement par ROS dans le cancer : les traitements doivent-ils viser à réduire les niveaux de ROS pour prévenir la signalisation ou à les augmenter pour tuer sélectivement les cellules cancéreuses ? Des essais cliniques chez l'homme ont montré que le traitement randomisé en double aveugle avec les antioxydants β -carotène, vitamine A et vitamine C n'avait conclu à aucun bénéfice significatif, voire à un effet néfaste, de ces agents dans la prévention du cancer [69] [120]. Cette observation renforce la notion selon laquelle les ROS contribuent à la suppression de tumeurs. Lors d'une conférence à laquelle j'ai pu assister durant ma thèse, le docteur Navdeep Chandel s'amusait de ses résultats en suggérant de manger plus de cheeseburgers que d'aliments aux propriétés antioxydantes.

Blague à part, il est cependant possible que cibler des antioxydants qui s'enrichissent spécifiquement dans les cellules cancéreuses ou qui empêchent la production localisée de ROS à partir de mitochondries et de NADPH oxydases puisse apporter un bénéfice clinique. Bien que les essais cliniques chez l'homme portant sur le traitement du cancer par oxydation soient en cours, il est de plus en plus évident que l'augmentation du taux de ROS par de petites molécules peut induire sélectivement la mort des cellules cancéreuses en désactivant les antioxydants [70-72] [118]. Cette approche comporte deux mises en garde. Premièrement, si les niveaux de ROS ne sont pas suffisamment élevés dans la cellule cancéreuse, le traitement activerait simplement davantage les voies NF- κ B, PI3K, HIF et MAPK pour favoriser la tumorigenèse. De plus, les agents ne doivent désactiver que les antioxydants des cellules cancéreuses et non ceux des cellules normales.

Étant donné que le rôle des ROS et la sensibilité aux oxydants et aux antioxydants diffèrent probablement d'un type de cancer à l'autre, continuer à tester *in vivo* les

oxydants et les antioxydants permettra, espérons-le, de trouver de nouveaux agents à ajouter aux protocoles de chimiothérapie classiques existants.

8) La biosynthèse des acides nucléiques

La biosynthèse des nucléotides est l'un des principaux produits du métabolisme du 1C. Ce processus moléculaire limite la prolifération rapide des cellules cancéreuses en fournissant les éléments de base à la synthèse de l'ADN : les purines et les pyrimidines. La biosynthèse des purines et des pyrimidines nécessite des cofacteurs générés par la voie du métabolisme du 1C. C'est pourquoi de très nombreuses molécules ont été développées dans le but de cibler le métabolisme à 1C ou la synthèse des nucléotides, parmi lesquelles le méthotrexate, le pralatrexate, le fluorouracil (5-FU), la gemcitabine et la thiopurine [121].

Les pyrimidines :

La biosynthèse *de novo* des pyrimidines peut être simplifiée comme étant la formation de l'UMP (uridine 5'-monophosphate), considérée comme le précurseur central du métabolisme des pyrimidines puisque tous les autres nucléotides pyrimidiques peuvent être synthétisés à partir de ce composé (**Figure 15**). La biosynthèse *de novo* de l'UMP consiste en six étapes enzymatiques séquentielles demeurées intactes tout au long de l'évolution et qui sont pratiquement universelles chez les procaryotes jusqu'aux mammifères. La première étape de la voie débute par la synthèse de carbamoyl phosphate à partir de glutamine, de bicarbonate (HCO_3^-) et de 2 moles d'ATP. Le cycle pyrimidique se construit alors pour aboutir à la formation d'orotate, puis une conjugaison avec du phospho-ribosyl-pyrophosphate (PRPP) va permettre la synthèse d'UMP. À cet instant, la synthèse de l'UMP ne nécessite pas les cofacteurs du 1C. Par la suite, l'UMP via l'UDP peut être converti en dUMP (pour la synthèse ultérieure de dTTP) ou d'autres nucléotides, tels que UTP, CTP et dCTP. La conversion du dUMP en dTMP est médiée par la thymidylate synthase (TS) et nécessite l'acide 5,10-méthyltétrahydrofolique (un dérivé de l'acide folique) en tant que donneur du 1C. Cette réaction est très importante pour la biosynthèse des nucléotides, et la TS est d'ailleurs une cible pour plusieurs médicaments utilisés dans le traitement du cancer [121].

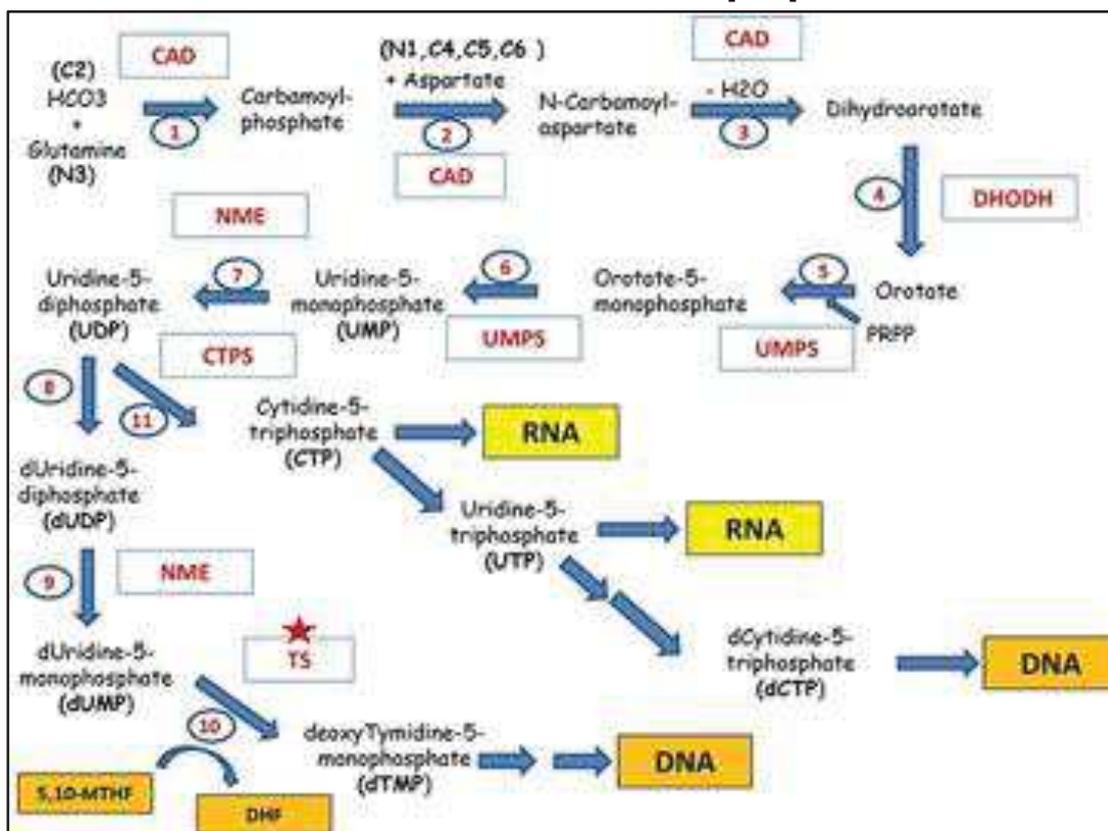


Figure 15 : Les réactions de la biosynthèse des pyrimidines. Les enzymes sont indiquées en rouge. Les futures positions des atomes dans les nucléotides sont indiquées entre parenthèses. Les étoiles rouges indiquent les enzymes actuellement explorées en tant que cibles thérapeutiques. (Adapté de Barlev (2017) [121]).

Les purines :

Contrairement aux pyrimidines, la synthèse des purines commence par la transformation du PRPP, qui sera suivie de la construction, étape par étape, de l'anneau purique (**Figure 16**). Le cycle des purines fait intervenir plusieurs composants : la glycine, qui est le précurseur le plus utilisé (donneurs d'atomes C4, C5 et N7), HCO³⁻, le donneur du C6, la glutamine (donneur de N3 et N9), l'aspartate (le donneur pour N1) et le cofacteur du 1C, l'acide 10-formyltétrahydrofolique, qui est un donneur pour le C2 et le C8. L'intermédiaire central pour les purines est l'inosine-monophosphate (IMP). La génération IMP à partir de PRPP nécessite cinq enzymes, dont trois sont multifonctionnelles (GART, PAICS, ATIC). Les réactions, catalysées par GART et ATIC (ajout des atomes C2 et C8), nécessitent l'acide 10-formyltétrahydrofolique produit par MTHFD1 et MTHFD2 au cours du cycle du folate. Par la suite, l'IMP peut être converti soit en AMP, soit en GMP. Cette réaction est la première étape limitante de la biosynthèse de la guanosine et de l'adénosine. Elle est contrôlée par l'IMPDH, considéré comme une enzyme clef dans la synthèse des nucléotides et donc une cible de choix pour les traitements anticancéreux.

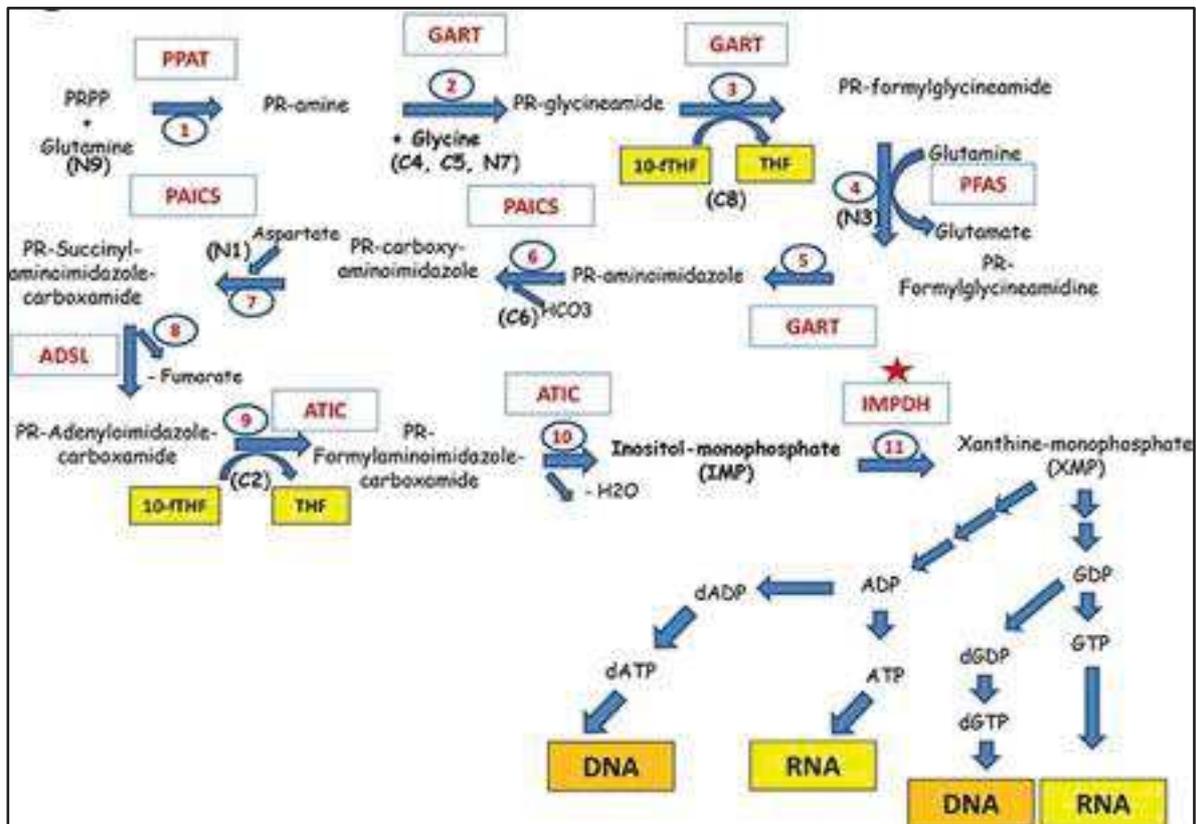


Figure 16 : Les réactions de la biosynthèse des purines. Les enzymes sont indiquées en rouge. Les futures positions des atomes dans les nucléotides sont indiquées entre parenthèses. Les étoiles rouges indiquent les enzymes actuellement explorées en tant que cibles thérapeutiques. (Adapté de Barlev (2017) [121]).

II - Le suppresseur de tumeur p53

En plus de leur capacité d'induire et de maintenir des signaux de stimulation de croissance, les cellules cancéreuses doivent également contourner de puissants programmes qui régulent négativement la prolifération cellulaire. Nombre de ces programmes dépendent de l'action des gènes dits « suppresseurs de tumeurs ». Des dizaines de suppresseurs de tumeurs qui agissent de différentes manières pour limiter la croissance et la prolifération cellulaires ont été découvertes chez l'animal ou chez l'Homme. Les deux suppresseurs de tumeurs archétypes codent pour les protéines RB (associées au rétinoblastome) et TP53 (« Transformation related Protein p53 ») et fonctionnent comme des nœuds de contrôle centraux pour deux mécanismes de régulation cellulaire complémentaires qui régissent le devenir des cellules en matière de prolifération ou, à l'opposé, d'activation des programmes de sénescence et d'apoptose.

L'activation des oncogènes et l'inactivation des suppresseurs de tumeurs sont des mécanismes largement étudiés dans le développement et la progression du cancer. Parmi eux, le suppresseur de tumeur p53 reste le plus étudié avec environ 60 000 articles publiés ces 30 dernières années [122]. En effet, la perte de ce « gardien du génome » et de son gène *TRP53*, codant pour le suppresseur de tumeur p53, est une étape importante de la carcinogenèse. Il est reporté que des mutations inactivatrices de p53 ont été observées dans plus de 50 % des tumeurs humaines, tandis que l'autre moitié présente des altérations génétiques de régulateurs situés en amont ou en aval de cette voie p53, conduisant, *in fine*, à l'inactivation fonctionnelle de la cascade moléculaire dans laquelle intervient p53 [123].

1) Les fonctions de p53

La fonction majeure de la protéine p53 est celle d'un facteur de transcription capable de réguler positivement ou négativement un très large éventail de gènes cibles impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose ou encore la réparation à l'ADN. En effet, des études structure/fonction ou de réponse à des stress cellulaire (de type hypoxie, agent perturbant l'ADN, activation d'oncogènes, etc.), par exemple, ont montré que p53 pouvait se retrouver accumuler dans le noyau et fixer l'ADN de façon spécifique [123].

p53 reconnaît une séquence nucléique (composée de deux copies d'un motif de 10 paires de bases) appelée séquence ER (pour élément de réponse à p53) (**Figure 17**). Les gènes possédant ce motif ER peuvent voir leur expression activée par p53. La nature des gènes impliqués dans ce type de régulation est souvent associée aux fonctions « tumeurs suppresseur » de p53. En effet, la quasi-totalité des formes mutées de p53 provenant de tumeurs présentent un défaut de liaison à l'ADN [123]. D'un autre côté, p53 est également capable de réguler négativement l'expression de gènes cibles en interagissant avec les composants de l'appareil de transcription [124].

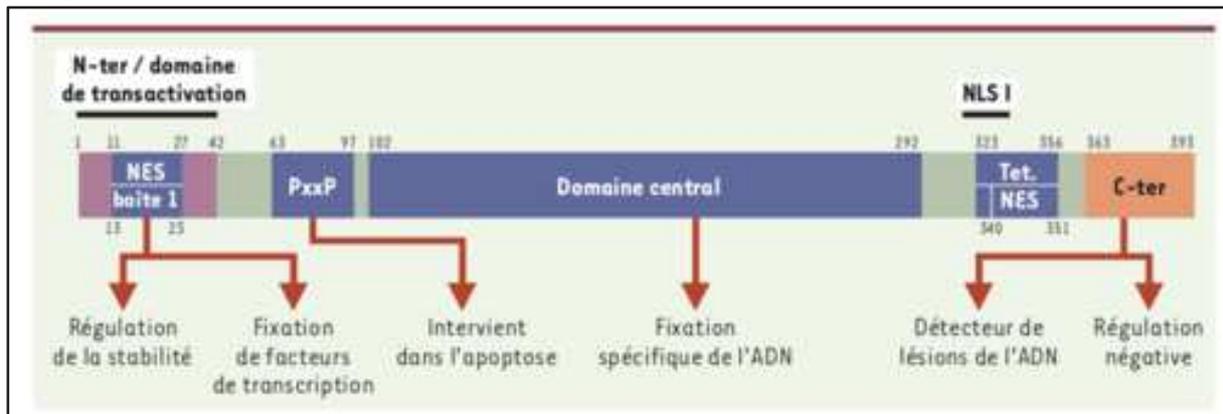


Figure 17 : Domaines structuraux et fonctionnels de la protéine p53. La protéine p53 compte 393 acides aminés. Elle comprend notamment un domaine acide ou domaine de transactivation (acides aminés 1-42), un domaine PxxP riche en proline, supposé nécessaire pour réguler la stabilisation de p53 et l'apoptose, un domaine central (acides aminés 102-292) de fixation spécifique à des séquences d'ADN et un domaine extrême C-terminal (acides aminés 363-393) de régulation négative de la fixation spécifique à l'ADN et fonctionnant comme détecteur de lésions de l'ADN (Adapté de Leblanc et May (2002) [125]).

Depuis la découverte des premiers gènes cibles régulés par p53 au début des années 1990 grâce aux progrès technologiques, cette liste de gènes ne cesse de s'allonger. En 2014, on estime à environ 1 200 le nombre de gènes régulés directement par p53 [126]. D'un autre côté, la réponse transcriptionnelle globale de p53, comprenant régulation directe et indirecte, est bien plus vaste mais aussi extrêmement complexe et partiellement connue. En effet, bien que p53 joue un rôle essentiel dans des 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. Ainsi, il a été démontré que p53 ciblait l'activation de gènes cibles impliqués dans le métabolisme énergétique [127] [128] [34] [129], l'autophagie [130], la réparation de dommages génotoxiques [131], la survie cellulaire et la régulation du stress oxydatif [132], l'invasion et la motilité [133], la sénescence [134], l'angiogénèse [135] ou encore la différenciation [136] (**Figure 18**).

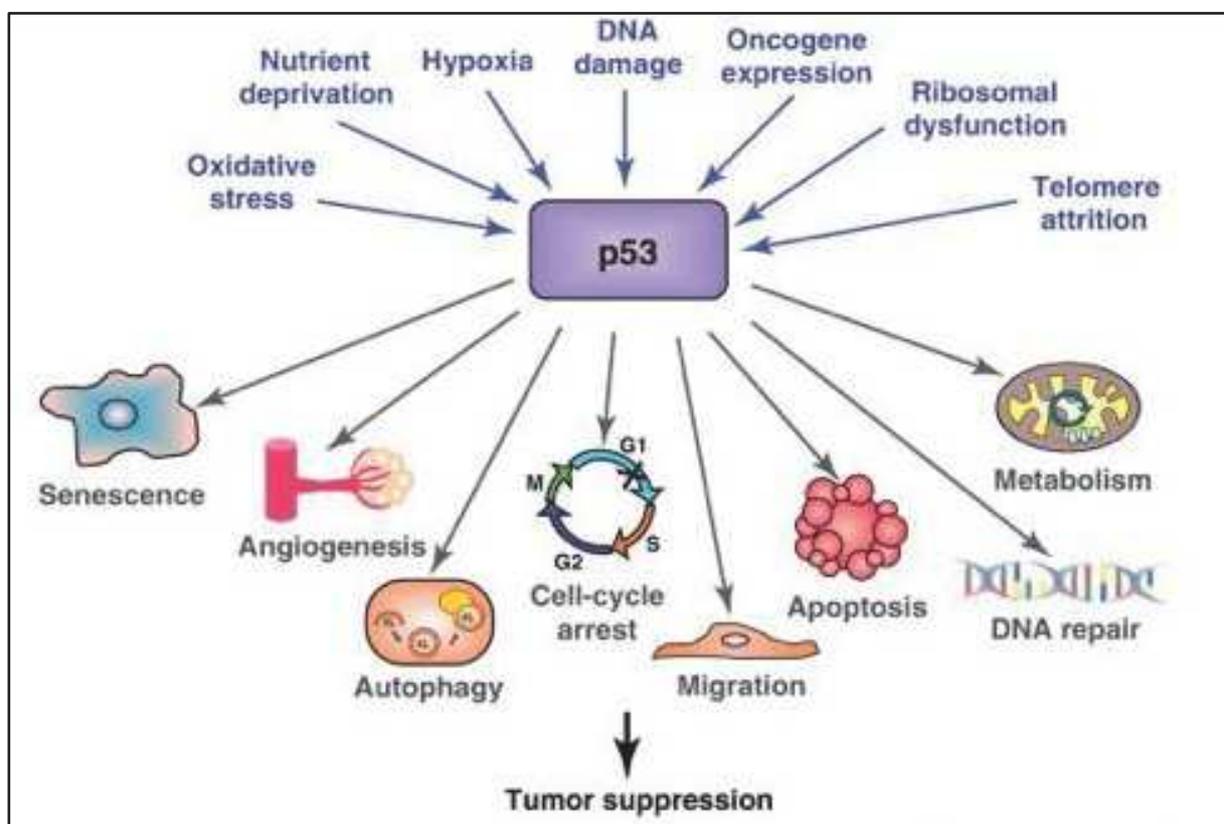


Figure 18 : p53 répond à de nombreux signaux de stress et régule diverses réponses. En réponse à des stress de natures diverses, p53 peut se fixer à la chromatine et agir en tant que facteur de transcription sur plusieurs gènes cibles afin de réguler différents destins cellulaires, tels que l'autophagie, l'arrêt du cycle cellulaire et le contrôle du métabolisme. (Adapté de Forbes (2014) [137].

2) p53 et le contrôle du métabolisme

L'étude de la reprogrammation métabolique par les cellules cancéreuses, est devenue ces dernières années un axe de recherche en plein essor. Les « hallmarks of cancer » d'Hanahan et Weinberg impliquent non seulement un contrôle dérégulé de la prolifération cellulaire, mais également des modifications du métabolisme énergétique afin de supporter la croissance et la division cellulaires. Les travaux récents de nombreux laboratoires montrent qu'au-delà de ses fonctions connues dans le contrôle de la prolifération, de la sénescence ou de la mort cellulaire, p53 joue de multiples rôles dans le contrôle du métabolisme énergétique, et qu'il est lui-même régulé par de nombreux changements métaboliques. En effet, parmi la multitude de gènes cibles régulés par p53, on trouve de nombreux gènes clés du métabolisme contrôlant notamment la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, la phosphorylation oxydative, le métabolisme des lipides ou celui de certains acides aminés non essentiels, tels que la glutamine et la sérine (**Figure 19**).

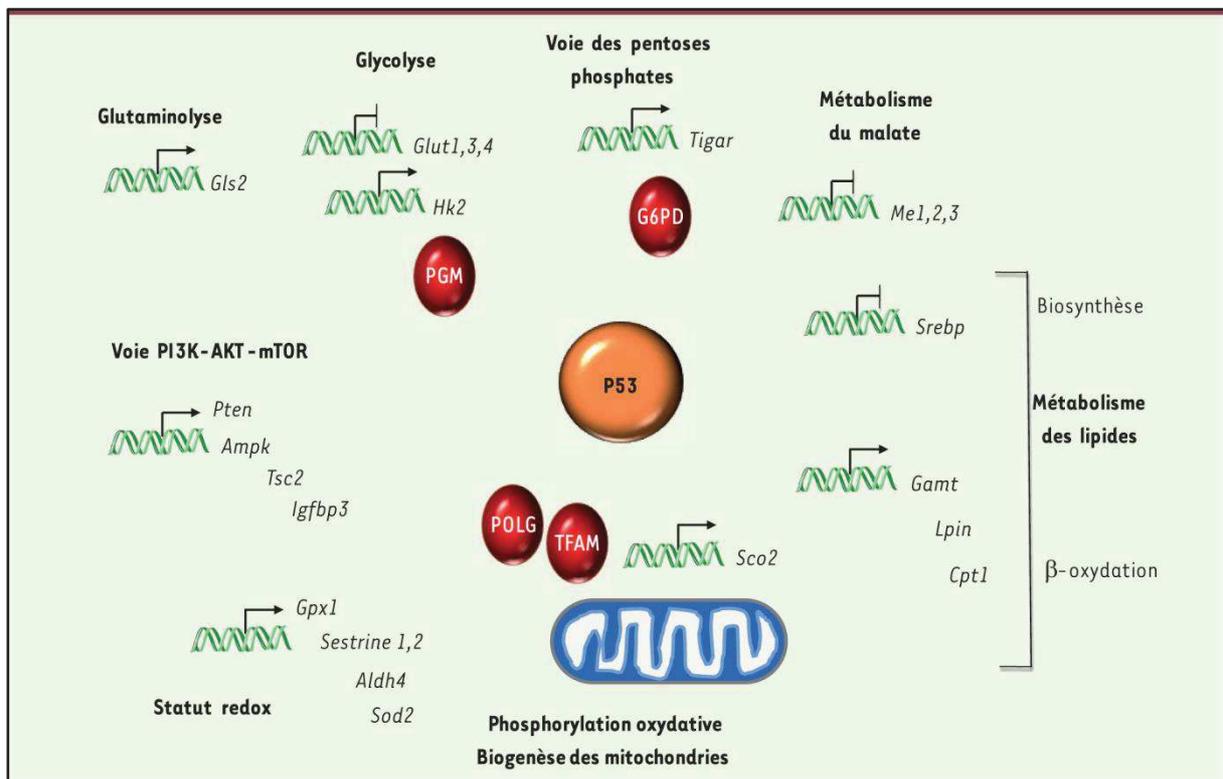


Figure 19 : Représentation schématique des différents effets métaboliques régulés par p53. La protéine p53 a des effets sur de nombreuses voies métaboliques, telles que la glycolyse, la branche oxydative de la voie des pentoses phosphates, la glutaminolyse, le métabolisme du malate, la synthèse et la dégradation des acides gras, mais également sur la biosynthèse des mitochondries, l'activité de la chaîne respiratoire ou encore le statut redox. Par ailleurs, p53 régule la transcription de plusieurs éléments clés de la voie PI3K-AKT-mTOR, une voie essentielle du contrôle du métabolisme [138].

Ces observations qui placent un peu plus p53 dans chacun des « hallmarks of cancer » renforcent la notion selon laquelle il est un élément central pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il paraît clair qu'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la voie p53 permettrait d'ouvrir le champ à de nouvelles thérapies contre le développement tumoral. (Adapté de Linares, Lecam, Lacroix (2013) [138]).

p53, régulateur de la balance redox :

Les ROS peuvent réguler l'activité de p53, mais la production de ROS peut également être une conséquence de l'activation de p53 [139]. En effet, le statut redox et, par conséquent, les fonctions de p53 peuvent également être affectés par des molécules anti- ou pro-oxydantes, telles que le glutathion, la thiorédoxine et les dérivés nitrosylés. Ainsi, la S-glutathionylation ou encore l'oxydation de résidus cystéines de p53 ont été associées à une perte de fonction de p53 [140].

À l'inverse, la thiorédoxine réduit les formes oxydées de p53, ce qui va augmenter sa liaison à l'ADN, son activité transcriptionnelle, et conduire à l'apoptose [141]. 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 GPX, de PIG (« p53-Induced Genes ») et de la glutarédoxine 3, et réprimer celle de la cyclo-oxygénase 2 et de NOS2. Enfin, à travers la modulation de la respiration mitochondriale, p53 peut également jouer sur la production de ROS endogènes [142]. De façon intéressante, il apparaît donc que p53 possède à la fois des fonctions pro-oxydantes, impliquées dans l'induction de la mort cellulaire ou la sénescence [143], et des fonctions antioxydantes, qui vont protéger la cellule des dégâts du stress oxydatif [144]. 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 provoque une augmentation des niveaux de ROS intracellulaires [145]. L'ensemble de ces observations a conduit à se demander quelles conditions poussaient p53 à agir 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 [146]. 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 [147].

Ainsi, si l'augmentation des niveaux des ROS est essentielle pour promouvoir et renforcer les signaux de prolifération, on pourrait imaginer que les supprimeurs de tumeurs pourraient activer des fonctions antioxydantes en réduisant les ROS cellulaires à des niveaux ne favorisant pas la prolifération. Par exemple, l'apparition de tumeurs chez des modèles murins p53^{-/-} peut être supprimée par une supplémentation en NAC dans le régime alimentaire, ce qui suggère qu'une fonction suppresseur de tumeur de p53 passe par la diminution des ROS [54]. On peut ajouter à cela une étude récente de l'équipe du docteur Wei Gu, qui laisse entendre que la fonction majeure de p53 dans la suppression des tumeurs pourrait être la régulation des gènes antioxydants et du métabolisme plutôt que la régulation de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire [55]. L'induction du gène TIGAR est un mécanisme permettant à p53 de réguler le métabolisme pour contrôler sa fonction antioxydante [56]. TIGAR fonctionne comme une fructose-2,6-bisphosphatase qui

abaisse les taux de fructose-2,6-bisphosphate, un régulateur positif de la phosphofructokinase-1 [57]. Il en résulte une diminution du flux glycolytique et une dérivation des atomes de carbone du glucose dans la voie du pentose phosphate afin de produire du NADPH, nécessaire au maintien de nombreux systèmes antioxydants. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs, tels que FOXO, répriment également la tumorigenèse en induisant des antioxydants [58].

Hormis les fonctions de MDM2 sur le métabolisme de la sérine (faisant l'objet de publications récentes par le laboratoire et discutées plus loin, dans la partie « Résultats »), peu d'informations décrivent le rôle de MDM2 dans des conditions de stress oxydatif, notamment lorsque ses fonctions ne font pas intervenir p53. On peut néanmoins relever 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 [148]. MDM2 est, par ailleurs, au niveau post-traductionnel, phosphorylé sur sa sérine 166 en réponse à l'activation de la voie ERK1/2 [149]. Enfin, en réponse à un stress oxydant, MDM2 induit la monoubiquitinylation de FOXO4 et l'inhibition de ses gènes cibles [150].

3) La régulation de p53

L'hétérogénéité de la réponse p53 est extrêmement complexe dans la mesure où elle implique de nombreux co-régulateurs mais aussi de nombreuses modifications post-traductionnelles (**Figure 20**). Ces mécanismes, contrôlant non seulement la stabilité de p53 mais également sa localisation subcellulaire, et le recrutement sur certains de ses gènes cibles peuvent être regroupés dans ce que l'on appelle le « code p53 » [151].

Néanmoins, l'un des mécanismes principaux pour la régulation de la stabilisation de p53 passe par l'activité de la protéine MDM2 (murine double minute 2). En effet, dans les cellules normales, en l'absence de signaux d'activation, p53 est réprimé par les oncoprotéines MDM2 et MDM4. MDM2 masque le domaine de transactivation de p53, mais possède une activité E3 ligase qui cible la dégradation de p53 via le système ubiquitine-protéasome [152] [153] [154]. MDM4 est dépourvu de cette activité E3 ligase, mais réprime aussi le potentiel de transactivation de p53 [155]. Il agit également en dimère avec MDM2 pour induire la dégradation de p53. Diverses voies de signalisation convergent vers ce complexe p53 / MDM2 pour libérer p53 de ses répresseurs et lui permettre de réguler la transcription des gènes cibles en aval impliqués dans les réponses cellulaires souhaitées.

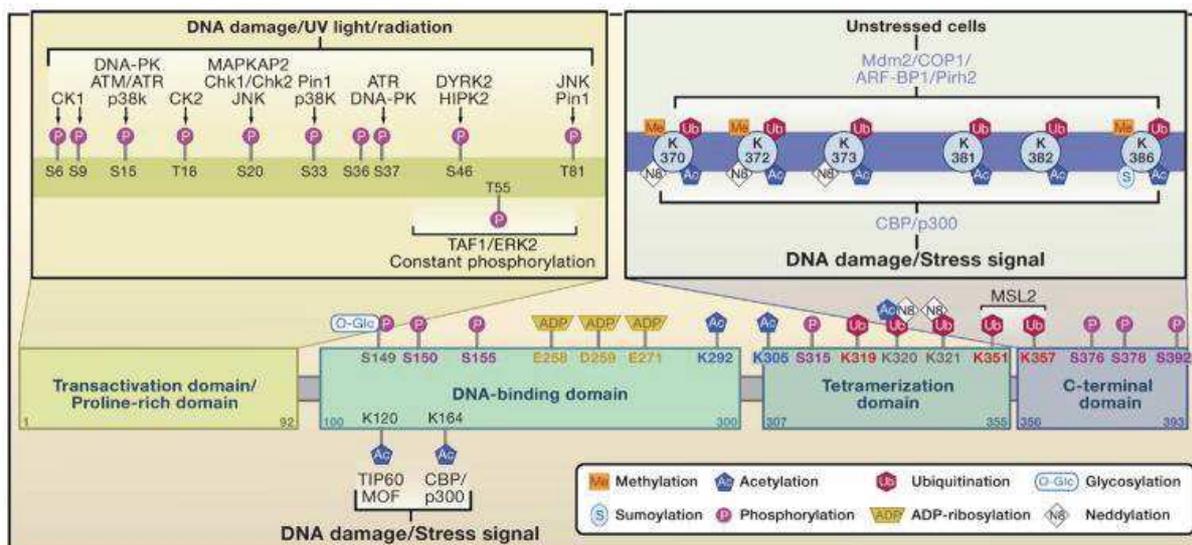


Figure 20 : Schéma des modifications post-traductionnelles de p53. Plus de 36 acides aminés de la protéine p53 ont été listés comme étant associés à des modifications post-traductionnelles. Ce schéma sert à illustrer la complexité et l'étendue des régulations fines de p53 (Adapté de Kruse et Gu (2009) [151]).

III - L'oncoprotéine MDM2

À l'origine, le gène *MDM2* a d'abord été identifié comme l'un des gènes surexprimés plus de 50 fois par amplification et responsable de la transformation spontanée d'une lignée cellulaire de souris BALB/c immortalisée (3T3DM) [156]. Dans ces cellules, *MDM2* fut localisé sur des corps nucléaires d'ADN extrachromosomiques et acentromériques appelés « double minute », qui étaient maintenus dans la cellule uniquement s'ils lui conféraient un avantage sélectif. Par la suite, des études ont démontré que la surexpression de *MDM2* dans des fibroblastes murins entraînait une augmentation du potentiel tumorigène de ces cellules [157]. Ces expériences associées au fait qu'un nombre important de tumeurs humaines (environ 10 %) présentent une amplification du gène *MDM2* aboutissant à une surexpression de la protéine, ont ainsi permis de placer *MDM2* dans la catégorie des oncogènes [158]. Ce statut fut confirmé quelques années plus tard grâce à la découverte de sa capacité à interagir et inhiber le suppresseur de tumeur p53 [152].

1) Le gène *MDM2*

Situé sur le chromosome 12 (région 12q14-q15), le gène humain *MDM2* (aussi appelé *HDM2*) est composé de 12 exons capables de générer plusieurs isoformes provenant d'évènements d'épissages alternatifs et/ou d'utilisation de promoteurs distincts [159]. Il code pour une protéine ubiquitaire constituée de 491 acides aminés (489 chez la souris), avec un poids moléculaire d'environ 90 kDa (**Figure 21**). Il existe deux promoteurs différents pouvant générer deux protéines : la protéine entière p90 et une plus courte, p76, initiée au niveau d'un codon initiateur ATG interne [160] [161] [162]. 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 [128]. L'épissage alternatif de *MDM2* peut également générer des petites protéines tronquées dans de nombreuses tumeurs humaines ou murines [163] [164].

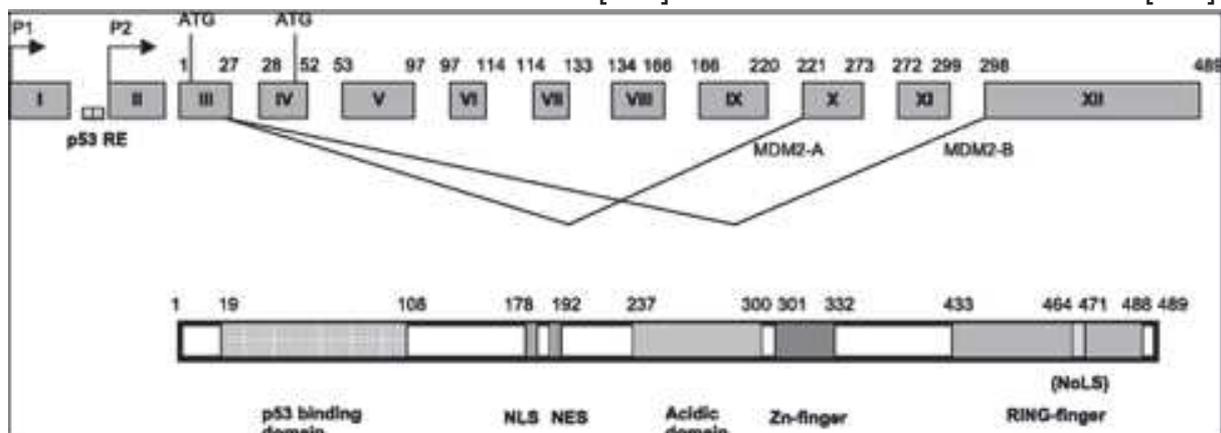


Figure 21 : La structure du gène et de la protéine Mdm2. Le gène de Mdm2 est constitué de 12 exons et de 2 éléments de réponse à p53 dans l'intron 1. Deux promoteurs et deux codons d'initiation AUG permettant la synthèse de deux protéines MDM2 différentes d'une vingtaine de kilodaltons (Adapté de Iwakuma et Lozano (2003) [165]).

Chez l'homme, *MDM2-A*, et *MDM2-B* sont les variants d'épissages majeurs, délétés des exons 4-9 et 4-11, respectivement (**Figure 22**). Aucun de ces produits ne contient de séquence de liaison à p53, et leurs fonctions restent mal connues. Il a cependant été prouvé que le variant d'épissage *MDM2-B* (aussi appelé *MDM2-ALT1*) est capable d'interagir avec MDM2-FL (« Full Length ») et d'inhiber sa fonction de dégradation envers p53 [166] [167]. Ces versions courtes de *MDM2* peuvent fonctionner comme des dominants négatifs en inhibant les fonctions de la protéine entière, ce qui conduit à une augmentation de la stabilité de p53. Il a été montré que dans des tumeurs qui arborent des mutants de p53 appelés GOF (« Gain Of Function »), *MDM2-B* induit une accumulation de ce mutant et contribue à la progression tumorale et des métastases [168].

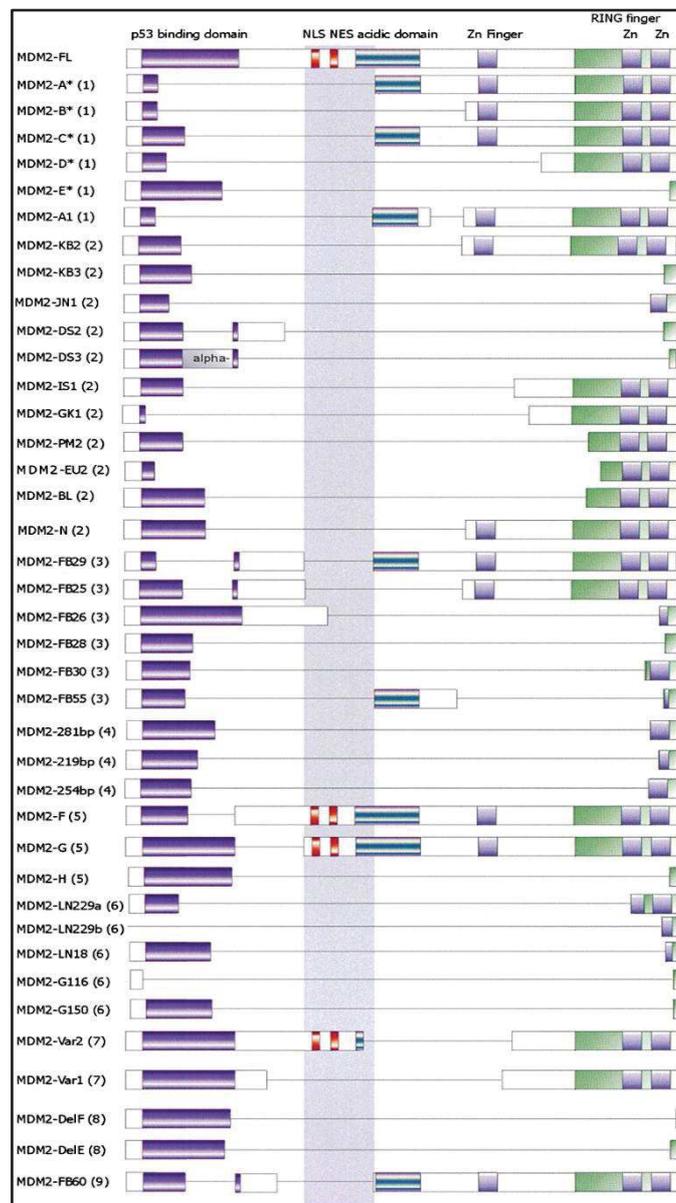


Figure 22 : Les principaux variants de MDM2. Ensemble des variants d'épissage connus d'ARNm de MDM2. Seuls les variants d'épissage marqués d'une étoile peuvent être traduits en protéine in vitro (Adapté de Bartel et al (2002) [169]).

2) Les motifs protéiques de MDM2

Parmi les motifs protéiques de MDM2 (**Figure 23**), 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, 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 lesquels 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 [170] [171]. MDM2 comporte également une séquence de localisation nucléolaire NoLS [172], bien que la pertinence physiologique de cette régulation ne soit pas encore connue.

Parmi les autres motifs de MDM2, figure aussi un domaine acide central, appelé ainsi en raison de sa richesse en acides aminés acides, qui est nécessaire à l'interaction de MDM2 avec d'autres protéines cellulaires. Il permet notamment l'interaction avec les protéines ribosomales L5, L11 et L23 [173], mais également avec la protéine p300/CBP (« CREB-Binding Protein »), avec qui MDM2 promeut la poly-ubiquitinylation de p53 [174][175], ou encore avec le suppresseur de tumeur p14^{ARF} [176]. 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 [177]. De plus, ce domaine acide serait important pour la dégradation de p53 médiée par MDM2, puisqu'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), des régulateurs de MDM2 jouent négativement sur la conformation de la protéine bloquant l'interaction du domaine acide avec le domaine E3 et diminuant ainsi l'efficacité de son activité ligase [178]. Pour que l'activité E3 ligase de la protéine soit active, il faut que le domaine RING-finger soit replié sur le domaine acide [179].

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) [180]. De plus, des études *in vitro* ont montré que ce domaine à doigt de zinc de MDM2 pourrait lier l'ADN [181]. 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. L'intégrité du domaine

RING est requise pour son homo - ou son hétéro -dimérisation avec MDMX [182] [183]. Enfin, d'autres études ont révélé que le domaine RING serait impliqué dans l'interaction directe avec des ARN [184] [185] au niveau des séquences consensus T7EBSp6 [186].

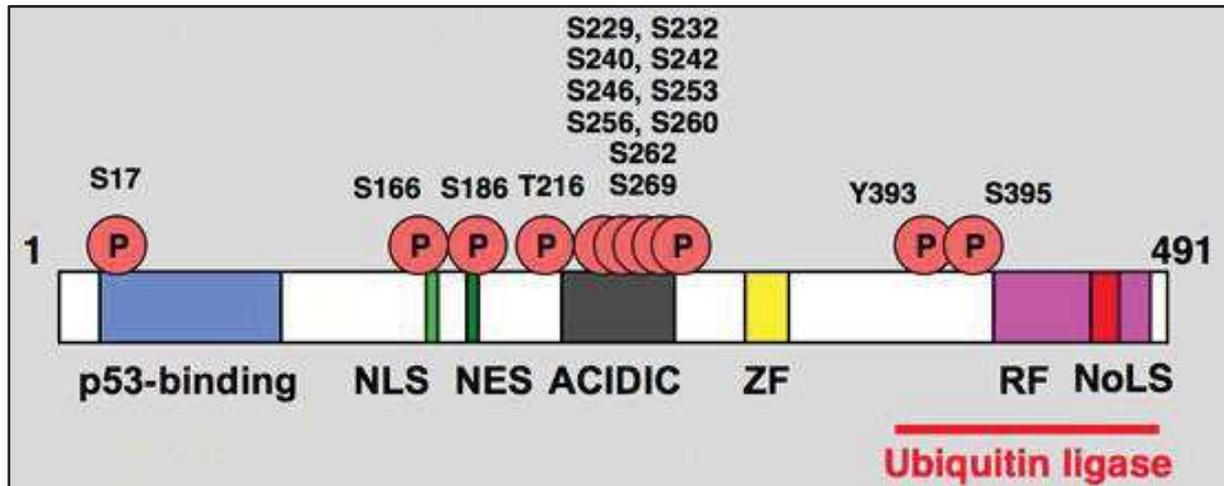


Figure 23 : Domaines fonctionnels et site de phosphorylation de la protéine MDM2. En bleu, le site de liaison à p53, NLS (« Nuclear Localization Signal »), NES (« Nuclear Exclusion Signal »), en gris, le domaine acide, en jaune, le domaine doigt de zinc, en rose, le ring finger domain et en C terminal, le NoLS (« Nucleolar Localization Signal »). (Adapté de « The TP53 web site » [187]).

3) MDM2, une E3-ligase de la famille RING

MDM2 appartient à la grande famille des protéines à domaine RING (« Really Interesting Novel Gene »), qui comprend plus de 200 membres. MDM2 fonctionne principalement, mais non exclusivement, comme une E3-ligase pour l'ubiquitine [188]. 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 par ce domaine, MDM2 cible de nombreux substrats pour leur mono- et/ou leur poly-ubiquitinylation. Cependant, il a également été montré que MDM2 était 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 aussi leur stabilité. L'ubiquitylation 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 en 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 l'ubiquitinylation du substrat. La première fonction décrite de l'ubiquitylation est la polyubiquitylation, qui est alors reconnue par le protéasome 26S et permet la dégradation de la protéine (**Figure 24**). L'ubiquitine contient 7 lysines pouvant toutes être utilisées pour former les chaînes d'ubiquitines. Selon le type de chaînes d'ubiquitines formées, des régulations protéiques autres que la dégradation peuvent se produire, telles que la relocalisation intracellulaire, l'activation de voies de signalisation et le remodelage de la chromatine [189]. De plus, il est à noter que certains substrats sont uniquement mono-ubiquitinylés. Ce mécanisme est retrouvé lors de l'endocytose de récepteurs, du bourgeonnement viral, de la transcription, de la réparation de l'ADN ou encore du recrutement de caspases au cours de l'apoptose [190] [191]. La monoubiquitylation de p53 par MDM2 sur la lysine K320 semble également jouer un rôle sur sa localisation subcellulaire.

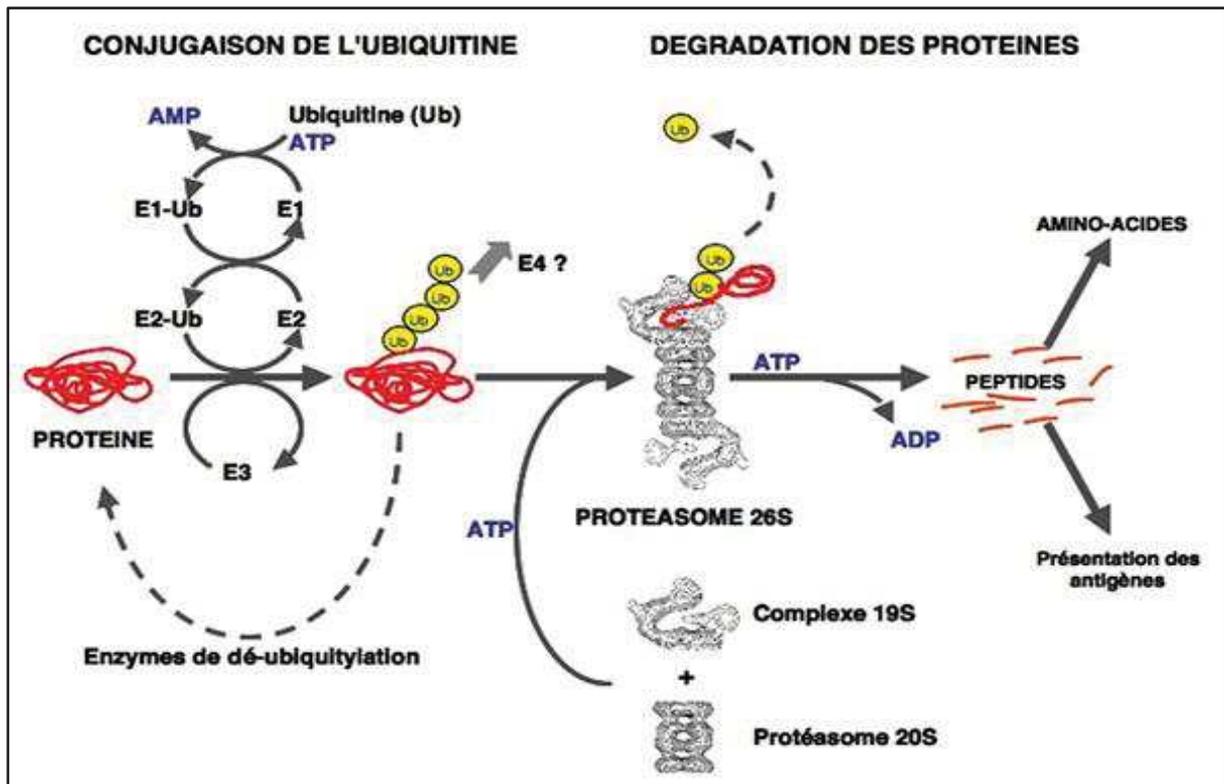


Figure 24 : Mode d'action des enzymes qui conduisent à la dégradation protéique.

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un système multi-enzymatique complexe, permettant une dégradation régulée des protéines intracellulaires. (Adapté de Coux et al (1996) [192]).

4) Les régulateurs de MDM2

Les niveaux, l'activité et la localisation cellulaire de MDM2 étant des facteurs déterminants pour les processus biologiques évoqués précédemment, il semble donc logique que la régulation de cette protéine se fait à de multiples niveaux d'actions et de complexité. Dans la cellule, de nombreux signaux de stress, notamment les dommages à l'ADN, l'activation d'oncogènes, la biogenèse ribosomale, le stress chronique et l'action de microARN, sont des événements impliqués dans la régulation de MDM2. Dans cette partie, je tenterai de résumer les mécanismes principaux par lesquels MDM2 est régulé.

a) Au niveau transcriptionnel

La transcription du gène *MDM2* est régulée par deux promoteurs distincts (P1 et P2). Le promoteur P1, situé en amont du premier exon, contrôle l'expression basale constitutive de *MDM2* [193]. Le promoteur P2, qui est situé dans le premier intron, est hautement régulé, notamment 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 [194]. MDM2 peut aussi être induit par différents facteurs de transcription, tels que NFAT 1 (« Nuclear Factor of Activated T cells 1 ») et 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 [195] [196]. Enfin, l'expression de MDM2 peut être négativement régulée par PTEN au niveau du promoteur P1 [197] (**Figure 25 ; A-B**).

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 *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 à une diminution de l'activité de p53 [198]. Comme décrit précédemment, 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. Les 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 [199].

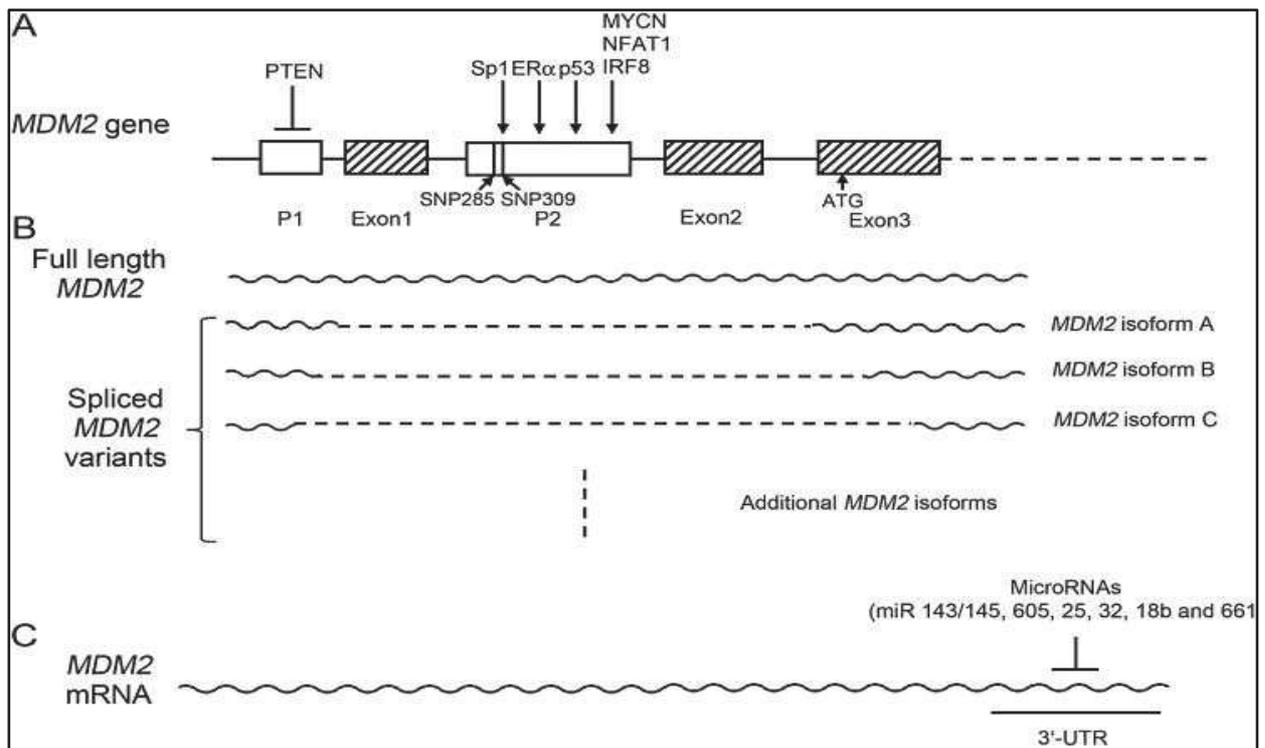


Figure 25 : Régulation de *MDM2* au niveau transcriptionnel. (A) Le gène *MDM2* a deux promoteurs (P1 et P2). p53 se lie au promoteur P2 pour induire l'expression de *MDM2*. En plus de p53, *MDM2* peut être régulé de manière transcriptionnelle par plusieurs voies oncogènes et suppressives de tumeurs. (B) Une expression accrue de variants de *MDM2* épissés alternativement et aberrants a été détectée dans de nombreux types de cancers humains. Parmi les plus de 40 variants d'épissages identifiés de *MDM2* dans les cancers humains, les isoformes A, B et C sont les plus fréquemment surexprimées. (C) Un groupe de microARN se lie à la région 3'-UTR de l'ARNm de *MDM2* pour inhiber sa traduction. (Adapté de Zhao et al (2014) [200]).

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 de *MDM2*. Ce mécanisme de contrôle implique notamment certains micro-ARN (miRNAs) qui font partie d'un groupe d'ARN non codants régulant la traduction à travers la région 3'UTR de leurs ARN cibles. Plusieurs miARNs ciblant *MDM2* ont été identifiés, dont miR-143/145, miR-605, miR-25, miR-32, miR-18b et miR-661 [200]. En inhibant la traduction de *MDM2*, ces miARNs augmentent de fait le niveau d'expression de p53 et son activité. La plupart de ces microARN exhibent des fonctions suppressives de tumeurs et se retrouvent souvent sous-exprimés dans les tumeurs humaines (**Figure 25 ; C**).

De plus, il a été montré que p53 était un répresseur direct de la traduction de *MDM2* lors de stress provoqués par défaut de repliement des protéines [201].

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 et les stress ribosomaux (**Figure 26**). 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.

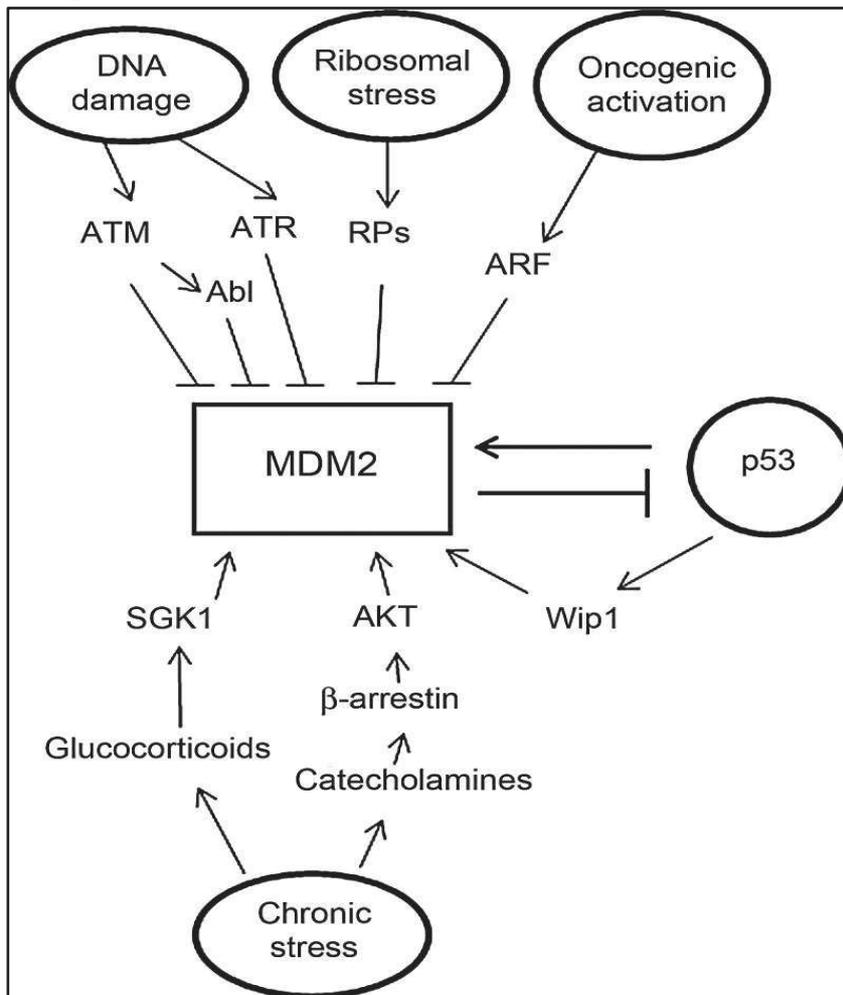


Figure 26 : La régulation des niveaux et de l'activité de la protéine MDM2. Les niveaux et l'activité de la protéine MDM2 sont fortement régulés par de nombreux signaux et facteurs de stress. Ces signaux de stress régulent la capacité de MDM2 à se lier à p53, l'activité de la fonction ubiquitine E3 ligase, sa localisation cellulaire et sa stabilité. Les signaux de stress génotoxiques, tels que les infrarouges et les UV, régulent négativement les niveaux et l'activité de MDM2, principalement par la modification post-traductionnelle (phosphorylation). L'activation d'oncogènes, tels que ARF, régule négativement l'activité de la fonction E3 ligase et favorise la localisation de MDM2 dans le nucléole. Les signaux de stress ribosomaux régulent négativement l'activité de l'ubiquitine E3 ligase via PR. Certains oncogènes, notamment AKT et Wip1, augmentent directement l'activité de MDM2. Les signaux de stress psychologiques chroniques augmentent les niveaux de neurohormones, y

compris les glucocorticoïdes et les catécholamines, qui peuvent accentuer l'activité de MDM2. (Adapté et al (2014) [200]).

Phosphorylation :

Les fonctions de MDM2 sont étroitement régulées par des modifications post-traductionnelles, dont la principale est la phosphorylation. Parmi les 491 acides aminés qui composent la protéine MDM2, 20 % sont des sérines ou des thréonines. Les sites de phosphorylation de MDM2 sont nombreux mais se regroupent sur deux principaux domaines. Le premier est le domaine acide en position centrale, et le second, la zone dans la partie C terminale située entre le domaine à doigt de zinc et le domaine E3 ligase (**Figure 27**). 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, 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 [202], et ATM (ataxia telangiectasia-mutated), qui cible la sérine 395, empêchant MDM2 d'induire la translocalisation de p53 du noyau vers le cytoplasme [203]. Cette réaction est réversible, puisque WIP1 est une phosphatase capable de déphosphoryler MDM2 sur la sérine 395 et ainsi favoriser la dégradation de p53 [204]. WIP1 est considérée comme une oncoprotéine que l'on retrouve surexprimée dans de nombreux cancers humains [205]. La thréonine 394 adjacente de la S 395 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 [206]. 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 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 [207]. GSK3 β n'est pas la seule protéine à cibler ce domaine acide, il y a aussi la caséine 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 [208].

Dans la tumorigenèse, PI3K-AKT est une voie importante 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 à proximité 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 [209].

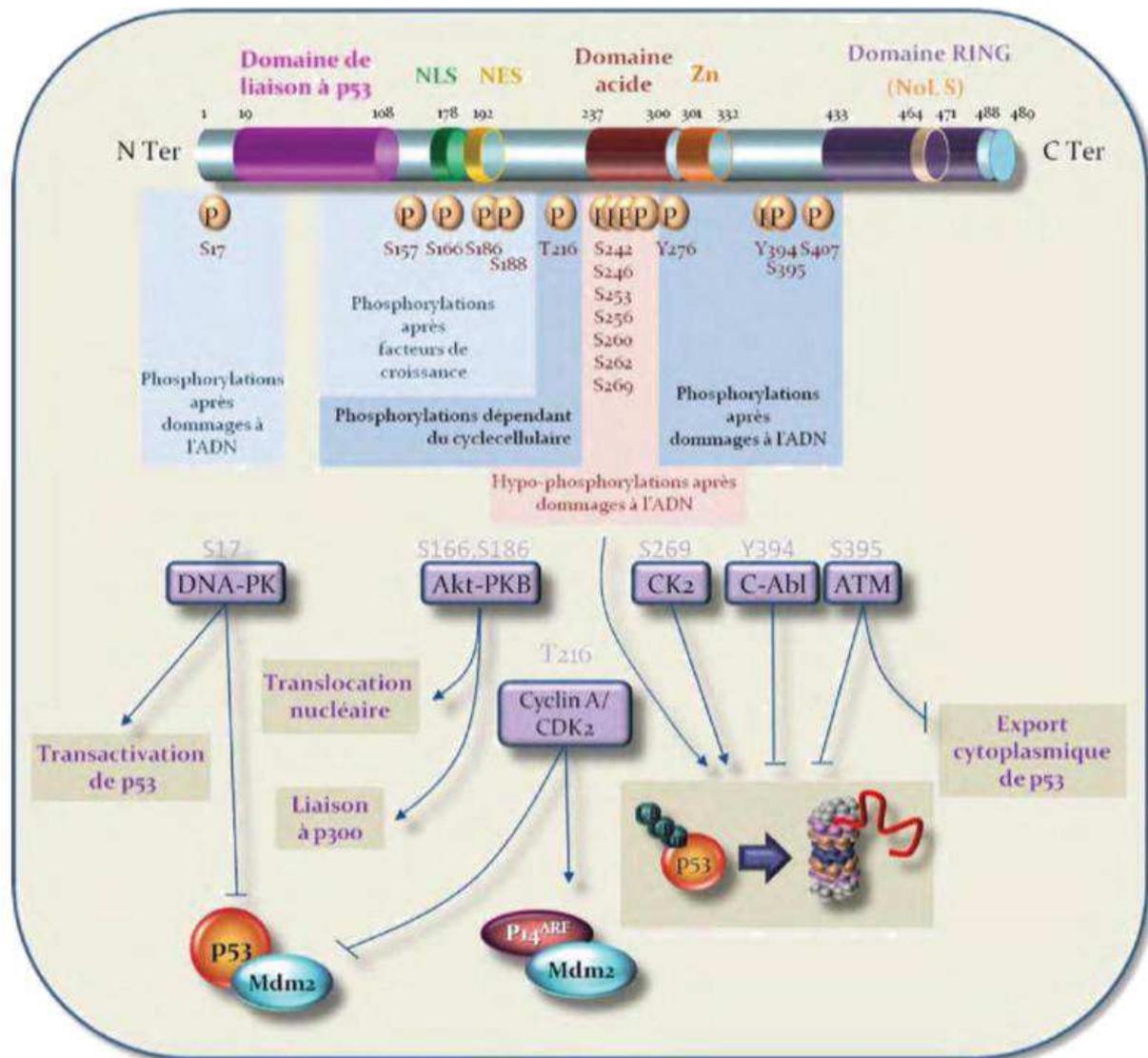


Figure 27 : Les sites de phosphorylation de MDM2. Les sites de phosphorylation sont indiqués par un P dans un cercle, avec leurs positions relatives aux domaines fonctionnels de MDM2. Ces différents sites de phosphorylation illustrent la complexité des mécanismes de régulation post-traductionnelle de MDM2. Quelques protéines kinases connues de ces phosphorylations sont également indiquées dans les rectangles violets. (Adapté de Meek et Knippschild, 2003 [210]).

Ubiquitylation :

L'auto-ubiquitylation de MDM 2 n'est pas requise pour sa dégradation [211]. La destruction de la protéine doit donc être régulée par d'autres protéines E 3-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 [212].

- SCF ^{β -TRCP}. En réponse à la fois à des stress génotoxiques et lors de la progression du cycle cellulaire, il a été montré que SCF ^{β -TRCP} pouvait ubiquityler MDM 2 et conduire à sa dégradation [208][213].

D'autres protéines sont aussi connues pour augmenter l'ubiquitylation de MDM 2, bien que les mécanismes par lesquels elles agissent restent encore mal caractérisés. Parmi ces facteurs figurent RASSF1A [214] et ARF [176]. À l'inverse, d'autres facteurs empêchent l'ubiquitylation de MDM 2. 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'ubiquitylation et donc la dégradation de MDM2 pour activer la boucle de rétrocontrôle MDM2/p53 et inhiber ainsi p53 [215].

Sumoylation et neddylation :

MDM2 est sumoylé (SUMO-1) *in vivo* par les SUMO E 3-ligase PIAS1 et PIASx β , et peut être également sumoylé *in vitro* par ces mêmes enzymes et RanBP 2 [216] [217]. Les facteurs conduisant à la sumoylation de MDM 2 sont encore peu connus. Cependant, une donnée très intéressante suggère que la sumoylation de MDM 2 est stimulée par ARF [218], ce qui est particulièrement intéressant dans la mesure où ARF empêche l'ubiquitylation de p 53 par MDM 2, suggérant l'idée que les modifications SUMO et ubiquitine peuvent être mutuellement exclusives et /ou antagonistes [216].

À l'instar de l'ubiquitine et de SUMO 1, NEDD8 appartient à la famille des molécules apparentées à l'ubiquitine. Si l'ubiquitylation est majoritairement décrite pour induire la dégradation de ses cibles par le protéasome, la conjugaison des molécules apparentées à l'ubiquitine a des effets multiples. Il a été montré que MDM2, à travers son domaine E 3 ligase, est aussi capable d'accepter des molécules de NEDD 8 en vue de modifier l'activité de p 53 *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 MDM 2 sont hautement contrôlées et montrent la diversité des mécanismes par lesquels les protéines E3 ligase peuvent réguler leurs cibles [219].

d) Régulation de la localisation subcellulaire de MDM2

L'une des premières protéines découvertes comme interagissant avec MDM2 fut le suppresseur de tumeur p14^{ARF} (« Alternative Reading Frame ») [220] [221] [176]. Cette protéine est exprimée à partir du locus *Cdkn2A*, qui génère la production de 2 protéines – p16^{INK4a} et p14^{ARF} – grâce à l'utilisation de deux promoteurs indépendants et 2 phases de lecture ouvertes différentes [222]. Cette interaction entre ARF et MDM2 bloque le passage de MDM2 entre le cytoplasme et le noyau en le séquestrant dans le nucléole [223] [224]. Comme l'export nucléaire de p53 par MDM2 est nécessaire pour sa dégradation efficace [171] [223], 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, à l'instar des protéines ribosomales L5, L11, L23, L26 et S7, conduisant alors à une stabilisation de p53 [225] [226] [227].

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 sérines 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.

Il est intéressant de noter que des études récentes portant sur la localisation subcellulaire de MDM2 dans le cancer du sein ont montré que l'expression concomitante nucléaire et cytoplasmique de MDM2 pouvait être considérée comme un facteur pronostique [228]. La localisation subcellulaire de l'expression de MDM2 doit être prise en compte dans l'évaluation du cancer du sein, mais devrait également être plus souvent considérée comme un marqueur relevant dans d'autres types de cancers présentant des amplifications de MDM2, tels que les sarcomes des tissus mous.

5) MDMX, l'homologue de MDM2

MDMX (ou MDM4) a été découverte presque 10 ans après MDM2, à partir du criblage d'une banque d'expression d'ADNc avec la protéine p53 radiomarquée [225] [230]. Comme MDM2, MDMX est capable de se lier à p53 et agit également comme un inhibiteur de p53. Rapidement, il fut établi que MDMX interagissait également avec MDM2 [182] [231] et jouait un rôle dans sa stabilisation [232] [233] [212]. De façon intéressante, MDM2 et MDMX 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 28**).

Il est à noter, cependant, que le domaine RING de MDMX ne lui confère pas d'activité d'ubiquitine E3-ligase *in vivo* [234], contrairement à MDM2. Enfin, il apparaît que MDMX 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 MDMX dans l'inhibition de p53 ont été démontrées *in vivo* chez la souris. Les souris *MdmX* KO meurent au stade embryonnaire (à 10 jours *post coitum*) [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. À l'inverse de la délétion de MDM2 dans le système nerveux central, l'inactivation de MDMX conduit à un arrêt de la prolifération et non pas à la mort cellulaire. Ces données suggèrent que MDMX pourrait être un autre régulateur critique de p53. Cette notion est appuyée par des données montrant que l'expression de MDMX est dérégulée dans plusieurs types de cancers (rétinoblastome, cancers du cerveau et du sein, lymphomes du manteau, cancers des testicules, de l'utérus et de l'estomac et mélanomes) qui ne présentent pas d'altérations génétiques de p53 [158] [239] [240] [241].

D'un point de vue moléculaire, MDMX 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 MDMX/MDM2 est inférieur à 2:1, la stabilité de p53 est diminuée [232] [242]. À l'inverse, lorsque les niveaux de MDMX sont plus élevés, il y a une augmentation de la stabilité de p53 [233]. MDMX est, à ce jour, dépourvue d'une activité E3-ligase fonctionnelle *in vivo*. Son mode d'action consisterait donc simplement, de par sa liaison à p53, à empêcher la liaison entre MDM2 et p53. Ainsi, MDMX bloque la dégradation de p53 et inhibe son activité en masquant son domaine de transactivation. Il est également reporté qu'en fonction du ratio MDMX/MDM2, MDMX empêcherait ou entraînerait la dégradation de MDM2 [243] [183] [182] et impacterait donc la translocation de p53 par MDM2 [233]. 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 *MdmX* dans un fond hétérozygote pour *Mdm2* induirait 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 MDMX inhibe principalement son activité transcriptionnelle [244]. Enfin, étant donné la létalité embryonnaire de MDMX, des études *in vivo* utilisant des allèles conditionnels chez la souris (dans les mêmes types cellulaires précédemment cités pour MDM2) ont également été menées pour déterminer l'importance de MDMX chez l'adulte [245] [244] [246] [247]. Cependant, à la différence de MDM2, il apparaît que seuls certains types cellulaires présentent des phénotypes visibles en réponse à la perte de *MdmX*. Comme pour la perte de *Mdm2*, ces phénotypes sont p53-dépendants. Ces données suggèrent que l'inhibition de p53 par MDMX 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 MDMX 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 [248]. Ainsi, les protéines MDM2 et MDMX, très proches structurellement parlant, agissent en fait de façon différente mais complémentaire à l'égard de l'inhibition de p53.

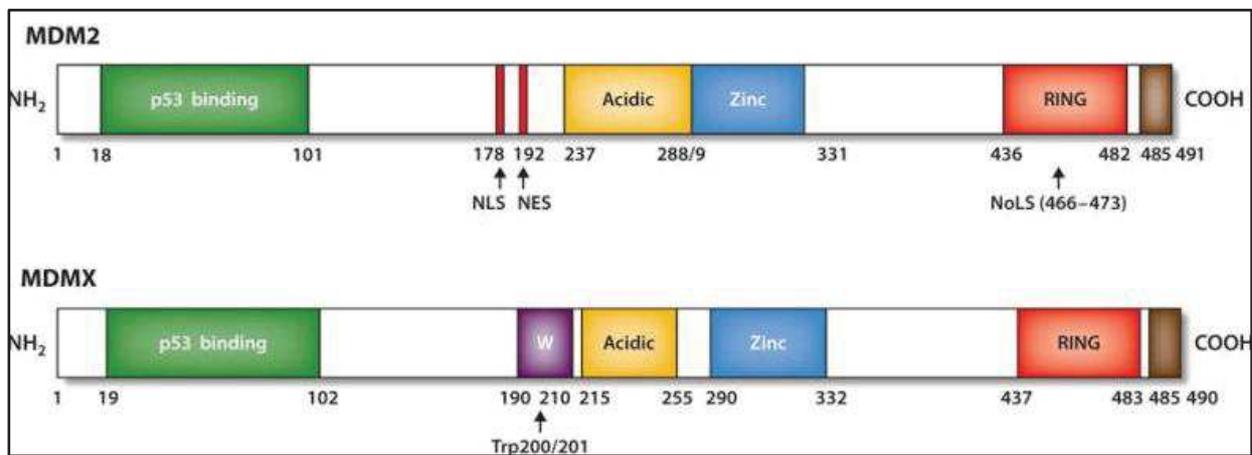


Figure 28 : Schéma de la structure des homologues MDM2 et MDMX. MDMX présente avec MDM2 une similarité au niveau de ses domaines structuraux avec, comme évoqué précédemment, une région N-terminale de liaison à p53 (résidus 19 à 102), une région centrale acide (résidus 215 à 255), une région à doigts de zinc (résidus 290 à 331) et, en position terminale, un groupe carboxyle et un domaine RING (résidus 437–483). Cependant, MDMX ne dispose pas des séquences NLS, NES ou NoLS, mais possède un motif WWW unique (W, résidus 190–210) qui inhibe l'interaction avec p53. Contrairement au domaine MDM2 RING E3 ligase, le domaine MDMX RING est dépourvu d'activité E3 ligase. Enfin, la queue carboxy-terminale (résidus 485 à 490) de MDMX est nécessaire à la formation d'hétérodimères MDM2 – MDMX. (Adapté de Karni-Schmidt et al (2016) [249]).

6) MDM2, le régulateur principal de p53

L'activité ubiquitine E3 ligase de MDM2 décrite précédemment représente l'antagoniste principal du suppresseur de tumeur p53 [250]. En effet, MDM2 affecte la stabilité de p53 en le ciblant pour la dégradation protéasomique [251]. Il y a près de 20 ans, les groupes de Lozano et de Bradley ont développé des souris knock-out (KO) pour *Mdm2* et/ou *p53* et ainsi mis en lumière la nature critique de la relation entre p53 et MDM2 [252] [253]. La perte de *Mdm2* (KO constitutifs ou conditionnels) a entraîné une létalité embryonnaire précoce due à l'induction massive de la mort embryonnaire impliquant p53 [254] [255] [256] [257] [258]. D'un autre côté, la combinaison des délétions de *Tp53* et *Mdm2* a complètement inversé ce phénotype, permettant ainsi à ces souris de rester en vie, démontrant qu'une large part des fonctions associées à MDM2 dépend de p53.

Ces données génétiques tendent à démontrer que la régulation de p53 *in vivo* dépend majoritairement de MDM2. Il est toutefois important de noter que plusieurs observations ont jeté le doute sur les conclusions aussi tranchées de ces expériences. En effet, des expériences ultérieures ont signalé des défauts de développement et de reproduction chez les animaux p53 *-/-* et p53 *-/-* ; *Mdm2* *-/-* [259] [253] [260]. En effet, les souris knock-out de p53 présentent une létalité embryonnaire accrue en raison d'une fermeture insuffisante du tube neural et de l'exencéphalie, malgré l'hypothèse générale selon laquelle la perte de p53 ne modifiait pas le développement et la survie des animaux.

Cependant, 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 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 avec la délétion de *Mdm2* dans le cœur, intestin, testicules, thymus, rate, érythrocytes, hépatocytes... Dans la majorité des cas, cette délétion conduit à une réponse apoptotique p53 dépendante [261] [246].

Il est important de noter que MDM2 lui-même est un gène dont l'expression est induite par p53 [262] [263] [264]. Ainsi, les deux molécules sont liées l'une à l'autre par une boucle d'autorégulation négative visant à maintenir de faibles niveaux de p53 cellulaire en l'absence de stress (**Figure 29**). Cette relation permet de limiter la durée et la gravité des diverses réponses biologiques létales médiées par p53 après une réponse au stress [262] [251] [265]. Très souvent, les protéines p53 mutées dans les cellules tumorales sont stables car elles présentent des défauts pour le domaine de transactivation contenant le domaine de liaison à MDM2. Ainsi, la boucle de rétrocontrôle est défectueuse.

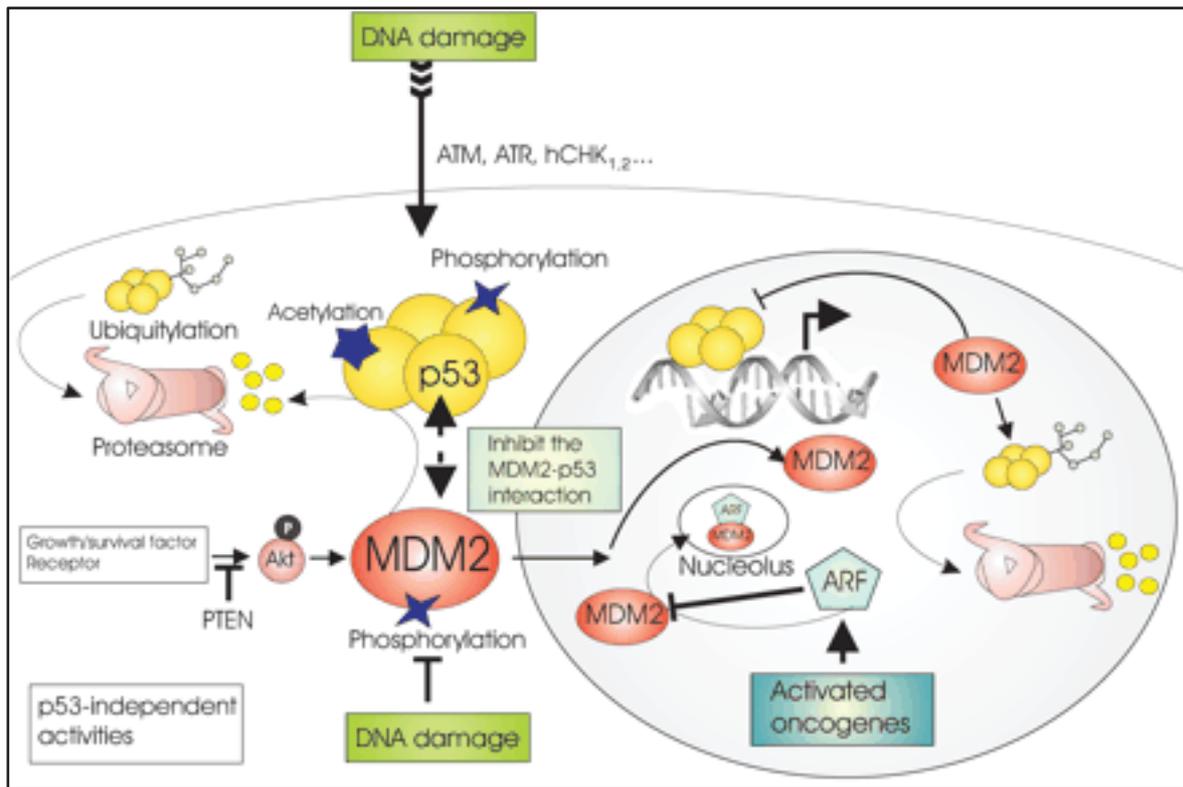


Figure 29 : Régulation de p53 par MDM2. p53 et MDM2 forment une boucle d'autorégulation. p53 stimule l'expression de MDM2, et MDM2, à son tour, inhibe l'activité de p53 car il stimule sa dégradation via le protéasome et bloque son activité transcriptionnelle. Une large gamme d'agents endommageant l'ADN ou l'activité d'oncogènes induit l'activation de p53. Les dommages à l'ADN favorisent la phosphorylation de p53 et de MDM2, empêchant ainsi leur interaction et stabilisant p53. De même, l'activité de certains oncogènes peut induire l'expression de ARF, qui séquestre MDM2 dans le nucléole, empêchant ainsi la dégradation de p53. Inversement, les signaux de survie jouent un rôle médiateur dans l'importation nucléaire de MDM2 via l'activation d'Akt, ce qui déstabilise p53. (Adapté de Moll et Petrenko (2003) [257]).

La dégradation de p53 par l'activité E3 ligase de MDM2 n'est pas le seul mécanisme de régulation de p53 par MDM2. En effet MDM2 est capable d'inhiber l'activité de p53 par interaction directe avec celui-ci, en masquant son domaine de transactivation, et donc d'empêcher le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base [152] [171].

De plus, il peut également jouer sur la stabilité et la localisation de p53. Mdm2 possède des fonctions post-ubiquitinylation sur la dégradation de p53. Il peut s'associer avec plusieurs sous-unités du complexe régulateur 19S du protéasome, facilitant ainsi l'association de p53 avec la machinerie de dégradation au travers de la formation d'un complexe ternaire [266].

MDM2 semble également jouer sur la localisation subcellulaire de p53. En effet, de faibles niveaux de MDM2 peuvent induire la mono-ubiquitinylation de p53, aboutissant ainsi à son export nucléaire [267] [268]. De façon intéressante, un

complexe MDM2/p53 associé à la chromatine mais transcriptionnellement inactif, a été découvert dans certaines lignées cancéreuses [269] [270]. Cette association de MDM2 au niveau des éléments de réponse à p53 est ensuite réduite lors de dommages à l'ADN, permettant l'activation de la transcription de p53. Ces données suggèrent que MDM2 peut être localisé transitoirement au niveau des gènes cibles de p53. Ce complexe peut aussi être régulé par l'acétylation de p53 [271], qui va alors bloquer le recrutement de MDM2 sur les éléments de réponse de p53, une étape critique pour l'activation des fonctions de p53.

D'autres mécanismes de régulation d'inhibition de p53 par MDM2 impliquent la neddylation. MDM2 est capable d'induire la conjugaison de NEDD8 sur p53, une protéine apparentée à l'ubiquitine, régulant ainsi son activité transcriptionnelle et son export nucléaire [219].

En termes de modifications post-traductionnelles, MDM2 joue également un rôle dans la sumoylation de p53. Il a été montré que MDM2 était ainsi capable de promouvoir la conjugaison de SUMO-1 sur p53 [272], une activité qui est stimulée par p14-ARF et qui conduit à sa relocalisation dans le nucléole. MDM2 promeut également la conjugaison de SUMO-2/3 sur p53, entraînant une réduction de son activité transcriptionnelle [273]. MDM2 peut aussi induire la mono-ubiquitinylation des histones H2B au niveau des gènes de réponse à p53, conduisant ainsi à leur répression transcriptionnelle [274], et recruter l'histone déacétylase HDAC1, qui va alors induire la déacétylation de lysine clé de l'extrémité C-terminale de p53, les rendant disponibles pour l'ubiquitinylation [275]. D'autres données suggèrent que MDM2 pourrait également réguler la transcription par l'interaction directe avec la machinerie de transcription TFIID [276].

La grande diversité d'actions de MDM2 sur p53 illustre parfaitement le fait que MDM2 est bien plus qu'une simple ubiquitine E3 ligase et qu'il pourrait potentiellement exercer d'autres actions dans la cellule.

En effet, plusieurs types de tumeurs humaines ont été identifiés comme ayant des taux élevés de MDM2, et ce, en l'absence de p53 sauvage ou exprimant des isoformes de MDM2 n'étant plus capables de se lier et de réguler p53 [277] [278]. De plus, des expériences, dans lesquelles la surexpression de *MDM2* spécifiquement dans des glandes mammaires chez la souris, ont conduit à la perturbation du développement normal de ce tissu, mais aussi à la formation de tumeurs mammaires de manière indépendante de p53 [279]. Ces observations suggèrent que MDM2 remplit des fonctions supplémentaires allant au-delà de la simple régulation de p53 et ajoutant ainsi un nouveau degré de complexité à l'axe MDM2/p53 dans le processus de tumorigenèse.

7) MDM2, une vie sans p53

Pour beaucoup, la protéine MDM2 évoque immédiatement la protéine p53 tant les travaux impliquant leurs interconnexions sont nombreux. Cependant, en marge de ces publications, d'autres études font mention de fonctions indépendantes de p53. En effet, outre sa fonction de régulateur majeur de p53, MDM2 est capable d'avoir des effets sur le contrôle de la prolifération, la détermination du destin cellulaire, la réparation de l'ADN, la transcription, la biosynthèse des ribosomes, l'hypoxie, la régulation du métabolisme, ainsi que d'autres processus qui peuvent également contribuer à son potentiel oncogénique [280] (**Figure 30**).

En effet, bien que la majorité des sarcomes des tissus mous contiennent soit une mutation de p53 soit une surexpression de *MDM2*, une proportion significative des échantillons de tumeurs présente les deux simultanément. Il est intéressant de noter que les tumeurs contenant des modifications dans les deux protéines sont associées à un plus mauvais pronostic pour le patient [277] [281]. De plus, des niveaux élevés d'expression de l'ARNm de *MDM2* sont corrélés à une apparition, à un âge précoce, de sarcomes des tissus mous [282]. Globalement, ces résultats suggèrent que MDM2 aurait des effets indépendants de p53 dans le processus de tumorigénèse.

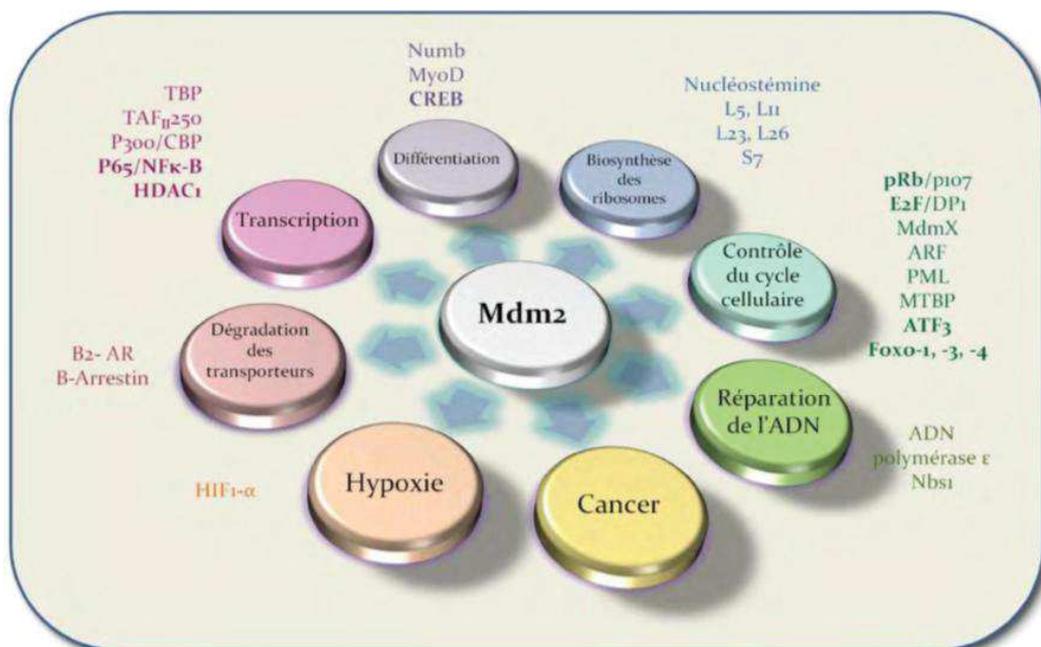


Figure 30 : De façon indépendante de p53, MDM2 se retrouve impliqué dans un grand nombre de fonctions, au travers de son interaction directe ou de la régulation de nombreuses protéines (indiquées à côté de chaque fonction). (Adapté de Ganguli et Wasyluk (2003) [280]).

a) Contrôle du cycle cellulaire

Il a été démontré que MDM2 interagissait avec la protéine du rétinoblastome (pRb), un gène suppresseur de tumeur qui, comme p53, joue un rôle majeur dans l'inhibition du cycle cellulaire et dans l'apoptose. Cependant, contrairement à l'interaction MDM2-p53, l'interaction MDM2-pRb n'est pas médiée par la dégradation via l'ubiquitine. Dans les cellules, MDM2 forme un complexe avec pRb et perturbe le point de contrôle G1/S en empêchant la liaison de pRb à certains membres de la famille des facteurs de transcription E2F [283]. Fait intéressant, il a également été prouvé que MDM2 pouvait former un complexe trimérique pRb-MDM2-p53, dans lequel MDM2 jouerait le rôle de lieur entre ces deux facteurs de transcription. La liaison de pRb à MDM2 n'inhibe pas la liaison de p53. Cela contraste avec d'autres régulateurs connus de l'interaction MDM2-p53, tels que p14ARF, qui agissent en se liant à MDM2 et en inhibant la liaison de p53. L'interaction pRb-MDM2 est capable d'inhiber la dégradation de p53 médiée par MDM2, mais n'empêche pas la capacité de MDM2 à inhiber la transactivation de p53 de ses gènes cibles [284]. La découverte d'un dialogue croisé entre les voies p53 et pRb est particulièrement intéressante, car ce sont sans doute les deux voies les plus importantes dans la prévention de la tumorigenèse.

MDM2 joue également un rôle dans 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. Il a été décrit que p21 se liait à la sous-unité C8 du protéasome 20S (corps protéolytique du protéasome 26S), entraînant ainsi sa dégradation [285]. De façon intéressante, les effets de MDM2 sur la stabilité de p21 sont indépendants de son activité E3 ligase [286].

Une interaction *in vivo* a aussi été reportée entre MDM2 et le suppresseur de tumeur PML (« Promyelocytic Leukemia Protein »), une protéine multifonctionnelle capable, entre autres, 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 [287].

MDM2 interagit et inhibe également MTBP (« Mdm2 Binding Protein »), empêchant de ce fait l'arrêt du cycle en G1 induit par MTBP [288].

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 [289].

Une autre étude a montré que MDM2 interagissait et ubiquitinylait ATF3, conduisant alors à sa dégradation [290]. ATF3 est un facteur de transcription de la famille CREB/ATF [291], dont l'expression est fortement induite par une large variété de stress cellulaires, tels que les dommages à l'ADN ou l'hypoxie, et qui est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose [292] [293].

Enfin, il a été reporté que MDM 2 était capable d'interagir et de réguler les membres de la famille FOXO (« Forkhead box »). En effet, la voie Ras / Raf / MEK / ERK associe les signaux des récepteurs cellulaires à des facteurs de transcription qui régulent la prolifération et la différenciation. Des mutations ou des altérations de cette voie se retrouvent dans de nombreux cancers humains [294]. Lorsque cette voie est activée, ERK phosphoryle Foxo3A, un facteur de transcription des protéines régulatrices du cycle cellulaire. Dans cette forme phosphorylée, Foxo3A devient une cible pour l'ubiquitinylation par MDM2, favorisant sa dégradation. Comme Foxo3 agit en tant que suppresseur de tumeurs, la régulation négative de Foxo3 par MDM2 pourrait jouer un rôle dans la tumorigenèse lors d'une réponse à un stimulus de type facteur de croissance [295].

b) Différenciation cellulaire

Des études récentes montrent que MDM 2 réprime 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 et permettre la prolifération des cellules cancéreuses . Le mécanisme clé, en partie responsable des fonctions de MDM 2 indépendantes de p53, se fait au travers de son interaction avec le complexe polycomb repressor complex 2 (PRC2). De plus, 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 [296].

Concernant la différenciation de tissus sains , la protéine NUMB fut isolée lors d'un crible destiné à identifier des facteurs qui interagissent avec MDM2 [297]. La protéine NUMB est notamment impliquée dans la différenciation des cellules souches neurales. Il a été montré que MDM 2 était capable de se lier à NUMB , d'altérer sa localisation nucléaire et de promouvoir sa dégradation en l'ubiquitinylant [298].

Pour finir , MDM2 est impliqué dans l'initiation de la différenciation adipocytaire . En effet, 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 [299].

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 TAFII250 (TBP-Associated Factor) [276]. Par ce biais, MDM2 est ainsi capable d'activer certains gènes spécifiques, tel que la *Cycline A*.

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 [300]. Cette induction conduit à l'activation de NF- κ B. Cependant, des études récentes ont montré, que si la voie NF- κ B était déjà activée, MDM2 induit alors une inhibition de NF- κ B, et une induction de l'apoptose [301].

Enfin, comme évoqué un peu plus haut, l'équipe de Dobbelstein, a récemment montré que MDM2 pouvait se lier à la chromatine par son interaction physique avec des composants du complexe PRC2, et ainsi réprimer de manière transcriptionnelle l'expression de gènes afin de favoriser la survie de cellules cancéreuses [302]. 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) [302].

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* [303][304]. 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 [305], notamment en réponse aux irradiations par les rayons ultraviolets (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 [306]. 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 [307].

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 [227] et les protéines ribosomales L5 [308], L11 [225], L23 [309], L26 [310] et S7 [311] ce qui semble corrélérer avec la relocalisation de MDM2 au niveau du nucléole, le site de synthèse des pré-ribosomes qui composeront ensuite dans le cytoplasme les ribosomes importants pour la synthèse protéique.

D'un autre côté, il a été démontré que MDM2 pouvait ubiquitinyler et cibler la protéine ribosomale RPL26 en vue de sa dégradation. RPL26 joue un rôle critique dans la traduction de l'ARNm codant pour p53 en réponse à des dommages à l'ADN [312]. Dans des conditions normales, MDM2 induit la dégradation de RPL26, inhibant ainsi la traduction de p53 [313].

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 [314], 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 [315][316].

g) Apoptose et arrêt du cycle cellulaire :

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 [317][318][319][320]. L'une des hypothèses retenue dans l'une de ces études pour expliquer ce paradoxe, serait que MDM2 présenterait une activité intrinsèque d'inhibition du cycle cellulaire qui pourrait être surmontée par la tumeur via la suppression d'autres facteurs promouvant le cycle, telle que la cycline A.

h) La migration et l'invasion :

Il a été démontré que MDM2 ubiquitinylait la protéine d'adhésion cellulaire E-cadhérine et la ciblait pour une dégradation via le protéasome 26S [321]. L'E-cadhérine joue un rôle crucial dans la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) qui se produit notamment lors du processus métastatique. Une diminution d'E-cadhérine entraîne une perte de polarité cellulaire et une baisse de l'adhésion cellule-cellule, favorisant ainsi la motilité cellulaire et le caractère envahissant, aboutissant bien souvent à une invasion du flux sanguin et à l'apparition de métastases. Fait intéressant, la surexpression de MDM2 se produit plus fréquemment dans les tumeurs métastatiques et récurrentes que dans les tumeurs primitives [322][323]. Ainsi, la surexpression de MDM2 pourrait potentiellement favoriser l'invasion de la tumeur et la formation de métastases via une régulation

négative de l'E-cadhérine. Cependant, l'importance de cette interaction dans la progression tumorale reste à confirmer.

IV - MDM2, une cible thérapeutique pour le cancer

De par son statut d'oncogène, principalement lié à son rôle majeur sur le suppresseur de tumeur p53, MDM2 est depuis plusieurs dizaines d'années au cœur de nombreuses stratégies thérapeutiques contre le cancer. Parmi toutes les approches développées pour perturber l'action de MDM2 dans la cellule on peut citer l'utilisation d'oligonucléotides antisens, de technique à base d'ARN interférence ou encore des composés naturels comme la Ginsenoside et le curcumin [324].

Cependant la grande majorité des études, ayant pour but de cibler MDM2, s'appuient sur la recherche de composés chimiques visant à perturber l'interaction entre MDM2 et p53 ou cherchant à induire la dégradation de MDM2. En effet, l'analyse cristallographique de l'interaction entre MDM2 et p53, a permis de montrer que la région de liaison de ces deux protéines met en jeu la structure en hélice- α de p53 avec la structure $\beta\alpha\beta$ de la région N terminal de MDM2. Il existe trois points clés sur cette structure en hélice de p53, les acides aminés Phe19, Trp23 et Leu26, qui vont directement interagir avec trois cavités hydrophobes formées à la surface de MDM2, appelées poche de liaison F19, poche de liaison W23 et poche de liaison L26 [325]. Ce sont ces caractéristiques qui vont être exploitées pour le développement de molécule ciblant MDM2. Dans cette partie, je passerai en revue ces principales classes de composés pharmacologiques.

1) Les nutlines :

En 2004, l'équipe de Vassilev a développé la première classe de petites molécules à noyau imidazol inhibitrices de MDM2 connue sous le nom de nutlines [326] (**Figure 31**). Des études de structure par cristallographie ont montré que la cis-imidazole se lie à p53 au niveau des sites de liaisons à MDM2 en imitant l'interaction des résidus d'acides aminés importants évoqués précédemment [327]. En effet, en raison de leur caractère hydrophobe, Trp23, Phe19 et Leu26 s'associent parfaitement bien à la poche hydrophobe de MDM2 [229]. La poche de liaison de p53 à MDM2 est stériquement inhibée par la liaison de la nutline, induisant ainsi une accumulation de p53 et une restauration de son activité transcriptionnelle, suivie d'une apoptose dans les cellules tumorales surexprimant MDM2 [328]. Les composés de type nutline induisent la stabilisation de p53, l'expression des gènes cibles de p21, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose [329]. Nutlin-1, Nutlin-2 et Nutlin-3 ont une perméabilité cellulaire suffisante pour provoquer une accumulation de p53 de manière dose dépendante. Seules les lignées cellulaires présentant p53 de type sauvage sont sensibles à ces composés. En effet, les cellules tumorales p53 mutantes ou p53 nulles pour le gène *TP53* ne présentent pas d'arrêt du cycle cellulaire ou de régulation positive de p53 suite au traitement [330]. *In vitro* et *in vivo*, la Nutlin-3 a une activité contre un large éventail de cellules cancéreuses ayant p53 de type sauvage [331]. Cependant, cette molécule présente un profil

pharmacologique inadéquat pour son utilisation en clinique. C'est pourquoi des scientifiques de Roche ont synthétisé le RG7112, une molécule de Nutlin-3a optimisée par modification structurale, dont l'activité inhibitrice est environ 4 fois plus forte que celle de Nutlin-3a. Le RG7112 a été testé dans des essais cliniques de tumeurs solides et liquides notamment contre des tumeurs de liposarcome [332]. Le point noir de ces études concerne les effets secondaires, comme l'apparition de nausées, vomissements, neutropénies ou thrombocytopénies due à une toxicité gastro-intestinale et hématologique, mais aussi une efficacité relativement faible.

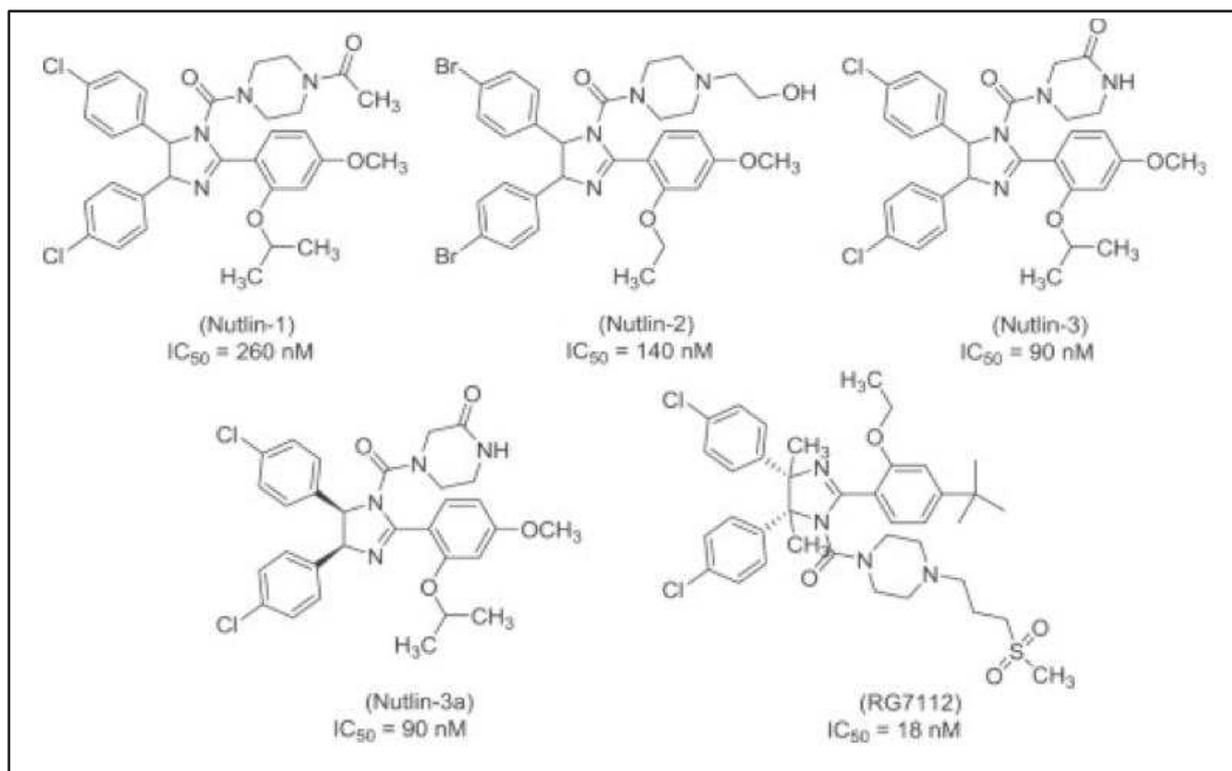


Figure 31 : Les différentes formules des composés de la famille de la nutline. (Adapté de Zhao et al (2013) [331]).

2) Les imidazoles :

Comme les nutlines, les imidazoles reposent sur le même principe de compétition allostérique au niveau du site hydrophobique de liaison entre p53 et MDM2.

Le cœur de ces molécules est l'imidazole WK23 [331]. Les chimistes ont ensuite conçu et synthétisé des composés d'imidazole dotés de structures différentes afin d'optimiser au maximum leurs effets biologiques (**Figure 32**). L'un des tournants majeurs dans l'élaboration de ces composés a été fait par l'équipe de Miyazaki, qui a remplacé le noyau imidazole par du dihydroimidazothiazole ayant une affinité et une stabilité plus grande que le composé mère. Ils ont par la suite conçu et synthétisé une série d'inhibiteurs contenant ce squelette du dihydroimidazothiazole dans l'objectif d'avoir une meilleure activité inhibitrice et de meilleurs IC₅₀ [333][334]. Cependant, en raison du poids moléculaire élevé de ces composés, leurs effets antitumoraux sont inférieurs à ceux des nutlines. On peut tout de même noter que des études récentes dans un modèle de xéno greffe de tumeur SJSA-1 ont montré une amélioration de la cytotoxicité non spécifique, une bonne activité antitumorale à une dose de 25 mg/kg-1, ainsi que de bonnes propriétés pharmacocinétiques, faisant de ces molécules des candidats prometteurs pour de futures études cliniques [335].

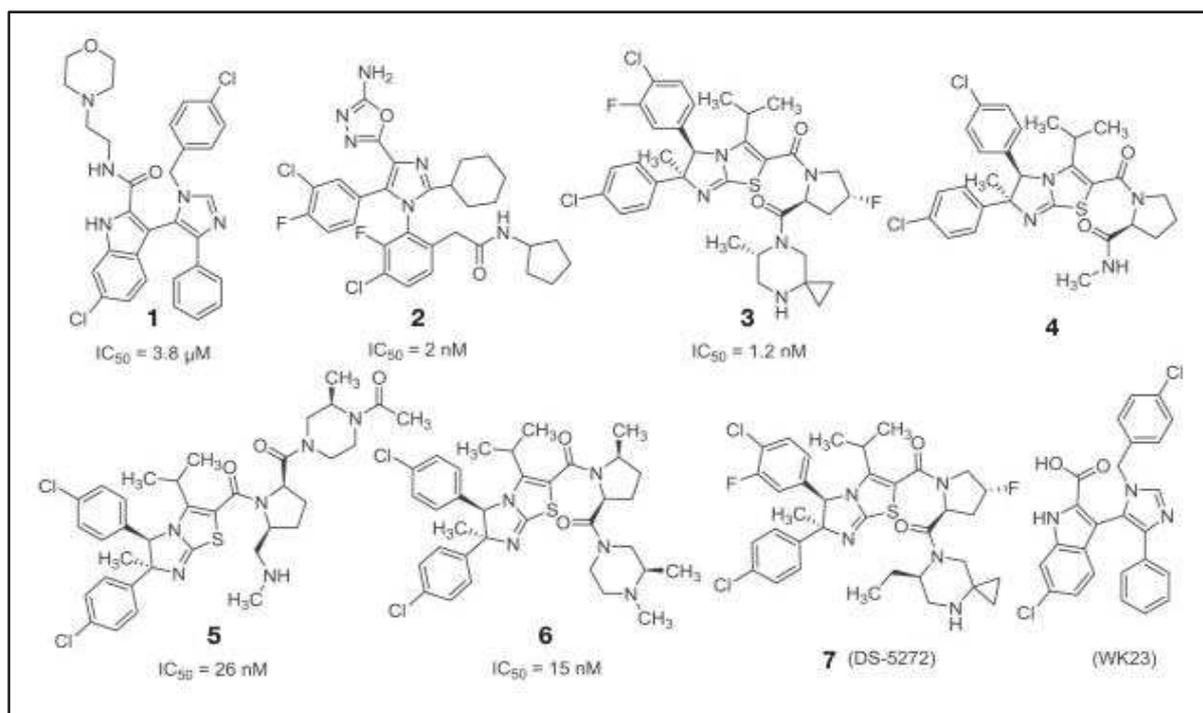


Figure 17 : Les différents dérivés d'imidazole qui ciblent l'interaction P53-MDM2. Les composés 1 et 2 sont les premières molécules ayant un cœur d'imidazole. Les composés 3, 4, 5 et 6 sont des dérivés ayant un squelette du dihydroimidazothiazole. Le composé 7 est la molécule ayant de meilleurs effets anti-tumoraux sur des modèles de xéno greffes de tumeur SJSA-1 (Adapté de Liu et al (2019) [336]).

3) Les benzodiazépines :

Les benzodiazépines sont une autre classe de petites molécules qui inhibent l'interaction entre p53 et MDM2 [330][337] (**Figure 33**). En 2005, Grasberger et son équipe, ont caractérisé pour la première fois le 1,4-benzodiazépine-2,5-dione (BDP) [338]. Le noyau benzénique de ce composé se lie à MDM2 en imitant la conformation du motif en triplet de p53 [339]. Des études d'amarrage moléculaire du complexe thiobenzodiazépine et MDM2 indiquent que l'interaction de liaison est médiée par les trois poches hydrophobes de MDM2 qui vont être comblées par trois cycles aromatiques de thiobenzodiazépine.

Ces composés ont montré *in vitro* une action prometteuse dans les cellules de cancer du sein MCF7 [340], mais également *in vivo*, sur des mélanomes. En effet, ces études ont montré qu'associés à la doxorubicine, ils induisent une inhibition de la croissance tumorale et une toxicité réduite en raison de la dose plus faible de doxorubicine requise [327]. Ces composés présentent une excellente activité de liaison pour MDM2 qui est même supérieur à celle de la Nutlin-3a. En effet, *in vitro*, la plupart des composés ont montré une meilleure activité biologique que la Nutlin-3a dans des cellules d'ostéosarcome ayant une protéine p53 de type sauvage [337]. Ainsi, les benzodiazépines représentent de nouveaux inhibiteurs de l'interaction MDM2-p53 prometteurs qui nécessitent une évaluation plus approfondie.

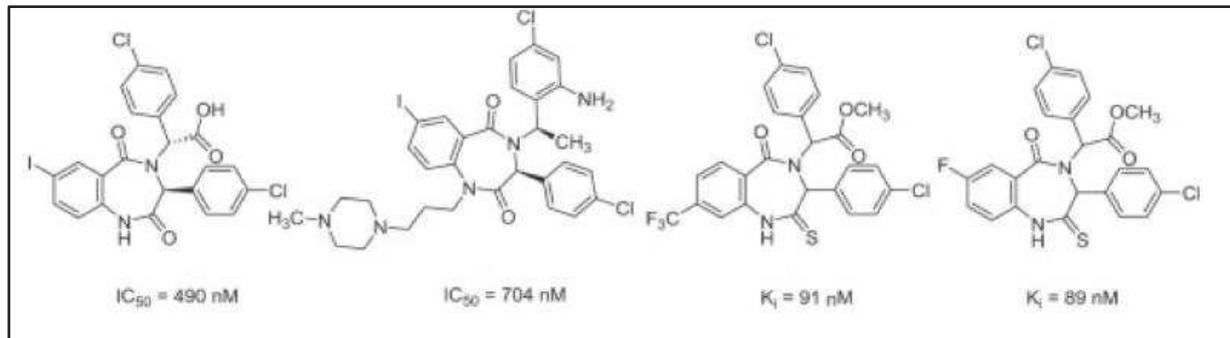


Figure 33 : Formules de certains Benzodiazépines développés ces dernières années. (Adapté de Barbieri et al (2006) [338]).

4) Les spiro-oxindoles et indoles :

La spiruline ruthénium est une autre petite molécule qui inhibe l'interaction de p53 et MDM2 [341]. Le cycle oxindole de cette classe de composés, imite Trp23 de la chaîne latérale de p53, essentiel pour la liaison à MDM2. Une substitution hydrophobe du cycle spiro-pyrrolidine permet de mimer les acides aminés Phe19 et Leu26 du reste de la chaîne latérale. Par la suite, des analyses ont montré que la Leu 22 est également essentielle pour la liaison de p53 et de MDM2, suggérant l'utilisation préférentielle de dérivés d'oxyde de ces molécules [341]. Ainsi, les spiro-oxydes ont vu le jour.

Dans un premier temps, deux composés (MI-63 et MI-219) (**Figure 34**) ont montré une activité *in vitro* significative, cependant, leurs profils pharmacocinétiques *in vivo* n'étaient pas satisfaisants [330][342]. Par la suite, un autre composé de la série MI a été développé, le MI-43, qui inhibe plus efficacement la croissance des cellules de type p53 sauvage. En effet, à de faibles concentrations, en raison de l'induction de p21, il induit un arrêt du cycle cellulaire et de la croissance dans les phases G1 et G2. À des doses plus élevées, il induit une apoptose PUMA/NOXA dépendante. Des études ont montré que l'utilisation en association de MI-43 avec l'étoposide, est moins toxique pour les cellules pulmonaires saines que pour les cellules cancéreuses et rend les cellules cancéreuses plus sensibles à l'apoptose induite par l'étoposide [328][343].

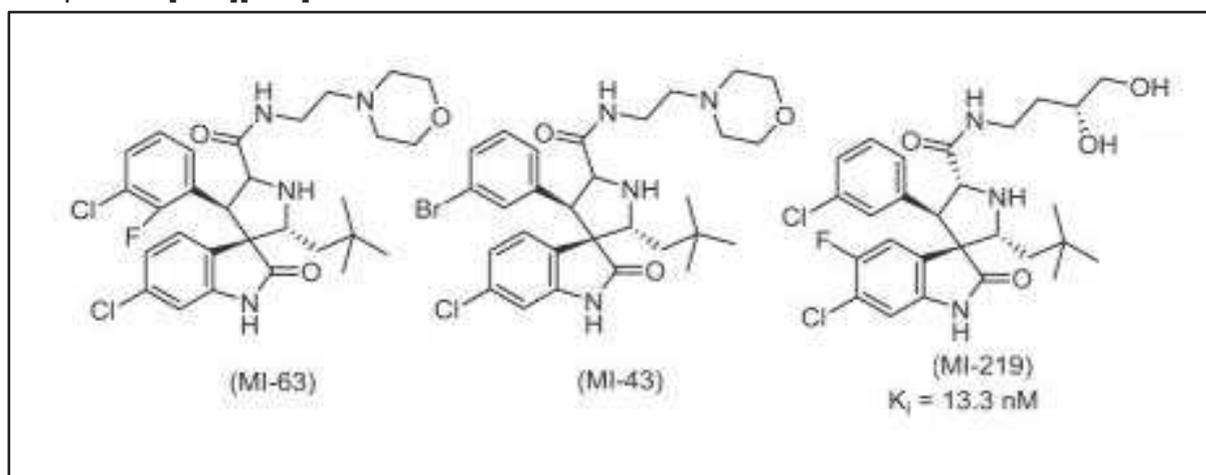


Figure 34 : Les premiers spiro-oxydes. (Adapté de Tonsing-Carter et al (2015) [341]).

Plus tard, l'équipe de Bartkovitz [344] a développé trois puissants spiro-oxydes (RO-5353, RO-8994 et RO-2468) (**Figure 35**), qui présentent tous des valeurs d'IC50 de l'ordre du nanomolaire. L'optimisation structurale de ces trois composés a donné naissance au MI-888, testé ensuite dans des expériences *in vivo* chez le rat. Les résultats de ces expériences menées sur deux modèles de xénogreffe de tumeurs humaines, ont montré que le composé MI-888 possède d'excellentes propriétés pharmacocinétiques et une efficacité *in vivo* accrue par rapport au composé MI-219 [329]. En effet, l'administration orale de ce composé sur les modèles d'ostéosarcome et de leucémie lymphocytaire aiguë a entraîné une régression tumorale rapide, complète et de longue durée.

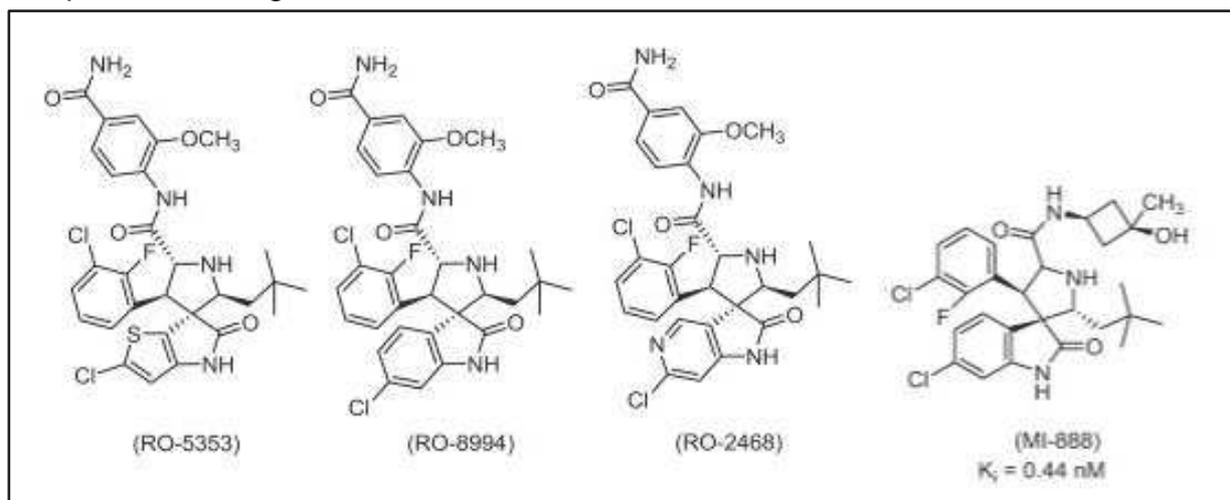


Figure 35 : Les spiro-oxydes optimisés par Bartkovitz. (Adapté de Wang et al (2014) [344]).

Toujours dans l'optique d'inhiber l'interaction p53-MDM2, le SAR405838 (**Figure 36**) est un composé hautement optimisé de la famille des spiro-oxydes [345][346]. Son mode de liaison est similaire à celui des autres spiro-oxydes qui consiste à mimer les trois résidus clés de p53, Phe19, Leu26, Trp23. Cependant, contrairement aux autres composés, le SAR405838 a une interaction supplémentaire au niveau de l'atome C1 de son groupe oxindole qui présente une interaction hydrophobe avec MDM2. De plus, contrairement à la structure de l'interaction entre p53 et MDM2 et entre la nutline et MDM2, l'extrémité N-terminale de MDM2 forme une interaction étendue avec le SAR405838. Ceci est dû au repliement des résidus 10 à 18 de MDM2, qui interagissent avec le SAR405838 via la Val14 et la Thr16 [345]. Grâce à ces interactions supplémentaires, le SAR405838 atteint un degré de liaison encore plus élevé que les autres spiro-oxydes. Son utilisation en clinique reste cependant à être évaluée.

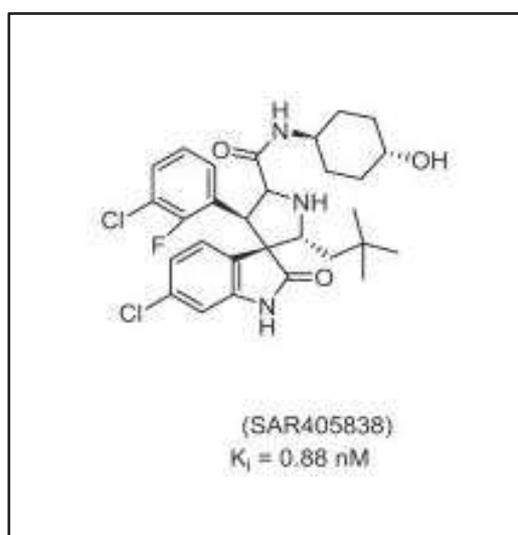


Figure 36 : Structure de SAR405838. (Adapté de Bykov et al (2002) [345]).

Grâce à la conception de médicaments assistée par ordinateur, l'équipe de Bista a conçu et synthétisé une série de dérivés de l'antraquinone [347] (**Figure 37**). Toujours en gardant le principe de mimer la liaison des trois résidus Phe19, Trp23 et Leu26 de p53, Bista et al. ont pour la première fois proposé l'introduction d'une quatrième liaison hydrophobe à la surface de MDM2. Des études d'amarrage moléculaire ont montré que ces composés ont une excellente affinité pour MDM2 et qu'*in vitro* ils présentent des IC₅₀ faibles (entre 400nM et 1,2nM). Cependant, peu d'informations concernant leurs effets *in vivo* sont disponibles. Seul le brevet américain US8058269B2 [348] fait mention d'une bonne activité de suppression des tumeurs [349].

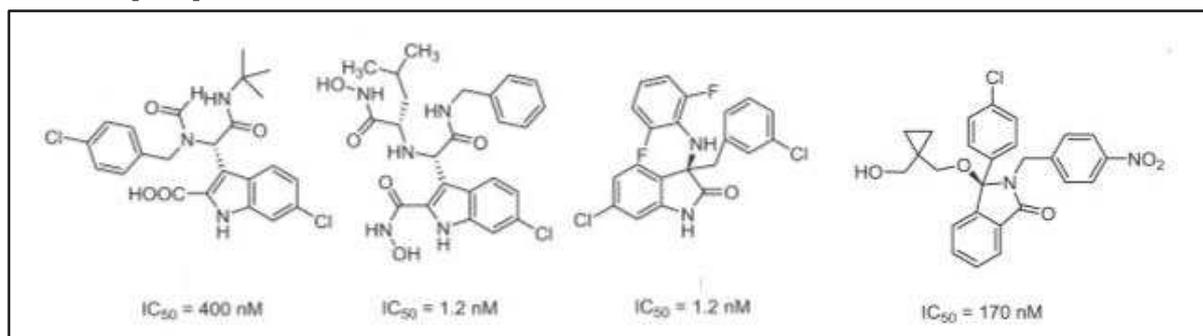


Figure 37 : Structure des différents dérivés de l'antraquinone. (Adapté de Bista et al (2013) [347]).

Finalement, pour clôturer ce chapitre sur les dérivés indolés, on peut citer un composé découvert par le laboratoire de Wang Shaomeng en 2017, le APG-115 (**Figure 38**) [350]. Il possède une haute affinité pour MDM2 (K_i<1 nM), inhibe la croissance cellulaire avec de faibles valeurs d'IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire et possède un excellent profil pharmacocinétique par voie orale.

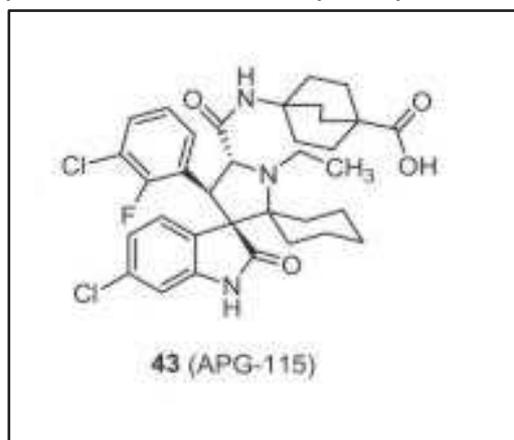


Figure 38 : Structure de APG-115. (Adapté de Aguilar et al (2017) [350]).

5) Les pyrido-indoles :

En 2014, toujours dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs de MDM2, en utilisant un criblage virtuel à haut débit de conception de médicament basé sur la structure, l'équipe de Wei Wang a identifié une série de dérivés de pyrido-[b]-indole en tant qu'inhibiteurs hautement spécifiques de MDM2 [351]. Parmi plus de 200 composés synthétisés, seuls les 45 meilleurs candidats possédant une excellente capacité de liaison à MDM2 ont été sélectionnés et synthétisés. Puis un criblage de sensibilité et d'activité anticancéreuse *in vitro* a été réalisé. Parmi ces composés, une petite molécule, appelée SP-141 (6-méthoxy-1-(naphtalén-1-yl)-9 H-pyrido [3,4-b] indole) (**Figure 39**) a montré une forte liaison à MDM2 et possède un effet *in vitro* puissant contre plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein. De plus, il diminue la croissance tumorale et inhibe les métastases *in vivo*.

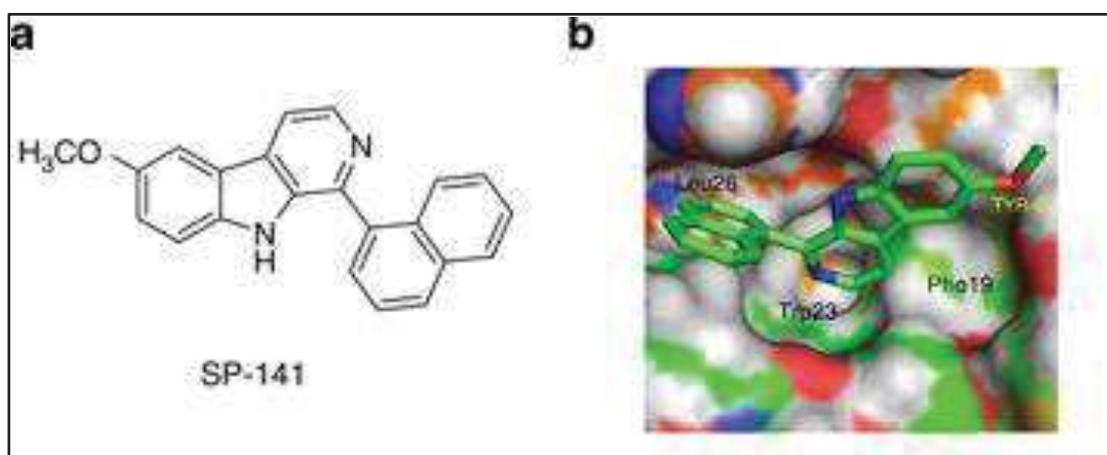


Figure 39 : a) Structure du SP141. b) En vert, SP141 se fixe dans la poche hydrophobe de MDM2. (Adapté de Wang et al (2014) [351]).

Il est important de noter, que dans les premières expériences réalisées avec le SP141, l'équipe de Wang a constaté que ce composé induisait, en plus de la stabilisation de p53, la dégradation de la protéine MDM2 dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-468. Grâce à des expériences de complémentation par un mutant de MDM2 (C464) dépourvu de son domaine E3 ligase, lui conférant ses propriétés d'ubiquitylation, ils conclurent que la dégradation de MDM2 était liée à son autoubiquitylation.

Plus tard, des analyses structurales de l'interaction MDM2-SP141 montrèrent que la fixation du SP141 au niveau de la poche hydrophobe de MDM2 induisait un changement de conformation de la protéine favorisant ainsi son autoubiquitylation et sa dégradation protéasomique [352].

Par la suite, l'équipe de Wang tenta d'optimiser le SP141 en vue d'une utilisation en clinique. L'administration orale d'agents thérapeutiques anticancéreux est toujours considérée comme la voie la plus commode et la plus privilégiée pour les soins aux patients [353][354]. En effet, la chimiothérapie orale permet une libération stable et prolongée du médicament et maintient une concentration modérée dans la circulation

sanguine. Cependant, la plupart des médicaments anticancéreux ne sont pas biologiquement adaptés pour la voie orale en raison de leur faible absorption. C'est par exemple le cas pour le SP141 [355], qui a montré une efficacité limitée *in vivo* lorsqu'il était administré par voie orale.

C'est pourquoi, l'équipe de Wang a mis au point un système d'encapsulation du SP141 dans une nanoparticule couplée à des portions Fc d'IgG. En effet, des études récentes ont démontré que la conjugaison de la portion Fc d'IgG à des nanoparticules peut améliorer l'absorption intestinale des nanoparticules intactes et prolonger leur persistance dans le sérum, entraînant une biodisponibilité orale améliorée et une accumulation accrue de médicaments dans le tissu, par exemple l'insuline [356][357]. Ainsi, une molécule SP141FcNP fut nouvellement développée (**Figure 40**). Elle présente une biodisponibilité orale améliorée, une absorption plus importante par la tumeur et une efficacité accrue *in vitro* et *in vivo* par rapport au SP141 libre, sans toxicité apparente pour l'hôte [355]. Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires, ces données démontrent le potentiel important du SP141FcNP en tant que système de délivrance orale pour le traitement du cancer du sein, mais aussi pour les cancers présentant des amplifications de MDM2.

L'intérêt du SP141 ou d'une molécule qui entraîne la dégradation de MDM2, est qu'elle offre l'opportunité de traiter des tumeurs sans tenir compte du statut de p53 puisqu'en plus de stabiliser p53, elle serait potentiellement efficace pour cibler les fonctions de MDM2 indépendantes de p53.

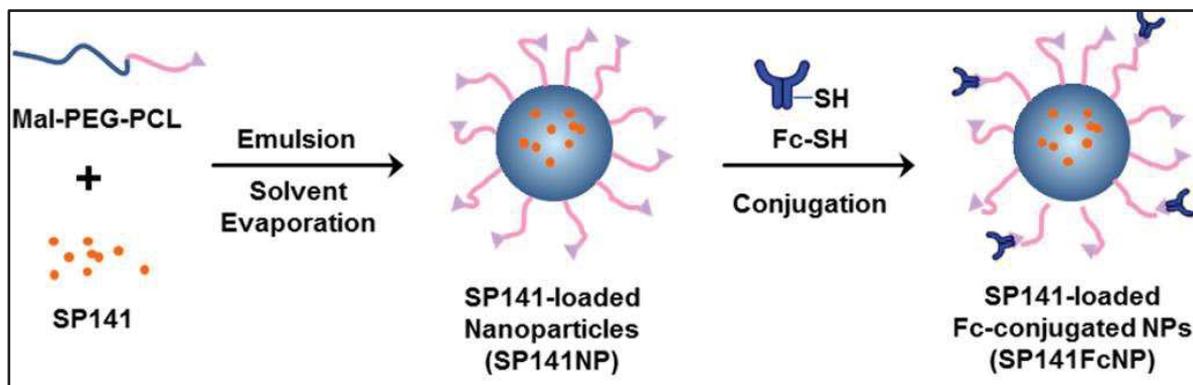


Figure 40 : Schéma de la conception du SP141FcNP. Les molécules de SP141 sont par émulsion encapsulées dans une nanoparticule de Mal-PEG-PCL, puis des fragments Fc d'IgG sont conjugués à cette enveloppe. (Adapté de Qin et al (2016) [355]).

V - Le liposarcome

Les sarcomes sont des tumeurs rares d'origine mésenchymateuse représentant 1 % de tous les cancers. Ces tumeurs sont hétérogènes puisque la dernière classification aidée de la biologie moléculaire a permis d'identifier plus de 100 sous-types histologiques différents [358]. Ces différents sous-types peuvent être regroupés en 3 catégories très hétérogènes : les sarcomes osseux, les sarcomes viscéraux et les sarcomes des tissus mous. Parmi cette dernière catégorie, environ 20 % sont des liposarcomes [359] pouvant également être classifiés en 4 sous-types histologiques différents selon leurs morphologies, leurs grades et leurs biologies moléculaires. On distingue ainsi :

| | |
|--------------------------|--|
| Bien différenciés | Le plus fréquent (environ 40-50 %) Bas grade, risque métastatique faible Risque de récurrence locale et à distance si mauvaise prise en charge initiale Risque de dédifférenciation. |
| Dédifférenciés | 15-20 % des LPS. Haut grade Sous-type le plus fréquent dans les sarcomes rétropéritonéaux Risque élevé de métastases |
| Myxoïdes | 20-30 % des LPS Grade intermédiaire. Inclut 2 sous-types différents : à cellules rondes et à haut grade. Sous-type histologique le plus fréquent chez les enfants. Risque métastatique intermédiaire et risque élevé de plurifocalité en particulier pour le type à cellules rondes. |
| Pléomorphes | Sous-type histologique le plus rare (5 à 10 %) Grade élevé Risque de récurrence locale et à distance élevé |

Tableau 1 : Adapté de Sarcomahelp.org [360].

Les liposarcomes bien différenciés (WDL) et les liposarcomes dédifférenciés (DDL) sont les sous-types histologiques les plus fréquents dans les liposarcomes et partagent beaucoup de similitudes dans leur physiopathologie et leur évolution [361][362]. Dans ce manuscrit et pour l'ensemble des études réalisées, les données portent uniquement sur ces 2 sous-types histologiques.

1) Caractéristiques cliniques :

Les WDL représentent environ 40 à 50 % des LPS, plus fréquents chez les hommes, avec un pic d'incidence dans la catégorie d'âge de 50 à 65 ans. Leur incidence globale est d'environ 1/200 000 par année [363][364]. Leur localisation est hétérogène avec une atteinte prédominante sur les membres inférieurs (50 % des cas sont localisés au niveau de la cuisse) et le rétropéritoine (30 % des cas). Ils touchent aussi les membres supérieurs dans 10 % des cas et peuvent survenir plus rarement dans les régions de la tête et du cou dans 5 % des cas [365]. Ces tumeurs se présentent généralement sous forme de masses, ressemblant beaucoup au tissu adipeux de type mature. Les circonstances de découverte sont souvent la palpation par le patient lui-même, la constatation d'une augmentation de volume d'un membre, et plus rarement la découverte fortuite ou sur complications mécaniques liées à la progression volumétrique de la tumeur (douleurs, occlusion digestive, compression des voies urinaires).

Les WDL sont considérés comme des tumeurs de bas grade, car leur capacité à métastaser est très faible. Cependant, les WDL peuvent se différencier sur n'importe quelle zone, avec une incidence d'environ 10 %, pouvant aller jusqu'à 28 % pour les tumeurs profondes, en particulier celles du rétropéritoine [366][367]. En revanche, l'incidence de la différenciation est beaucoup plus faible au niveau des extrémités et des tissus mous superficiels [368].

Histologiquement, les WDL sont divisés en différents sous-types : adipocytaire, sclérosant et inflammatoire. Le sous-type adipocytaire qui ressemble à un lipome est le plus fréquent. Il se caractérise par la présence de vacuoles comparables à celle des lobules d'adipocytes d'aspect mature ainsi que d'une cellularité faible. On y retrouve aussi des cellules fusiformes présentant des noyaux géants et une hyperchromatie.

Le WDL sclérosant, deuxième sous-type de WDL le plus commun, est plus fréquent dans les sites rétropéritonéaux et paratesticulaires et présente des cellules stromales atypiques au sein d'un stroma de collagène proéminent. Ce stroma fibreux peut s'étendre sur de larges zones rendant le diagnostic compliqué si les cellules lipogéniques ne sont pas présentes sur la biopsie.

Le liposarcome inflammatoire est un sous-type rare et plus fréquemment observé dans le rétropéritoine. Cette variante présente un infiltrât inflammatoire chronique marqué, comprenant le plus souvent des lymphocytes et des plasmocytes, avec des follicules lymphoïdes (**Figure 41**).

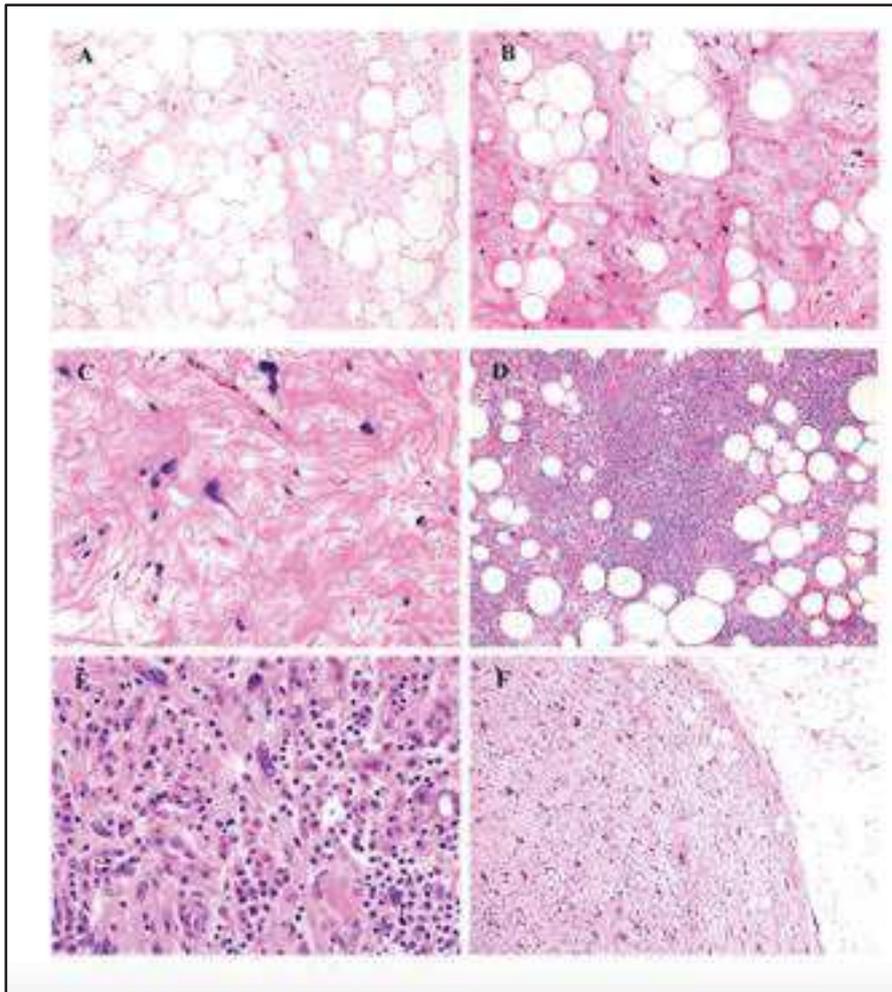


Figure 41 : Coloration HES de tumeur de patients. (A-B) WDL de type adipocytaire. (C) WDL de type sclérosant montrant des cellules stromales atypiques, dispersées dans un stroma de collagène proéminent. (D-E) WDL de type inflammatoire présentant un infiltrât inflammatoire chronique marqué, comprenant le plus souvent des lymphocytes et des plasmocytes. Le tissu adipeux de la tumeur est discernable ici (D), mais peut parfois être considérablement obscurci par l'infiltrât inflammatoire. (F) La jonction entre WDL et DDL varie, mais est souvent bien délimitée comme présenté ici. (Adapté de Thway (2019) [369]).

Les liposarcomes dédifférenciés sont plus fréquents chez les adultes d'âge moyen et plus âgés avec un pic entre 60 et 75 ans et une répartition à peu près égale entre les sexes. De rares cas ont également été observés chez les enfants et les adolescents [370][371]. L'incidence de ce sous-type est d'environ 1/330 000 personnes par an et représente environ 10 % de l'ensemble des LPS. Cependant, ce chiffre pourrait être revu à la hausse car les tumeurs de localisation rétropéritonéale sont parfois faussement diagnostiquées comme des histiocytofibromes malins [372]. En effet, le rétropéritoine est le site le plus fréquent, d'apparition des DDL, mais ils peuvent également survenir sur les extrémités, la région paratesticulaire et, moins fréquemment, dans le tronc, la tête et le cou [373][374].

Tout comme les WDL, les circonstances de découverte de la maladie sont le plus souvent la palpation par le patient lui-même, la constatation d'une augmentation de volume d'un membre, la découverte fortuite ou la survenue d'une complication mécanique liée à la progression volumétrique de la tumeur (douleurs, occlusion digestive, compression des voies urinaires...) et contrairement aux WDL le diagnostic peut être fait sur les métastases à distance (pulmonaires le plus souvent) ou par la découverte d'un syndrome inflammatoire (hyperleucocytose, correspondant à une augmentation de la vitesse de sédimentation et/ou de la protéine C réactive). Ce syndrome inflammatoire décroît après résection de la tumeur [375][376]. Environ 90 % des DDL apparaissent *de novo*, tandis que le reste des DDL sont des WDL qui se sont dédifférenciés avec une médiane de temps aux alentours de 7,7 ans [368] [377]. Les DDL se caractérisent souvent par le développement de masses indolores, d'une croissance rapide et d'un fort potentiel métastatique. D'un point de vue morphologique, les DDL ont généralement l'apparence d'un sarcome pléomorphe indifférencié ou d'un sarcome à cellules fusiformes [378]. Cependant, les DDL peuvent ressembler à plusieurs autres types de sarcomes selon leur schéma de dédifférenciation et leur grade, rendant leur diagnostic difficile. On peut définir les DDL comme étant des sarcomes de haut grade, avec une croissance locale agressive et un risque accru de récurrence et de décès lié à la tumeur. En effet, avec un taux de récurrence local d'environ 40 %, un taux de métastases de 15 à 30 % et une mortalité liée à la maladie de 28 %, ils sont associés à un plus mauvais pronostic que les WDL [368][379].

| Type | Taux de survie globale à 5 ans |
|-----------------------------|--------------------------------|
| LPS Bien différenciés | 93 % |
| LPS Dédifférencié (grade 2) | 57 % |
| LPS Dédifférencié (grade 3) | 21 % |

Tableau 2 : Adapté de Gronchi et al (2015) [380].

Les métastases peuvent avoir différentes localisations : (le plus fréquemment au niveau du poumon, possibles au niveau des os, du foie et très rarement au niveau du cerveau). Elles peuvent être localisées au niveau du péritoine et du rétropéritoine pour les DDL dont la tumeur primitive avait une localisation rétropéritonéale. D'autres localisations sont moins fréquentes comme la région paratesticulaire, le dos et la cuisse [381][373][367]. L'évolution métastatique est plus fréquente pour les DDL *de novo* avec une espérance de vie limitée aux environs d'un an après le début des métastases [381]. De plus, la localisation rétropéritonéale constitue le facteur pronostique le plus défavorable pour les DDL [368].

Les DDL sont généralement des tumeurs multinodulaires volumineuses (>10 cm) allant de molles, moyennement fermes à solides. Histologiquement, la démarcation entre WDL et DDL est relativement nette (**Figure 41F**). Néanmoins, il arrive qu'elle soit progressive, présentant un entremêlement cellulaire de WDL et de DDL. Il arrive aussi que des zones de DDL puissent s'intégrer dans le tissu adipeux mature sain environnant et donner l'impression d'un WDL (**Figure 42A**). Sur les coupes de biopsie, on voit fréquemment que les DDL entourent et enveloppent les organes

adjacents. Une invasion d'organes est d'ailleurs observée dans environ 60 % des cas. Généralement, les DDL présentent une cellularité élevée et manifestent morphologiquement des caractéristiques de sarcome pléomorphe indifférencié ou à cellules fusiformes, bien que ce ne soit pas les seules présentations morphologiques possibles : les cellules peuvent être organisées en distributions sans motif, en faisceaux lâches ou avec une architecture en forme d'histiocytome fibreux malin (**Figure 42B – D**).

Tout comme pour les WDL, les DDL peuvent dans certains cas, présenter un stroma de type myxoïde (une morphologie de haut grade ressemblant à un myxofibrosarcome) [382] (**Figure 42E**). Les DDL avec une composante myxoïde peuvent contenir de nombreux vaisseaux et présenter un stroma abondant ressemblant à un œdème pulmonaire. Enfin, plus rarement, les DDL ont une morphologie dite « de bas grade » et présentent une cellularité relativement faible (**Figure 42F**).

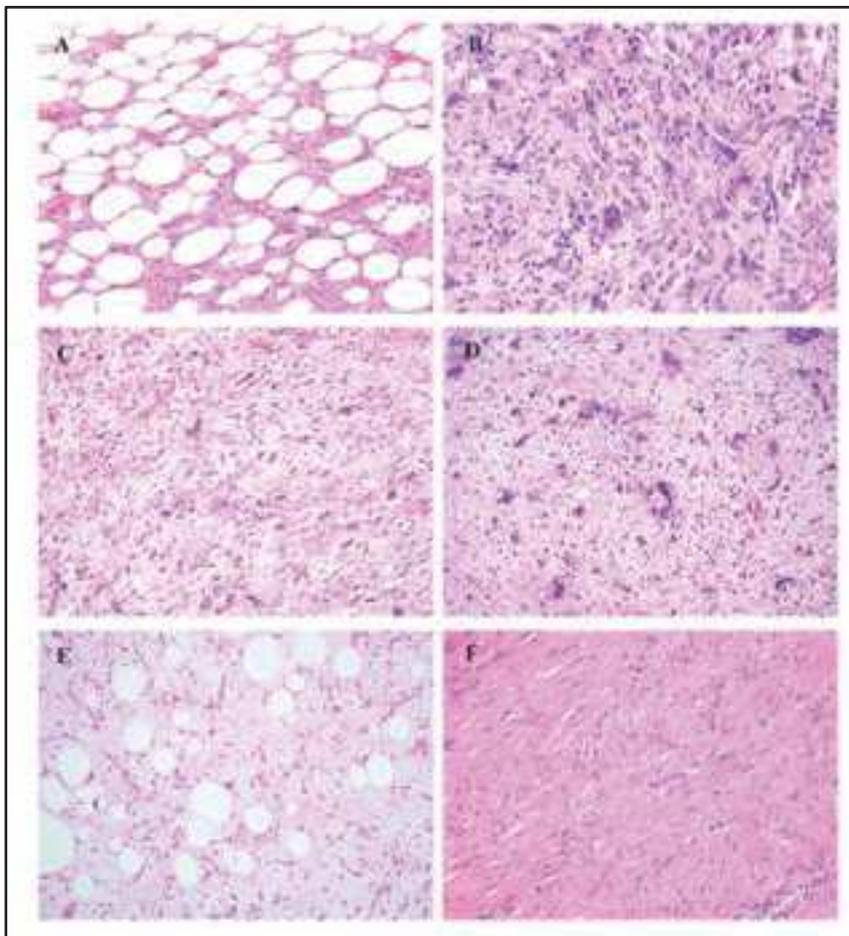


Figure 42 : Coloration HES de tumeur de patients. (A) DDL présentant un infiltrât dans du tissu adipeux sain pouvant être confondu avec un WDL. (B – D) DDL présentant différentes morphologies, bien que la plupart présentent généralement une cellularité modérée ou élevée. (E) DDL ayant une composante myxoïde variable, semblable à celui du myxofibrosarcome. (F) Moins fréquemment, les DDL présentent un motif de « bas grade », de cellularité relativement faible. (Adapté de Thway (2019) [369]).

2) Génétique :

Les WDL et les DDL partagent la même anomalie génétique de base, des amplifications massives dans la région chromosomique 12q13-15. Les séquences amplifiées provenant du bras long du chromosome 12 portent notamment plusieurs gènes tels que *CDK4* et *MDM2*. Génétiquement, les WDL sont caractérisés par des chromosomes surnuméraires anormaux, souvent sous forme de chromosomes en anneaux, contenant les séquences du chromosome 12 [383]. La plupart des DDL présentent aussi ces caractéristiques, bien que les amplicons soient incorporés à l'intérieur des chromosomes [384][385]. Cette région comprend plusieurs gènes, notamment *CDK4* et *MDM2*, mais aussi *HMG2*, *CPM*, *SAS / TSPAN31*, *YEATS4* et *DDIT3* [384][386][387]. Toutefois, il est intéressant de noter que parmi ces gènes (localisés sur des amplicons différents), seul *MDM2* est amplifié de manière constante. C'est d'ailleurs pourquoi, dans la littérature, son amplification est souvent évoquée comme étant probablement l'un des premiers événements de la formation des WDL et des DDL [388][384]. On notera que *CDK4* bien que fréquemment amplifiée, ne l'est pas toujours dans les WDL et les DDL [389].

Les profils d'amplification des gènes de la région 12q13-15 varient de manière significative entre les différents WDL et DDL, mais de manière générale, les rapports d'amplification moyens sont significativement plus fréquents et plus élevés dans les DDL par rapport aux WDL. Ces différences dans les profils d'amplification géniques entre WDL et DDL sont probablement liées à la progression de la tumeur et à sa différenciation. En effet, les DDL sont globalement considérés comme ayant une complexité génomique plus importante [390][391]. Parmi les modifications génétiques supplémentaires entre les DDL et les WDL, on retrouve notamment une co-amplification de la région 1p32.2. Environ un quart des DDL présentent cette amplification de 1p32.2 portant le gène *JUN*, tandis qu'elle est absente chez les WDL [392]. Il a été démontré que l'amplification de *JUN* et de ses kinases en amont participerait à l'oncogenèse des liposarcomes. En effet, des études *in vitro* et de xénogreffes ont montré que l'amplification et la surexpression de *JUN* bloquent la différenciation adipocytaire dans les sarcomes, ce qui pourrait constituer l'un des points clefs de la différenciation des WDL en DDL [393][394]. Bien que WDL et DDL présentent des profils d'expression génique différents et des caryotypes complexes, il est intéressant de noter que ces tumeurs sont très rarement associées à des mutations de TP53 [277][395].

3) Diagnostic :

Au niveau protéique, la grande majorité des WDL et des DDL expriment MDM2 et CDK4 (97 % et 92 % respectivement), avec une corrélation forte entre l'expression protéique et le statut d'amplification génique [396]. Des marquages par immunohistochimie sont donc couramment utilisés en clinique pour diagnostiquer les liposarcomes. Sur l'aspect morphologique le diagnostic d'un WDL peut être difficile à différencier d'une tumeur adipeuse bénigne, pour les DDL le diagnostic peut être difficile à faire avec un sarcome indifférencié de haut grade. C'est pourquoi, l'immunohistochimie avec un triple marquage de la combinaison CDK4, MDM2 et p16 est d'une grande aide diagnostique. En effet, 100 % des WDL et 93 % des DDL expriment au moins deux antigènes du groupe CDK4/MDM2/p16, permettant ainsi une meilleure valeur discriminante que ceux réalisés avec MDM2 ou CDK4 seuls [397]. Parfois avec les marquages MDM2 et CDK4, il est difficile de reconnaître les DDL n'ayant pas de composante WDL ou les DDL *de novo*. Afin d'améliorer les performances diagnostiques, des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (**Figure 43**), reflet de l'état de l'amplification d'un gène, ont montré que 100 % des DDL du rétropéritoine et de la cuisse présentaient une amplification de *MDM2* et/ou *CDK4* contre 13 % pour les sarcomes pléomorphes indifférenciés (souvent confondu avec des DDL) [398]. L'utilisation de l'hybridation *in situ* en fluorescence pour évaluer l'état de l'amplification de MDM2 est devenue une méthode plus sensible et plus spécifique que l'immunohistochimie, permettant de distinguer les WDL des lipomes [399][400] et les DDL des sarcomes indifférenciés [401].

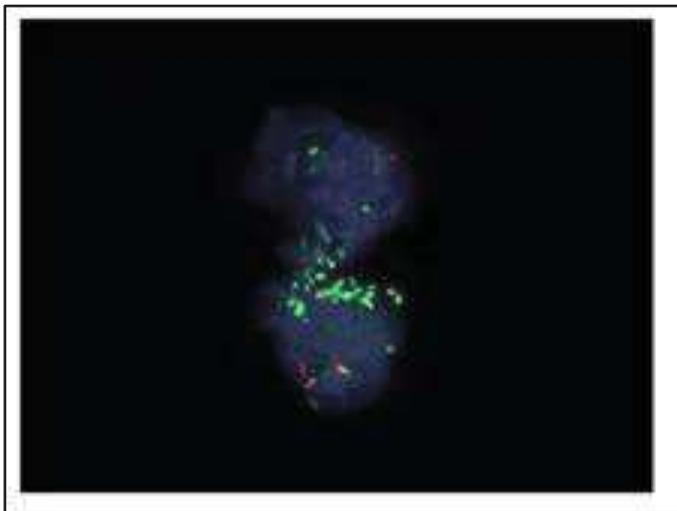


Figure 43 : Amplification de *MDM2* par FISH sur une biopsie de DDL. (Adapté de Thway (2019) [369]).

4) Prise en charge, traitements et thérapies futures :

Aujourd'hui, la résection chirurgicale radicale reste le pilier du traitement des LPS. Les WDL et les DDL ont tendance à avoir une faible réponse aux agents cytotoxiques (tels que la Doxorubicine, l'Ifosfamide) et aux thérapies ciblées telles que le Pazopanib [402][403][404]. La radiothérapie néoadjuvante peut être proposée dans des cas de LPS difficilement opérables. Pour les DDL récidivants localement, le taux de récurrence à 3 ans est de 49 % sans radiothérapie, comparativement à 34 % avec la radiothérapie, avec un impact mineur sur la survie globale [405]. Les options disponibles pour les patients atteints de WDL et DDL sont relativement limitées, d'où la nécessité de trouver de nouvelles approches thérapeutiques efficaces. L'amplification de *MDM2*, une protéine qui, rappelons-le, altère l'activité apoptotique de p53, provoquant la prolifération tumorale [325], a donné lieu à de nouvelles approches pour le traitement des WDL et des DDL. Parmi elles, une approche visant à bloquer l'interaction entre MDM2 et p53, rétablissant ainsi l'activité de p53 afin d'entraîner un arrêt du cycle cellulaire et déclencher l'apoptose. L'utilisation des nutlines, de petites molécules d'imidazole, agissant en tant qu'inhibiteurs spécifiques et efficaces de cette interaction, ont montré leur efficacité *in vitro* sur des lignées de sarcomes [406]. Cependant, les études cliniques réalisées avec ces composés, n'ont pas montré de bénéfice pour les patients [332][407].

En parallèle, des inhibiteurs de CDK4, tels que PD0332991 et le flavopiridol, sont en cours d'évaluation. Ils ont démontré une activité clinique prometteuse pour le traitement des WDL et des DDL, bien qu'ils présentent pour l'instant une forte toxicité [408][409]. En raison de la résistance relative des WDL et des DDL à la chimiothérapie conventionnelle et des options encore limitées pour ces patients, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les liposarcomes ont sélectionné une génétique si singulière afin d'améliorer et revoir la stratégie thérapeutique. C'est dans ce contexte que reposent les enjeux de ma thèse.

VI - Objectif de la thèse

En 2015, lorsque j'ai rejoint l'équipe de Laurent Le Cam, le travail du Dr Laetitia Linares et de son étudiant en thèse Romain Riscal, visait à étudier les mécanismes de recrutement de MDM2 au niveau de la chromatine et de décortiquer son rôle dans la cellule de façon indépendante de p53. Ils avaient alors montré que MDM2 pouvait, en réponse à un stress oxydant ou une déprivation en sérine, s'associer à ATF4 et former un complexe au niveau de la chromatine pour induire l'expression d'un programme transcriptionnel lié au métabolisme de la sérine.

Ce travail auquel j'ai contribué lors des révisions de l'article (publié en 2016) est à la base de mon projet de thèse.

En effet, l'objectif initial de mon projet était d'évaluer si cette nouvelle fonction de MDM2 pouvait être impliquée dans un développement tumoral particulier.

Comme évoqué dans l'introduction, les WD-LPS et les DD-LPS sont des tumeurs rares caractérisées par une amplification quasi systématique de MDM2. Les options thérapeutiques pour ces patients sont très limitées et c'est dans ce contexte que ma thèse a cherché à évaluer le rôle des fonctions métaboliques de MDM2 dans le développement des LPS, dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

J'ai donc tenté de :

- Montrer pour la première fois que MDM2 est un régulateur essentiel du métabolisme de la sérine dans les WD/DD-LPS à la fois *in vitro* et *in vivo*.
- Montrer que le métabolisme de cet acide aminé non essentiel joue un rôle déterminant dans le développement des WD/DD-LPS.
- Développer des outils techniques d'analyse métabolomique (en collaboration avec la plateforme Métatoul de Toulouse) pour analyser les flux métaboliques des cellules de liposarcome.
- Apporter des preuves moléculaires permettant d'expliquer la faible réponse thérapeutique des patients atteints de LPS à la Nutlin-3a.
- Démontrer que l'inhibition génétique ou pharmacologique de MDM2 par une nouvelle classe d'inhibiteurs de MDM2 conduisant à sa dégradation, ainsi que le ciblage de certains de ses gènes cibles impliqués dans le métabolisme de la sérine, représente une nouvelle stratégie thérapeutique pour ces tumeurs.

Ce travail fait l'objet d'une publication originale, en cours de révision chez *Science translational Medicine*, dont je suis le premier auteur, et a également conduit à un dépôt de Brevet à l'« Office européen des brevets » en décembre 2017 (patent N°EP17306681).

Parallèlement à ce projet, j'ai participé au travail d'un post-doctorant (Giuseppe Arena) qui a montré qu'une fraction de MDM2 pouvait être localisée dans la mitochondrie pour contrôler la transcription du génome mitochondriale et les conséquences qui en découlent sur la respiration. Ce travail, qui a fait l'objet d'un article dans *Molecular Cell*, dont je suis le deuxième auteur, a permis de mettre en lumière une fonction encore inconnue de MDM2.

Dans la partie résultats de ce manuscrit, je présenterai donc dans un premier temps les articles de Riscal et al., ainsi que d'Arena et al., auxquels j'ai contribué et qui ont permis d'améliorer nos connaissances sur les fonctions de l'oncogène MDM2, indépendante de p53. J'introduirai ensuite mon article en tant que premier auteur sur l'étude des fonctions métaboliques de MDM2 dans le développement du liposarcome. Enfin je présenterai le brevet qui en découle et qui résume les potentielles applications de ce travail.

VII - RESULTATS

Article :

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

Romain Riscal, Émilie Schrepfer, Giuseppe Arena, **Madi Y. Cissé**, Floriant Bellvert, Maud Heuillet, Florian Rambow, Éric 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.

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

Introduction :

L'oncoprotéine MDM 2 est connue pour être le principal régulateur négatif du suppresseur de tumeur p 53. 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 p 53 KO. Les rôles de MDM 2 indépendamment de p 53 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 p 53 dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et de l'apoptose , ceci est une nouvelle zone d'influence pour p 53 qui est en plein essor . En outre, il est clair que le rôle de p53 dans le métabolisme aura des conséquences dans l a mise en place et la progression de la maladie.

Cependant la possibilité que des régulateurs en amont de p 53 puissent jouer un rôle dans le métabolisme reste trop peu étudiée . L'article qui suit fait l'objet d'études sur un nouveau rôle de MDM 2 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.

Résultats :

Pour mieux comprendre les différentes fonctions oncogéniques de MDM2, nous avons évalué la localisation cellulaire de MDM2 dans un panel de lignées de cellules cancéreuses. Ces expériences de fractionnement subcellulaires ont montré qu'une fraction de la quantité totale de MDM2 était associée à la chromatine et ce de manière indépendante de p53. En effet, la quantité de MDM2 liée à la chromatine ne correspond pas au statut de p53 de ces lignées cellulaires et ce recrutement a également été détecté dans la lignée cellulaire de cancer du poumon H1299 p53-nulle. Par la suite, des analyses structure/fonction ont permis d'identifier le domaine impliqué dans le recrutement de MDM2 à la chromatine. Le domaine acide central contrôle négativement ce recrutement. En effet la construction et la surexpression d'un mutant de MDM2 dépourvu de son domaine acide (désigné MDM2 Δ AD) a été principalement détecté dans la fraction enrichie en chromatine. L'ajout d'une mutation ponctuelle supplémentaire dans le domaine RING de MDM2 qui supprime son activité E3 ligase (MDM2 Δ AD-C464A) était comparable à celui du mutant MDM2 Δ AD, indiquant que la fonction E3 ligase de MDM2 n'est pas indispensable pour son recrutement à la chromatine.

Par la suite, des analyses pan-génomiques par immuno-précipitation de chromatine couplées à du séquençage haut débit (Chip-seq) et de Micro-array ont montré que la signature des gènes régulés par MDM2 était significativement concordante avec les gènes cibles des facteurs de transcription ATF3/4. Nous avons ensuite montré que MDM2 et ATF3/4 formaient ensemble un complexe au niveau de la chromatine pour réguler directement l'expression de nombreux gènes et notamment une grande partie impliquée dans le métabolisme de la sérine/glycine, de la glutamine ou encore de la cystéine.

Nous avons ensuite évalué l'impact du contrôle par MDM2 du métabolisme de la sérine/glycine sur la croissance tumorale. Des cellules H1299 exprimant de manière stable des shRNA contrôles ou dirigées contre MDM2 ont été xénotreffées sur des souris nues placées sous régime alimentaire normal ou dépourvu de sérine/glycine. De manière frappante, l'absence de sérine et de glycine a altéré le potentiel tumorigène des cellules H1299 shMDM2, avec un impact nul ou faible sur celui des cellules H1299 contrôles. Nos données indiquent que la privation de sérine/glycine déclenche le recrutement de MDM2 à la chromatine pour activer un programme de transcription qui soutient la synthèse de sérine et la croissance tumorale.

Les travaux de Romain Riscal ont également permis de montrer que la fraction chromatinienne de MDM2 contrôlait aussi l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la balance redox de la cellule, notamment via la synthèse de glutathion, dans le but de prévenir les dommages liés au ROS et ainsi maintenir la prolifération des cellules cancéreuses.

D'un point de vue mécanistique, nous avons observé qu'en réponse à un stress oxydant ou une privation de sérine, MDM2 était recruté à la chromatine de façon dépendante de l'activité de PKM2. En effet, MDM2 est efficacement recruté à la

chromatine dans des cellules faiblement actives en PKM2, ainsi que dans ces deux situations de stress, qui modifient l'activité de PKM2. Grâce à l'utilisation de protéines recombinantes *in vitro*, nous avons prouvé que PKM2 se liait directement à MDM2 ainsi qu'avec une kinase encore non identifiée, pour jouer sur l'état de phosphorylation de la Ser166 et la Thr351. Lorsque ces deux sites du domaine acide de MDM2 sont déphosphorylés, MDM2 est alors recruté à la chromatine pour jouer son rôle d'activateur transcriptionnel.

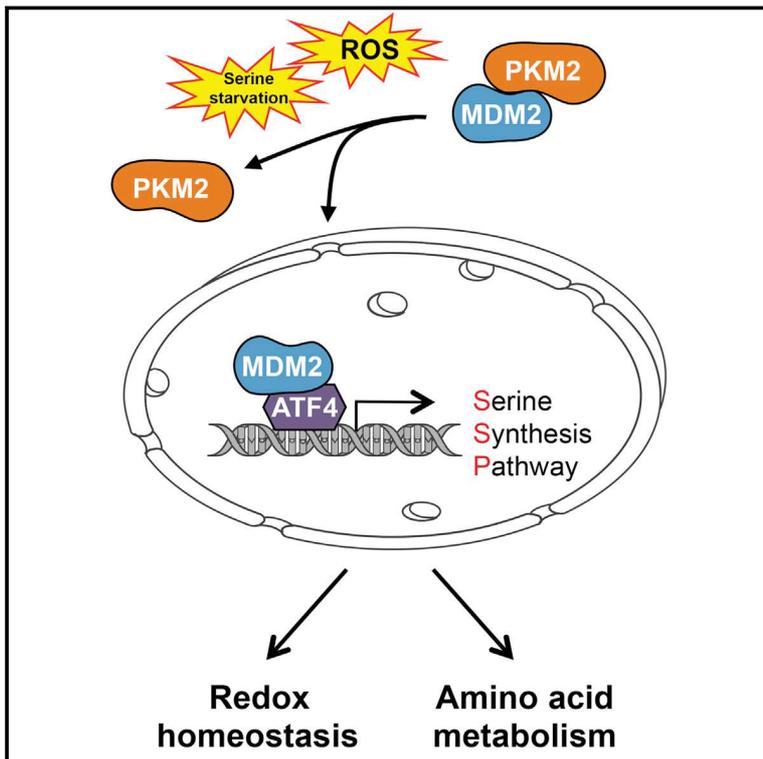
Conclusion :

L'oncogène MDM 2 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 MDM 2 est capable indépendamment de p 53 de contrôler le métabolisme de s cellules cancéreuses faisant de lui une cible potentielle dans le traitement de cancers en particulier ceux qui ont une amplification du gène *MDM2* ou une surexpression de la protéine MDM2.

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



Riscal et al., 2016, *Molecular Cell* 62, 890–902
June 16, 2016 © 2016 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.033>

CellPress

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

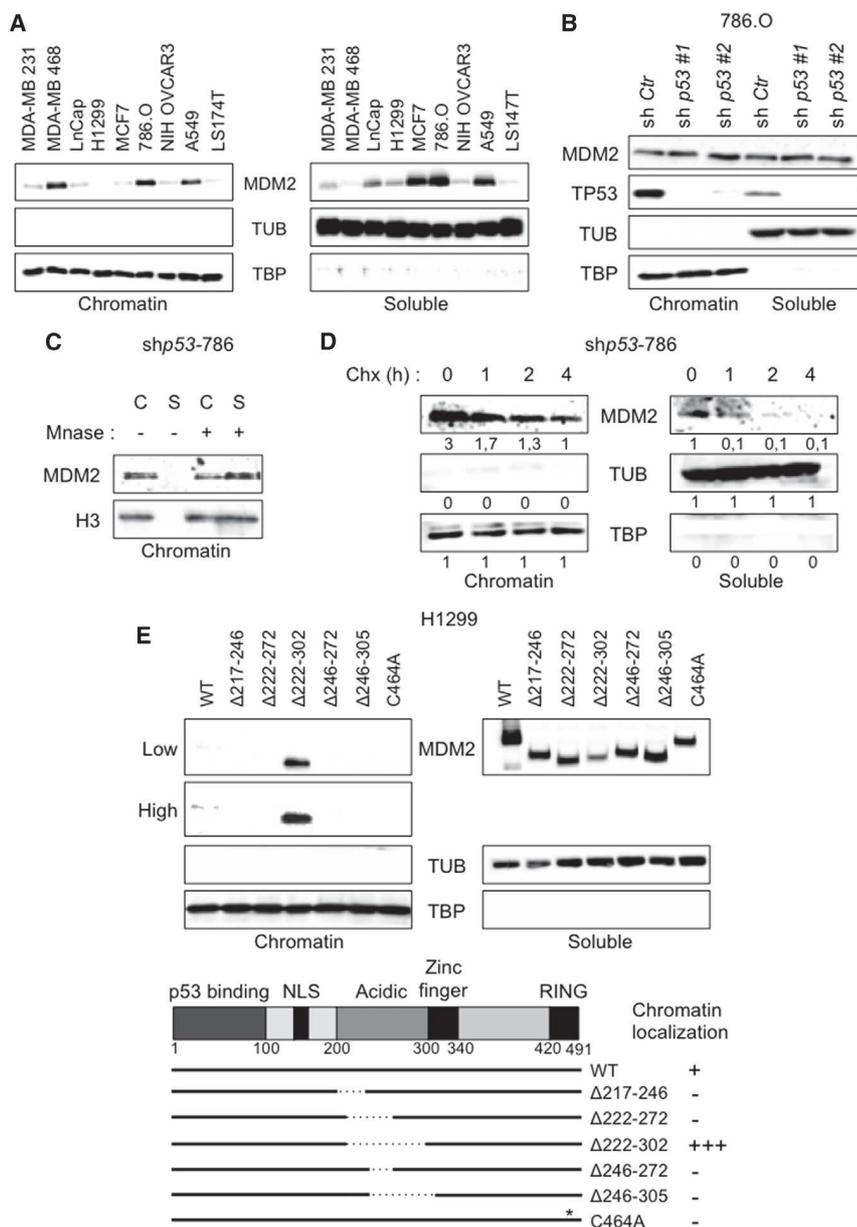


Figure 1. Mdm2 Is Localized in Chromatin Independently of p53

(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 nucleolar- 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.O 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.O 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

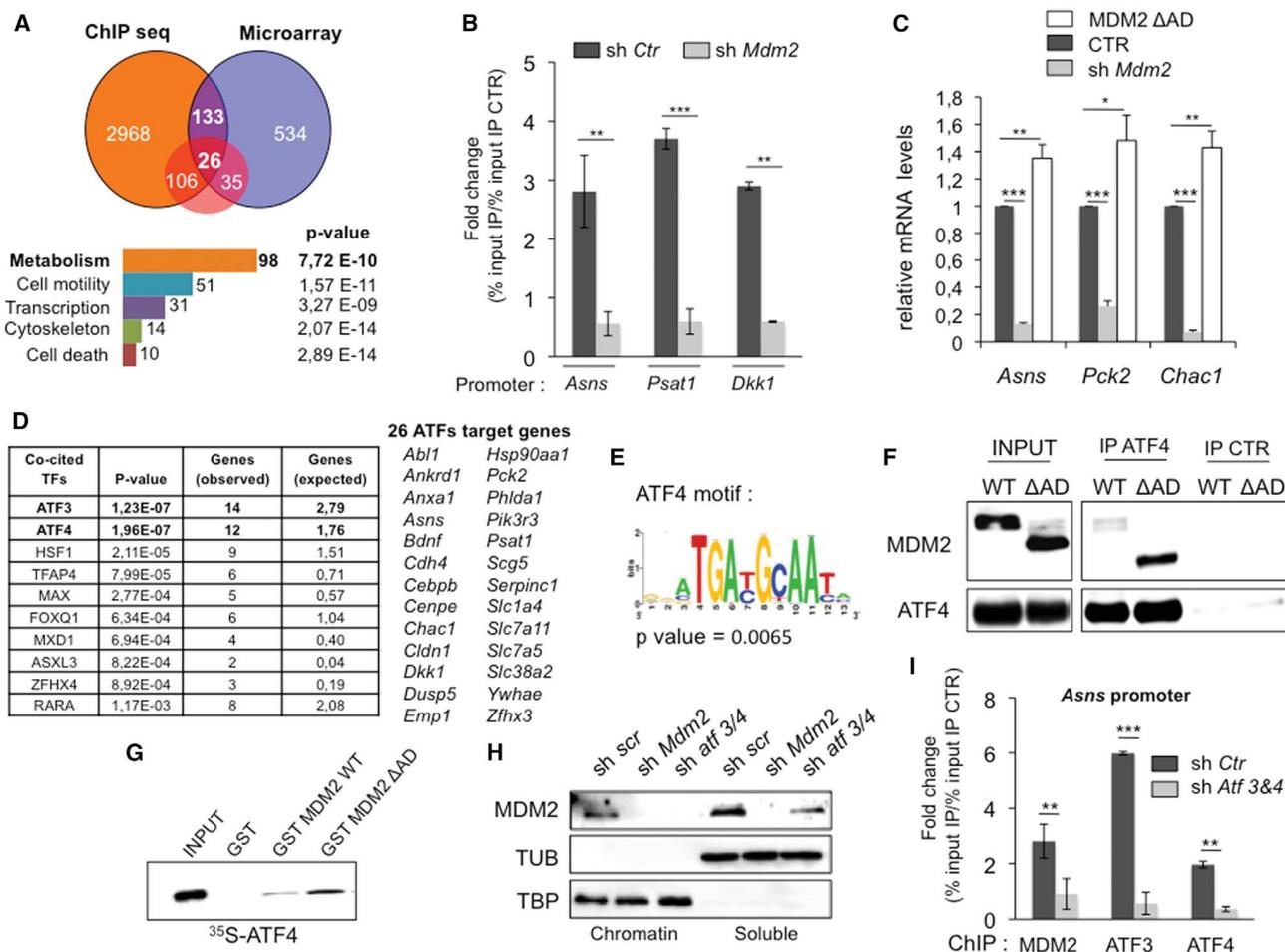


Figure 2. Chromatin-Bound MDM2 Regulates an ATF-Dependent Transcriptional Program

(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.

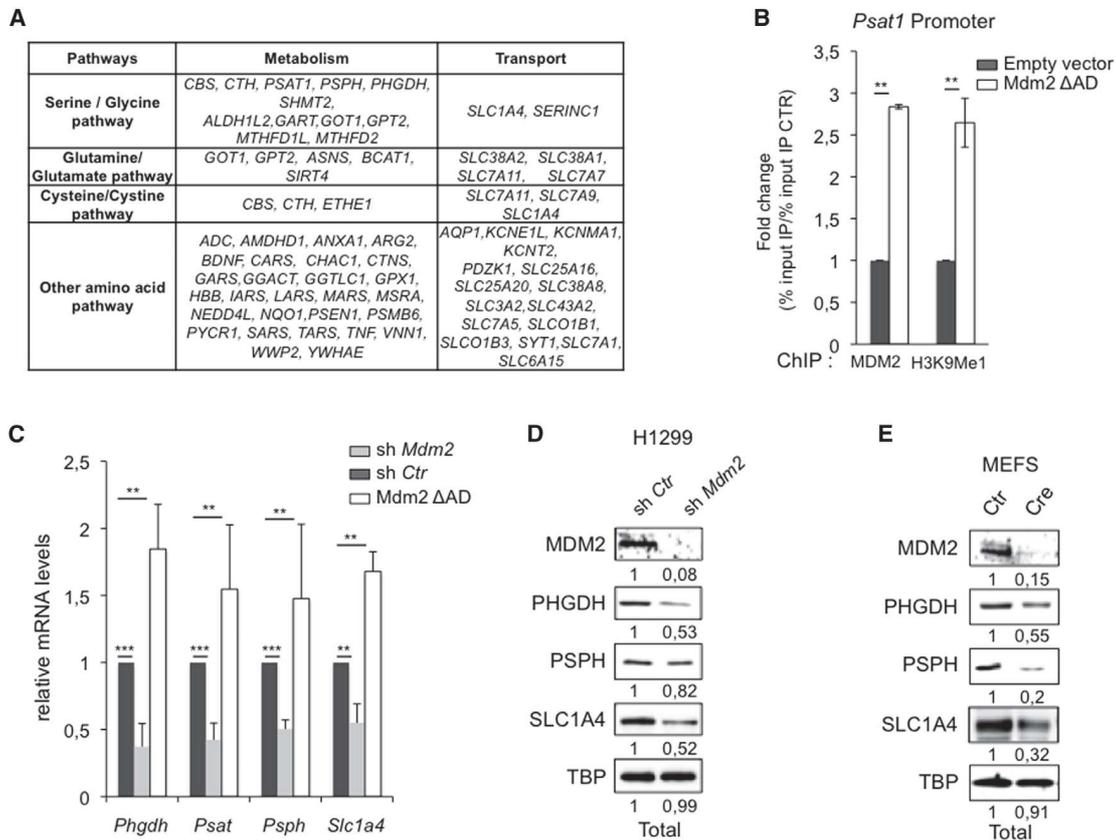


Figure 3. Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism

(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 *Psp*, *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 (*Psp*), 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*, *Psp*, 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

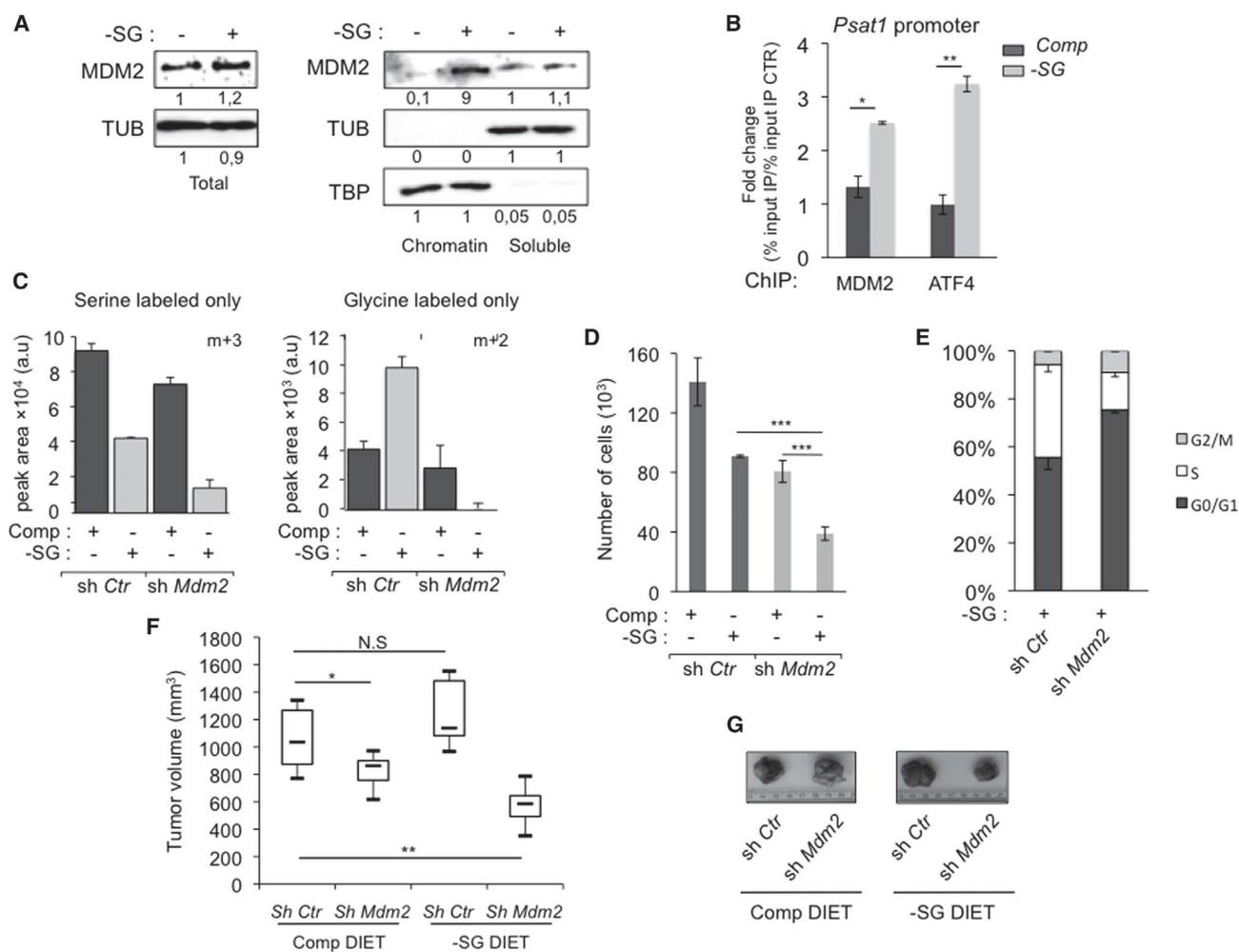


Figure 4. Serine/Glycine Deprivation Regulates MDM2 Recruitment to Chromatin

(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 [U - ^{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.

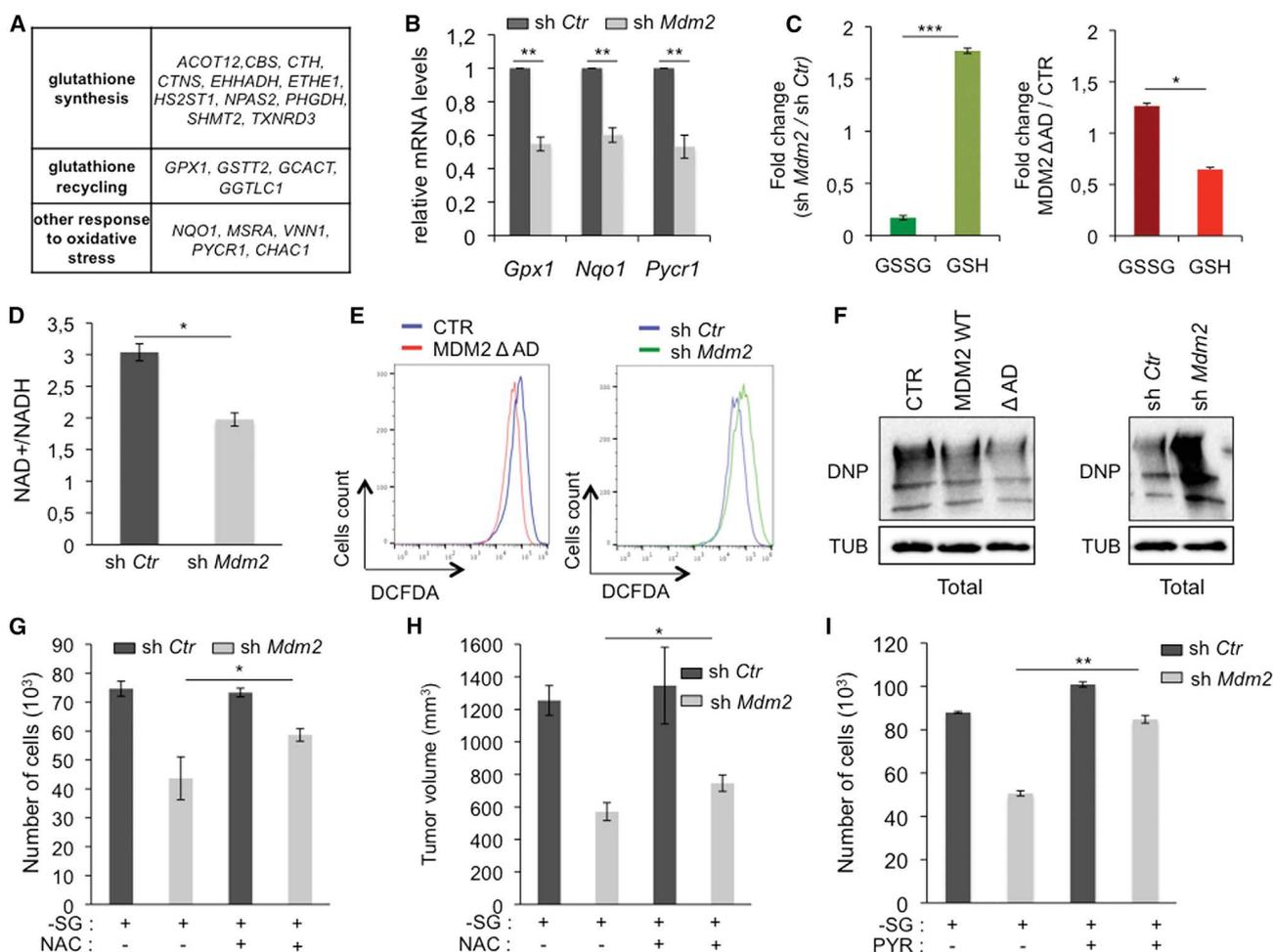


Figure 5. MDM2 Regulates Redox Homeostasis

(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,

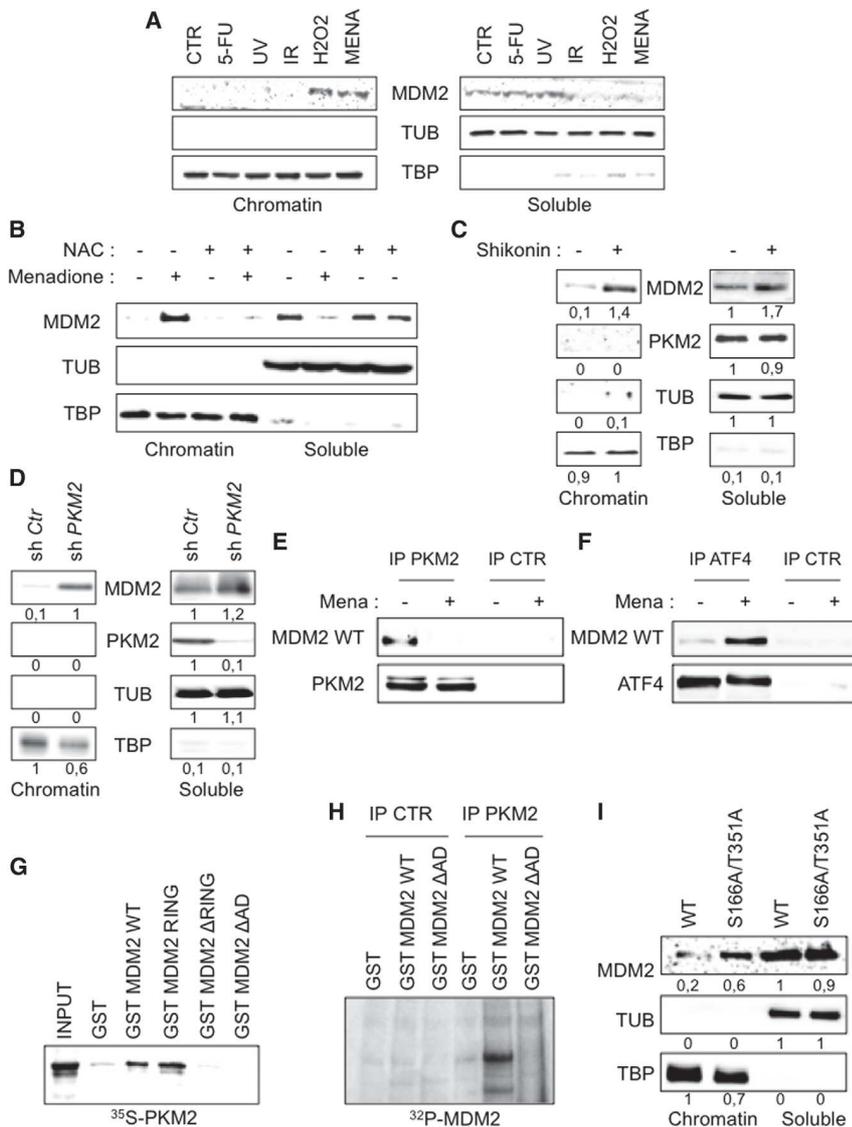


Figure 6. PKM2 and Oxidative Stress Control MDM2 Recruitment to Chromatin

(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.

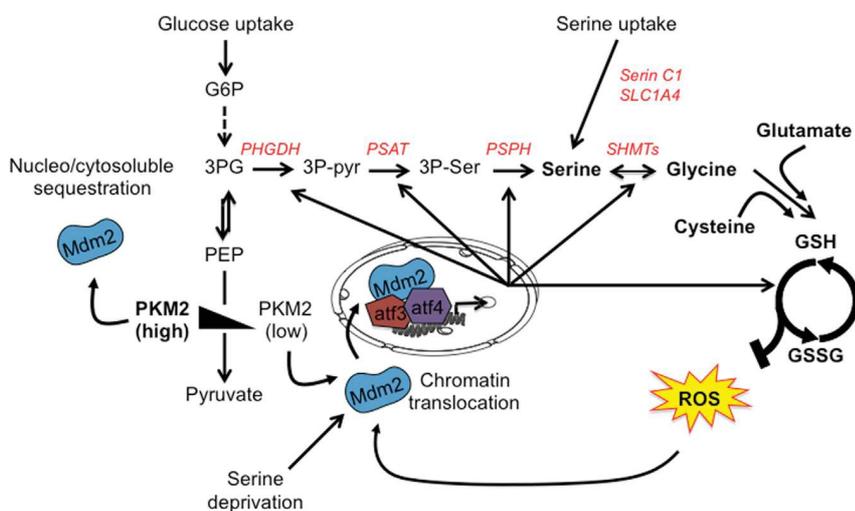


Figure 7. MDM2 Is a Key Regulator of Metabolism to Sustain Cellular Anti-oxidant Defenses

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.
- Bohman, 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.

Article :

Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53.

Giuseppe Arena, **Madi Y.Cissé**, Samuel Pyrdziak, Laurent Chatre, Romain Riscal, Maryse Fuentes, Jamie Jon Arnold, Markus Kastner, Laurie Gayte, Christelle Bertrand-Gaday, Kevin Nay, Claire Angebault-Prouteau, Kerren Murray, Beatrice Chabi, Christelle Koechlin-Ramonatxo, Béatrice Orsetti, Charles Vincent, François Casas, Jean-Christophe Marine, Sandrine Étienne-Manneville, Florence Bernex, Anne Lombès, Craig Eugene Cameron, Hervé Dubouchaud, Miria Ricchetti, Laetitia K. Linares and Laurent Le Cam.

Molecular Cell (2018), 60, 594–609, February 2018.

Introduction :

Par écho au précédent article et comme détaillé dans l'introduction de ce manuscrit, il est maintenant reconnu que les activités oncogéniques de MDM2 vont au-delà du contrôle direct de p53.

Les travaux menés par Giuseppe Arena, un ancien post-doctorant du laboratoire, ont montré qu'une fraction de la protéine MDM2 se localise dans la matrice mitochondriale indépendamment de p53 et régule la transcription du génome mitochondrial afin de contrôler la respiration tant dans les cellules normales que cancéreuses.

Résultats :

L'étude de la localisation cellulaire de MDM2 nous a permis de constater, qu'en plus de sa présence dans le noyau et dans le cytoplasme, MDM2 était également retrouvé significativement (de l'ordre de 2 % à 5 % du pool total de la protéine) dans la mitochondrie et ce, de façon indépendante du statut de p53. Une observation fine par microscopie électronique en transmission a permis de montrer que MDM2 est retrouvé dans la matrice mitochondriale. Étant donné que la protéine MDM2 ne possède pas de séquence signal de localisation mitochondriale comme c'est très souvent le cas des protéines délivrées dans la matrice mitochondriale, nous avons réalisé des études structures fonction et constaté que la translocation de MDM2 vers la matrice mitochondriale faisait intervenir un complexe de transport mitochondrial comprenant les sous-unités TOM20 et TIM23 ainsi que la mortaline et TID1, suggérant ainsi que son transport se fait de façon active.

Une modulation des niveaux intracellulaires et mitochondriaux de MDM2 a montré une modification générale de la structure du réseau des mitochondries. C'est pourquoi, afin d'étudier plus en détail le rôle de mtMDM2 (mitochondrial MDM2), Giuseppe Arena a généré une protéine chimérique de MDM2 fusionnée à la séquence N-terminale de signal de localisation mitochondriale (MTS-MDM2). Cette construction, permettant l'expression d'un mutant de MDM2 exclusivement mitochondriale, nous a donc permis d'étudier les fonctions de mtMDM2. Par immunofluorescence notamment, nous avons constaté que l'expression de mtMDM2 influençait fortement la structure des mitochondries mais aussi leur organisation dans la cellule. Les cellules sur-exprimant MTS-MDM2, présentent un regroupement périnucléaire de mitochondries. En revanche, les cellules dont l'expression de MDM2 est diminuée, présentent davantage de mitochondries fragmentées que des cellules témoins.

Ces phénotypes forts nous ont poussés à examiner la respiration mitochondriale. Nous avons observé que mtMDM2 jouait sur l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et donc sur la respiration. La consommation d'oxygène induite par le complexe I est réduite dans les cellules H1299 exprimant MTS-MDM2.

D'un point de vue mécanistique, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de chromatine quantitative, nous avons déterminé que mtMDM2 se fixait sur le promoteur de la chaîne légère (LSP) du génome mitochondrial, inhibant ainsi la transcription. Il est à noter que le transcrit piloté par LSP ne code qu'un seul composant structural de la chaîne de transport des électrons, la NADH-déshydrogénase 6 (MT-ND6), une sous-unité importante du complexe I de la chaîne respiratoire.

Nous avons également constaté que l'induction d'un stress oxydant ou d'un stress hypoxique dans les cellules H1299, entraînait une augmentation des niveaux de mtMDM2 d'au moins 3 fois par rapport à la normal. Ce recrutement à la mitochondrie se fait au niveau du LSP et est associé à une diminution de la protéine MT-ND6 et induit une agrégation périnucléaire rapide des mitochondries. Nous avons donc conclu que dans les cellules cancéreuses, les ROS et l'hypoxie déclenchent le recrutement de MDM2 dans les mitochondries pour réprimer l'expression de MT-ND6, contrôler la respiration et réguler la dynamique du réseau mitochondrial.

D'un point de vue physiologique, nous avons confirmé *in vivo* que lorsque des souris étaient placées dans des conditions hypoxiques (atmosphère à 15 % d'oxygène), les niveaux de mtMDM2 étaient significativement augmentés tandis que ceux de MT-ND6 étaient diminués. D'un autre côté, des souris génétiquement modifiées KO inductibles pour *MDM2* spécifiquement dans le muscle, présentent des niveaux de MT-ND6 supérieurs, entraînant une augmentation des capacités respiratoires et une augmentation de l'endurance musculaire lors de tests de résistance à la course sous hypoxie.

Ces données indiquent que le contrôle de l'activité du complexe I par le biais de mtMDM2 est essentiel pour réguler l'endurance musculaire *in vivo*.

D'un point de vue potentiel tumorigénique, l'expression de MTS-MDM2 n'augmente pas le taux de croissance de tumeurs H1299 *in vivo* mais augmente clairement le

potentiel clonogénique des cellules H1299 cultivées dans des cultures monocouches ainsi que leur capacité à former des sphéroïdes dans une croissance en 3 dimensions. Nous avons constaté que mtMDM2 améliorait les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses.

Conclusion :

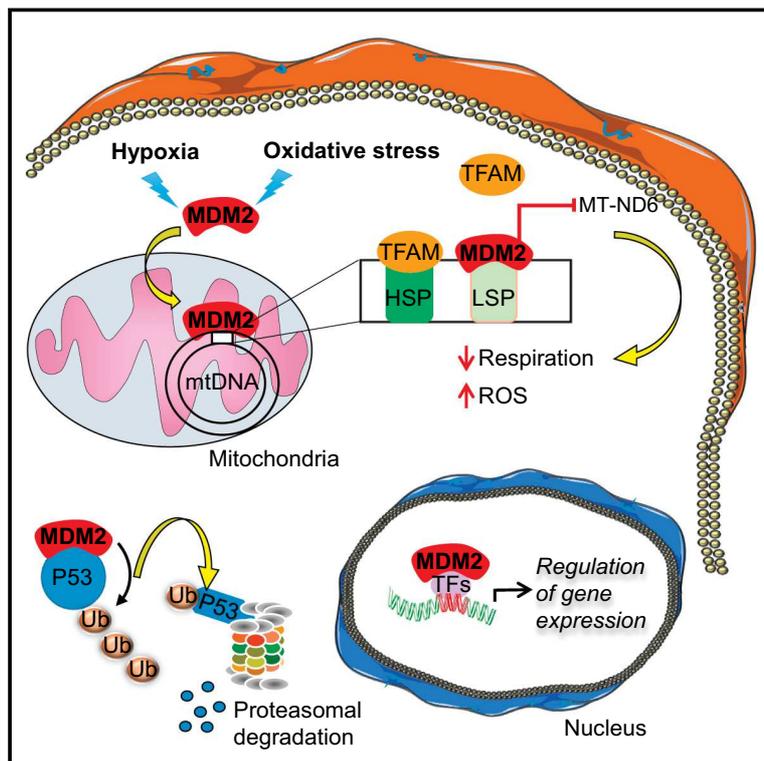
Le travail de Giuseppe Arena a mis en lumière une nouvelle fonction de MDM2 dans la mitochondrie et ce de manière indépendante de p53. Son rôle dans le contrôle de la respiration via MT-ND6 a montré que des taux élevés de mtMDM2 améliorent les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses suggérant que les fonctions mitochondriales de MDM2 contribuent à ses propriétés oncogéniques. Il fournit également une explication moléculaire du probable potentiel métastatique plus élevé et du mauvais résultat clinique des patients présentant des tumeurs arborant une expression élevée de MDM2.

Ce travail vient fournir de nouveaux éléments à l'hypothèse selon laquelle les fonctions « métaboliques » de MDM2 favorisent la tumorigenèse.

Molecular Cell

Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53

Graphical Abstract



Authors

Giuseppe Arena, Madi Yann Cissé, Samuel Pyrdziak, ..., Miria Ricchetti, Laetitia Karine Linares, Laurent Le Cam

Correspondence

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

In Brief

Arena et al. show that the proto-oncogene MDM2 is recruited to mitochondria independently of its well-known partner p53. By repressing transcription of a specific subunit of the electron transport chain encoded by the mitochondrial genome, mitochondrial MDM2 controls respiration, influencing skeletal muscle function and cancer cell migration.

Highlights

- The MDM2 oncoprotein localizes to the mitochondrial matrix independently of p53
- Mitochondrial MDM2 inhibits transcription of the complex I (CI) subunit *MT-ND6*
- MDM2 deficiency in skeletal muscles increases CI activity and muscular endurance
- Mitochondrial MDM2 increases cancer cell migration and invasion



Arena et al., 2018, *Molecular Cell* 69, 594–609
February 15, 2018 © 2018 Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.023>

CellPress

Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53

Giuseppe Arena,^{1,2,3} Madi Yann Cissé,^{1,2,13} Samuel Pyrdziak,^{1,2,13} Laurent Chatre,³ Romain Riscal,^{1,2} Maryse Fuentes,^{1,2} Jamie Jon Arnold,⁴ Markus Kastner,⁴ Laurie Gayte,^{1,2} Christelle Bertrand-Gaday,⁵ Kevin Nay,⁵ Claire Angebault-Prouteau,⁶ Kerren Murray,⁷ Beatrice Chabi,⁵ Christelle Koechlin-Ramonatxo,⁵ Béatrice Orsetti,^{1,2} Charles Vincent,^{1,2} François Casas,⁵ Jean-Christophe Marine,^{8,9} Sandrine Etienne-Manneville,⁷ Florence Bernex,^{1,10} Anne Lombès,¹¹ Craig Eugene Cameron,⁴ Hervé Dubouchaud,¹² Miria Ricchetti,³ Laetitia Karine Linares,^{1,2,14,*} and Laurent Le Cam^{1,2,14,15,*}

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

²Equipe Labélisée par la Ligue contre le Cancer

³Unit of Stem Cells and Development, Team Stability of Nuclear and Mitochondrial DNA, Department of Developmental and Stem Cell Biology, Institut Pasteur, CNRS, Paris, France

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University, State College, PA, USA

⁵Dynamique Musculaire et Métabolisme Laboratory, INRA, Université de Montpellier, Montpellier, France

⁶INSERM, CNRS, Université de Montpellier, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

⁷Institut Pasteur Paris, Cell Polarity, Migration and Cancer Unit, CNRS, INSERM, Paris, France

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

⁹Laboratory for Molecular Cancer Biology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium

¹⁰Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier, BioCampus, CNRS, INSERM, Université de Montpellier, Montpellier, France

¹¹Institut Cochin, INSERM, CNRS, Université Paris Descartes, Paris, France

¹²Université Grenoble Alpes, INSERM, LBFA, Grenoble, France

¹³These authors contributed equally

¹⁴Senior author

¹⁵Lead Contact

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

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.023>

SUMMARY

Accumulating evidence indicates that the MDM2 oncoprotein promotes tumorigenesis beyond its canonical negative effects on the p53 tumor suppressor, but these p53-independent functions remain poorly understood. Here, we show that a fraction of endogenous MDM2 is actively imported in mitochondria to control respiration and mitochondrial dynamics independently of p53. Mitochondrial MDM2 represses the transcription of NADH-dehydrogenase 6 (MT-ND6) *in vitro* and *in vivo*, impinging on respiratory complex I activity and enhancing mitochondrial ROS production. Recruitment of MDM2 to mitochondria increases during oxidative stress and hypoxia. Accordingly, mice lacking MDM2 in skeletal muscles exhibit higher MT-ND6 levels, enhanced complex I activity, and increased muscular endurance in mild hypoxic conditions. Furthermore, increased mitochondrial MDM2 levels enhance the migratory and invasive properties of cancer cells. Collectively, these data uncover a previously unsuspected function of the MDM2 oncoprotein in mitochondria that play critical

roles in skeletal muscle physiology and may contribute to tumor progression.

INTRODUCTION

The p53 pathway is functionally inactivated in most, if not all, cancers. Somatic mutations in *TP53* occur in about 50% of human tumors, and many cancers retaining wild-type *TP53* display functional inactivation of the p53 pathway by viral oncoproteins or alterations of p53 regulators, including the *Mouse Double Minute 2 (MDM2)* oncogene (Wade et al., 2013). MDM2 is a major negative regulator of the p53 pathway through its well-documented E3 ligase activity that targets p53 protein for proteasomal degradation. MDM2 also contributes to the regulation of p53 target genes by directly inhibiting p53 transactivation domains and by ubiquitylating histones at p53-responsive genes (Momand et al., 1992; Oliner et al., 1993; Minsky and Oren, 2004). However, it is now recognized that MDM2 oncogenic activities extend beyond the direct control of p53. Thus, MDM2-mediated ubiquitylation of several transcription factors or transcriptional co-regulators contributes to the regulation of p53-independent programs (Biderman et al., 2012). Recent findings also identified a p53-independent role for chromatin-bound MDM2 in the transcriptional control of genes involved in cell fate and metabolism (Wienken et al., 2016; Riscal et al., 2016).

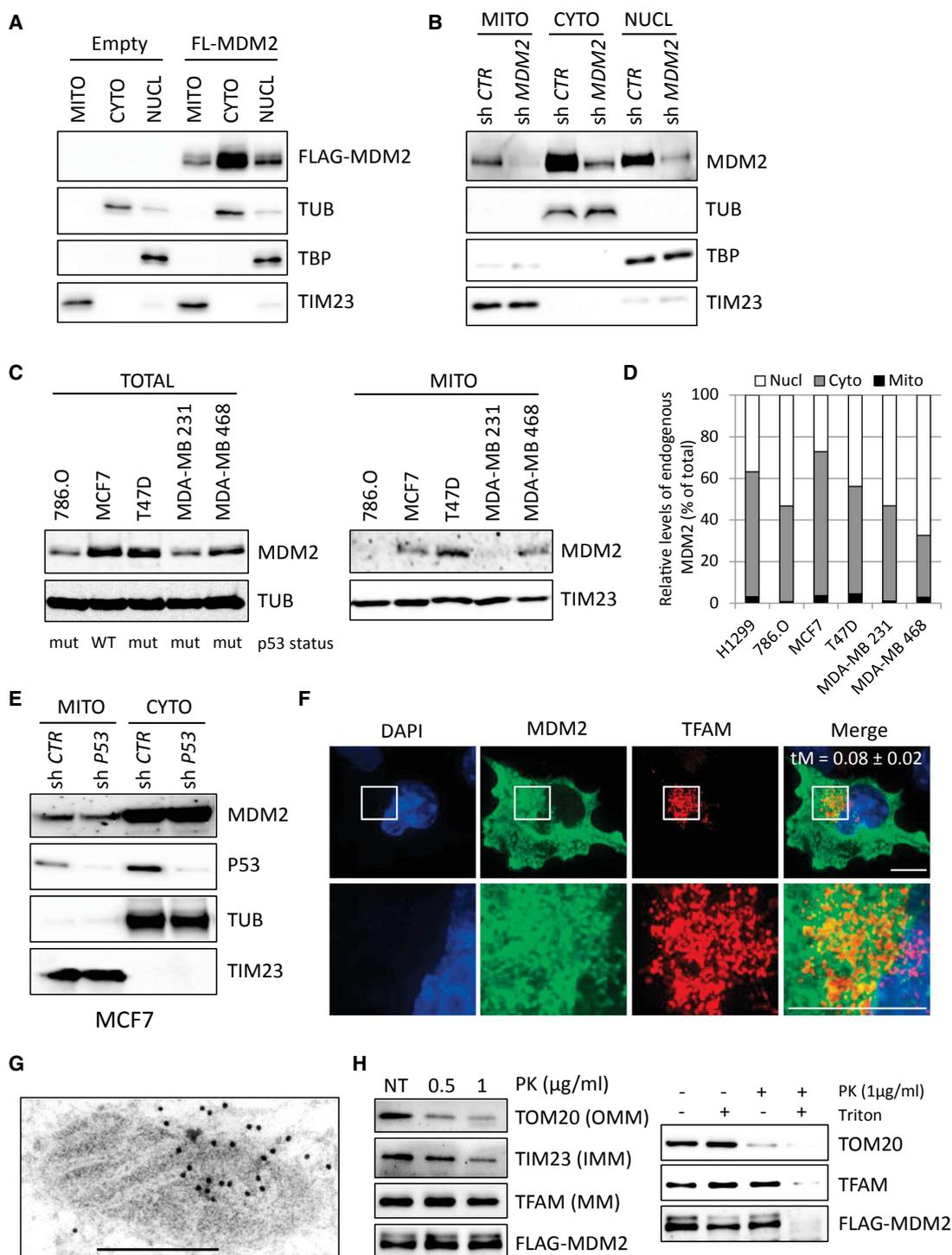


Figure 1. MDM2 Localizes in the Mitochondrial Matrix

(A) Subcellular localization of FLAG-tagged full-length (aa 1–491) MDM2 (FL-MDM2) in H1299 cells. MDM2 levels were determined by immunoblotting of fractions enriched in mitochondrial (MITO), cytosolic (CYTO), and nuclear (NUCL) proteins with an anti-FLAG antibody. Equal loading was verified with TATA binding protein (TBP), tubulin (TUB), and TIM23 protein levels.

(B) Immunoblot (IB) analysis of endogenous MDM2 subcellular localization in H1299 cells transduced with lentiviruses expressing control or *MDM2* shRNAs.

(C) IB analysis of total (left) and mitochondrial (right) endogenous MDM2 levels in different human cancer cell lines. The *p53* status of each cell line is indicated: WT or mutant (mut).

(legend continued on next page)

Moreover, the RING domain of MDM2 is required for its binding to the mRNAs of several cancer-related genes to control their stability or translation, including those encoding p53 itself, the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), N-MYC, and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Fåhræus and Olivares-Illana, 2014). Here, we show that a fraction of MDM2 protein localizes in the mitochondrial matrix independently of p53 and regulates the transcription of the mitochondrial genome to control respiration in both normal and cancer cells.

RESULTS

MDM2 Localizes to the Mitochondrial Matrix

We assessed MDM2 subcellular localization in several cancer cell lines by immunoblotting following biochemical fractionation of various cellular compartments and isolation of purified organelles. As anticipated, MDM2 was detected in fractions enriched in cytosolic or nuclear proteins prepared from p53 null H1299 lung cancer cells. Unexpectedly, significant fractions of both ectopic FLAG-tagged MDM2 and endogenous MDM2 were detected in protein extracts prepared from purified mitochondria. The specificity of MDM2 immunoreactivity was confirmed using extracts prepared from MDM2-depleted H1299 cells, and the quality of the fractionation was verified by measuring the levels of cytosolic tubulin (TUB), nuclear TATA binding protein (TBP), and mitochondrial TIM23 proteins (Figures 1A and 1B). Next, we evaluated the amount of mitochondrial MDM2 in a panel of human cancer cell lines. When detectable by immunoblotting, a variable amount of endogenous MDM2, ranging from 2% to 5% of total MDM2, localized to mitochondria in these cells (Figures 1C, 1D, and S1A). The amount of mitochondrial MDM2 (mtMDM2) did not correlate with the p53 status of these cell lines, suggesting that MDM2 localized to mitochondria in a p53-independent manner. Consistent with this notion, short hairpin RNA (shRNA)-mediated depletion of wild-type (WT) p53 in MCF7 or of mutant p53 in T47D breast cancer cells did not alter the relative proportion of mtMDM2, indicating that neither WT nor mutant p53 was required for the localization of endogenous MDM2 to mitochondria (Figures 1E and S1B). Confocal microscopy analysis showed that FLAG-tagged full-length (FL) MDM2 (residues 1 to 491) exhibited different subcellular localization in H1299 cells. Approximately 35% of H1299 cells displayed a strictly nuclear pattern for ectopic FL-MDM2, 55% of them exhibited both nuclear and cytoplasmic MDM2, and 10% of them

displayed a staining pattern that was restricted to the cytoplasm (Figure S1C). Super-resolution microscopy performed at a resolution of 100 nm indicated that approximately 8% of FL-MDM2 co-localized with the mitochondrial marker TFAM (Figure 1F). Mitochondrial localization of ectopic FL-MDM2 in H1299 cells was further confirmed by immunogold labeling and transmission electron microscopy (TEM). Consistent with MDM2 localization in different subcellular compartments, gold particles were detected in the nucleus and the cytoplasm, but also inside the mitochondrial matrix, at the edge of mitochondrial cristae (Figures 1G and S1D). We next performed protease protection assays on purified mitochondria isolated from H1299 cells expressing FL-MDM2. At concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Proteinase K (PK), the outer mitochondrial membrane (OMM) protein TOM20 and the inner mitochondrial membrane (IMM) protein TIM23 were progressively degraded. In contrast, MDM2 and the mitochondrial matrix protein TFAM were both resistant to mild protease digestion. Complete PK-mediated digestion of TFAM and MDM2 proteins occurred only after treatment with Triton X-100, indicating that both proteins localized in the same mitochondrial compartment (Figure 1H). These data demonstrate that a fraction of MDM2 protein localizes to the mitochondrial matrix.

MDM2 Is Actively Imported in Mitochondria through Mitochondrial Transporters

Mitochondrial proteins often contain an N-terminal leader peptide that is cleaved in the IMM before they can be released in the matrix (Dudek et al., 2013). Analysis of the MDM2 protein sequence failed to identify a canonical mitochondrial localization signal. In order to ascertain which domain of MDM2 was required for its recruitment to mitochondria, we performed subcellular fractionation assays and immunogold staining for TEM in H1299 cells expressing FL-MDM2 or different MDM2 deletion mutants. Deletion of its N-terminal region increased the total levels of MDM2 but did not change its relative subcellular localization, whereas the deletion of the C-terminal region (amino acids [aa] 292–491) impacted on its localization in mitochondria (Figures 2A–2C and S2A–S2C). Smaller deletions of the C-terminal region indicated that the last 61 aa (aa 430–491) of MDM2, and a more central region (aa 291–391) played a significant role in MDM2 localization in mitochondria (Figures S2D and S2E). We next asked whether MDM2 recruitment to this organelle was dependent on mitochondrial transporters. FL-MDM2

(D) Quantitative IB analysis of endogenous MDM2 subcellular localization in different human cancer cell lines. Histograms represent the relative levels of nuclear, cytosolic, and mtMDM2 in the indicated cell lines.

(E) IB analysis of endogenous MDM2 subcellular localization in MCF7 cells transduced with lentiviruses encoding control or p53 shRNAs.

(F) Super-resolution microscopy analysis of FL-MDM2 (green) and TFAM (red) subcellular localization in H1299 cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars, 10 μm . tM indicates the Manders coefficient representing the colocalization of the signal detected with the anti-FLAG antibody and that detected with the anti-TFAM antibody.

(G) Immunogold staining for transmission electron microscopy (TEM) analysis of MDM2 subcellular localization in H1299 cells expressing FL-MDM2. Scale bar, 500 nm.

(H) Protease protection assays performed on purified mitochondria isolated from H1299 cells expressing FL-MDM2. Left: IB analysis of MDM2, the outer mitochondrial membrane (OMM) protein TOM20, the inner mitochondrial membrane (IMM) protein TIM23, and the mitochondrial matrix (IMM) protein TFAM, after incubation of purified mitochondria with 0.5 or 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PK. NT, mock-treated mitochondria. Right: protease protection assays performed in the presence of the permeabilizing agent Triton X-100. MDM2 and TFAM proteins were only digested in presence of Triton X-100, confirming their localization in the mitochondrial matrix.

See also Figure S1.

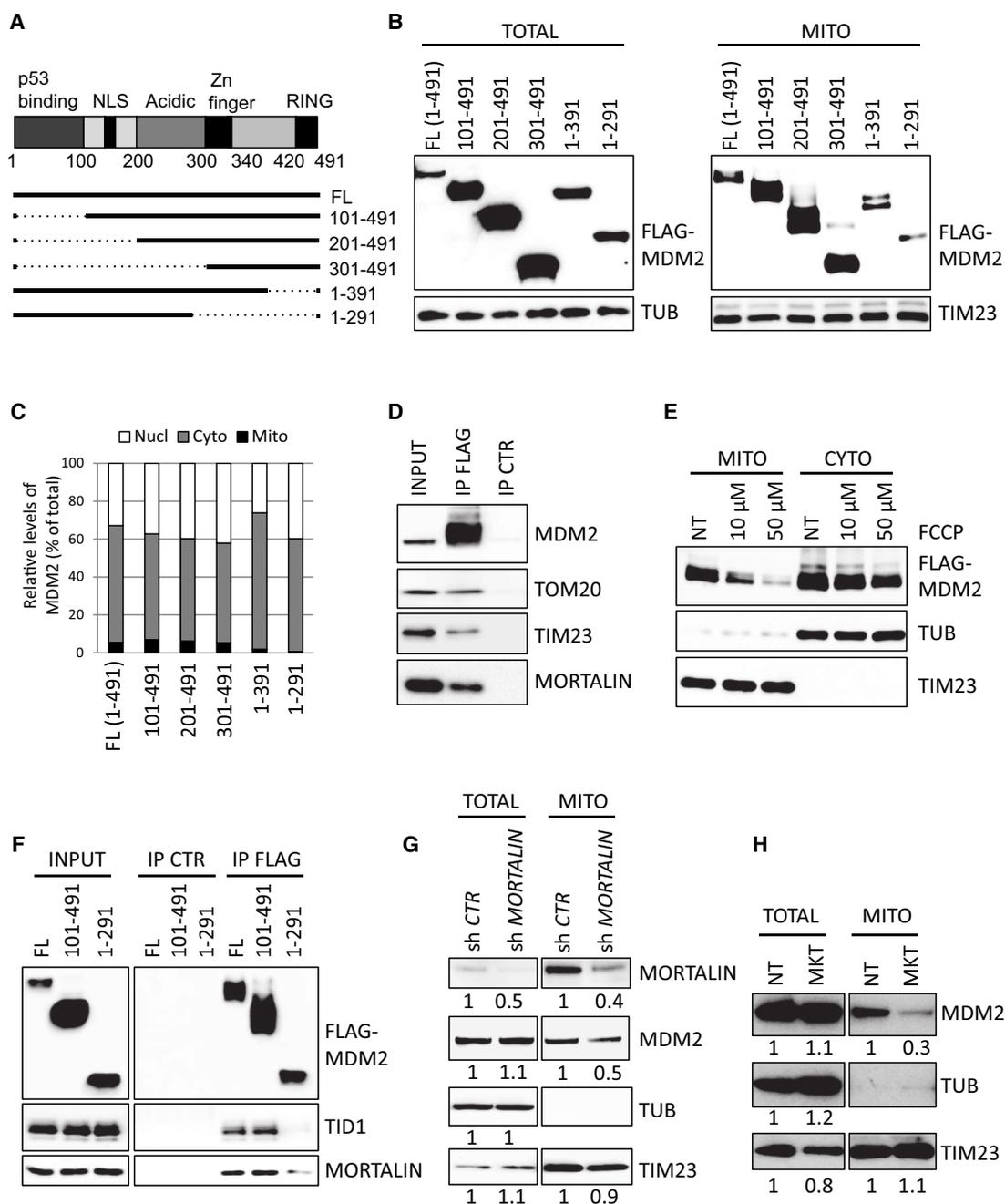


Figure 2. MDM2 Is Actively Imported in Mitochondria through Mitochondrial Transporters

(A) Schematic representation of MDM2 protein structure and of the selected deletion mutants. NLS, nuclear localization signal.

(B) Subcellular localization of FL-MDM2 and of the indicated deletion mutants in H1299 cells, determined by IB using anti-FLAG antibody in whole-cell lysates (TOTAL) and in extracts prepared from purified mitochondria (MITO). Equal loading was verified with TUB and TIM23 protein levels.

(C) Quantitative IB analysis of the subcellular localization of the indicated MDM2 proteins in H1299 cells. Histograms represent the relative levels of nuclear, cytosolic, and mtMDM2.

(D) Co-immunoprecipitation assays showing association between FL-MDM2 and endogenous TOM20, TIM23, and mtHsp70/mortalin proteins in H1299 cells. IP, immunoprecipitation; CTR, control.

(E) Subcellular localization of FL-MDM2 in H1299 cells cultured in the presence of the mitochondrial uncoupler FCCP for 12 hr. NT, untreated. MDM2, TUB, and TIM23 protein levels were determined by IB in fractions enriched in cytosolic or MITO proteins.

(legend continued on next page)

co-immunoprecipitated with endogenous TOM20 and TIM23 proteins, two components of the mitochondrial translocator complexes located in the OMM and the IMM, respectively (Figure 2D). Transport through these mitochondrial translocator complexes depends on the membrane potential ($\Delta\Psi$) across the IMM (Geissler et al., 2000). Accordingly, the amount of mtMDM2 in H1299 cells decreased upon treatment with carbonyl cyanide4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), a protonophore that disrupts mitochondrial membrane potential (Figure 2E). Moreover, MDM2 co-immunoprecipitated with the mitochondrial 70-kDa heat shock protein (mtHsp70), also known as mortalin, as well as with its direct partner TID1 (Figures 2D and S2F). These two proteins are central components of the mitochondrial protein import motor that play a key role in the import and proper folding of proteins localized in mitochondrial matrix (Syken et al., 1999; Schneider et al., 1994). In H1299 cells, mtHsp70/mortalin and TID1 co-immunoprecipitated with FL-MDM2 but not with the MDM2 1-291 mutant that displayed impaired mitochondrial localization (Figure 2F). Importantly, pharmacological inhibition (by treatment with MKT-077) or shRNA-mediated depletion of mtHsp70/mortalin decreased the basal levels of mtMDM2 (Figures 2G and 2H). Thus, our data indicate that MDM2 is actively imported into the mitochondrial matrix by specific mitochondrial transporters.

MDM2 Regulates Mitochondrial Network Dynamics and Mitochondrial Ultrastructure

Next, we assessed by confocal microscopy whether modulating mtMDM2 levels influenced the organization of the mitochondrial network. Immunostaining of the ATP5A subunit of the ATP synthase complex or staining with the mitochondrial dye MitoTracker Red indicated that MDM2-depleted cells exhibited a more fragmented mitochondrial network than control cells (Figures 3A, 3B, S3A, and S3B). MDM2 depletion also resulted in enhanced phosphorylation of dynamin-related protein 1 (DRP1) on serine 637, an event previously associated with increased mitochondrial fission (Wang et al., 2012), but had no significant effect on the levels of Mitofusin 2 (MFN2) and Optic Atrophy 1 (OPA1) proteins, which promote fusion (Figure 3C). Strikingly, H1299 cells expressing FL-MDM2 displayed an asymmetrical perinuclear clustering of mitochondria (Figures 3D and 3E). This spatial redistribution of mitochondria was observed only in cells exhibiting cytoplasmic staining of FL-MDM2 but not in cells exhibiting exclusively nuclear MDM2 localization or in cells expressing MDM2 1-291 (Figures 3D, 3E, and S3C), suggesting that the mitochondrial pool of MDM2 was directly implicated in this clustering of mitochondria. To confirm this notion, we generated a chimeric MDM2 protein fused to the N-terminal mitochondrial targeting sequence (MTS) of the E1 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. Biochemical fractionation and immunofluorescence (IF) assays indicated that MTS-MDM2 localized predominantly to mitochondria and that its expression further increased the percentage of cells exhibiting perinuclear clus-

tering of mitochondria (Figures 3D–3E and S3D). A similar phenotype was observed upon expression of MTS-MDM2 in U2OS and MCF7 cells (Figures S3E and S3F), and videomicroscopy indicated that this reorganization of the mitochondrial network occurred as soon as 6 hr after transfecting H1299 cells with a vector encoding MTS-MDM2 (mv1).

To investigate whether alterations in mitochondrial dynamics were also accompanied by changes in ultrastructure, we performed conventional TEM analysis in H1299 cells expressing control or MDM2 shRNAs and in cells expressing FL-MDM2, MTS-MDM2, or the MDM2 1-291 mutant. MDM2-depleted H1299 cells displayed more fragmented mitochondria than control cells but no significant abnormalities of mitochondrial ultrastructure (Figure 3F). In contrast, H1299 cells expressing ectopic FL-MDM2 exhibited loss of mitochondrial matrix electron density, and cristae appeared narrower in these cells, misoriented, and/or reduced in number. These morphological changes were significantly amplified and more frequent upon expression of MTS-MDM2, whereas cells expressing MDM2 1-291 contained mitochondria with an electron-dense matrix and well-organized intact cristae that were indistinguishable from those of control cells (Figure 3G). Importantly, changes of mitochondrial ultrastructure triggered by higher mtMDM2 levels were not associated with increased apoptosis, as shown by the lack of mitochondrial swelling and the absence of detectable cytochrome c release or caspase-3 cleavage (Figures 3G and S3G–S3I).

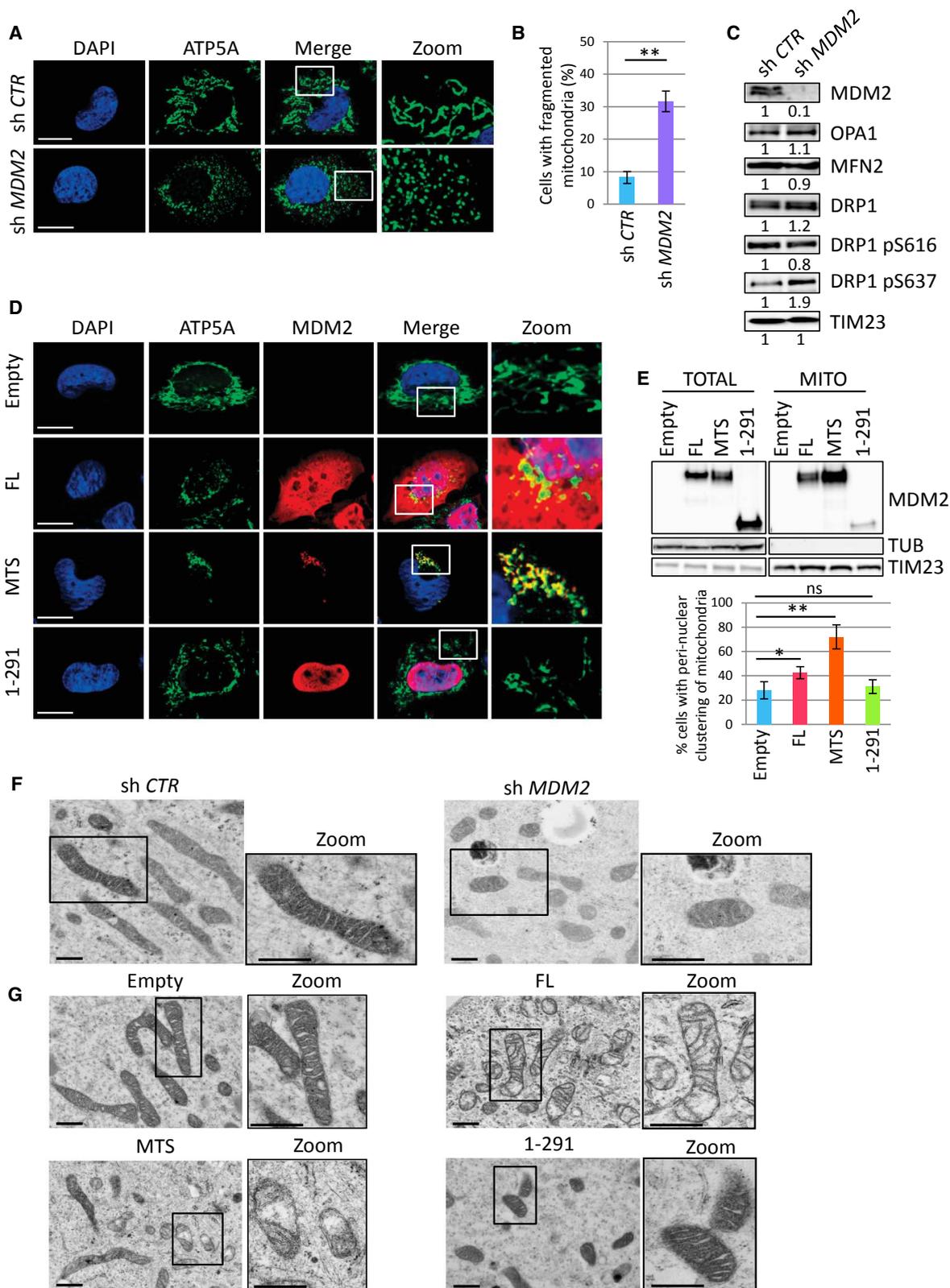
MtMDM2 Controls Electron Transport Chain Complex I Activity and Respiration

The mitochondrial localization of MDM2 prompted us to investigate its role in respiration. First, we analyzed the consequences of MDM2 deficiency on oxygen consumption and respiratory chain enzymatic activities. State III respiration linked to the electron transport chain (ETC) complex I (CI), measured in the presence of glutamine, malate, and pyruvate (EIII GMP) as substrates, increased significantly upon MDM2 depletion in H1299 cells, as well as after Cre-mediated inactivation of murine *Mdm2* in *Mdm2*^{flox/flox}; *p53*^{KO} primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Figures 4A, 4B, and S4A). In contrast, oxygen consumption driven by complex II (CII), measured in the presence of the CI inhibitor rotenone and succinate (EIII SR) as a substrate, was not affected by MDM2 deficiency (Figure S4B). Of note, increased oxygen consumption in MDM2-depleted H1299 cells was abolished upon incubation with the CI inhibitor metformin, further supporting the role of mtMDM2 in CI-driven respiration (Figure S4C). In line with these results, CI enzymatic activity significantly increased upon shRNA-mediated depletion of MDM2, whereas CII and IV activities remained unchanged (Figure 4C). Next, we measured mitochondrial respiration in cells expressing MTS-MDM2 before these cells exhibited morphological changes in their mitochondrial ultrastructure. CI-driven oxygen consumption was reduced in H1299 cells expressing

(F) Co-immunoprecipitation assays performed in H1299 cells expressing FL-MDM2 or the indicated MDM2 deletion mutants.

(G and H) Quantitative immunoblotting (qIB) analysis of endogenous MDM2 subcellular localization (G) in H1299 cells expressing control or mtHsp70/mortalin shRNAs or (H) in H1299 cells cultured in the presence of the mtHsp70/mortalin pharmacological inhibitor MKT-077 (MKT).

See also Figure S2.



(legend on next page)

MTS-MDM2, whereas CII-driven respiration was only marginally affected (Figures 4D and S4D). Consistently, CI activity decreased, whereas that of CII and IV was unaffected in these cells (Figure 4E). Moreover, expression of the MDM2 1-291 that was marginally detected in mitochondria failed to impact on oxygen consumption (Figure 4D). Finally, we evaluated whether the E3 ligase function of MDM2 was implicated in the regulation of mitochondrial respiration. An MDM2 mutant harboring the C464A mutation that abolishes its E3 ligase activity (MDM2-C464A) was efficiently recruited to mitochondria and inhibited CI-driven respiration to an extent similar to that of FL-MDM2 following transient transfection in H1299 cells (Figures S4E and S4F). Inhibition of mitochondrial respiration was also observed in H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2 harboring the C464A mutation (MTS-MDM2-C464A) but not in cells expressing an MDM2 E3 ligase-deficient isoform that predominantly localized to chromatin due to the deletion of its central acidic domain (Δ AD-MDM2-C464A) (Riscal et al., 2016) (Figure S4G).

Since abnormal ETC CI activity is often associated with oxidative stress, we then measured the effect of mtMDM2 on reactive oxygen species (ROS) levels by IF, using the MitoSox probe that specifically detects mitochondrial superoxide ions. H1299 cells expressing MTS-MDM2 exhibited increased mitochondrial ROS levels when compared to control cells (Figure 4F). Conversely, MCF7-sh p53 cells exhibited decreased ROS levels upon acute depletion of endogenous MDM2 (Figure 4G). Therefore, these data indicate that mtMDM2 interferes with ETC CI-driven respiration, leading to increased mitochondrial ROS production.

MtMDM2 Represses MT-ND6 Transcription

Next, we explored the mechanism by which mtMDM2 controls ETC CI activity. The role of chromatin-bound MDM2 in the transcription of metabolic genes encoded by the nuclear genome (Riscal et al., 2016) prompted us to evaluate whether MDM2 also regulates transcription of the mitochondrial genome independently of p53. Supporting this hypothesis, quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) assays showed that MTS-MDM2, but not MDM2 1-291, associated with the light

strand promoter (LSP) that drives the transcription of the light strand of the mitochondrial genome (Figure 5A). No binding of MTS-MDM2 on the heavy strand promoter (HSP) was detected under the same experimental conditions (Figure S5A). Importantly, binding of endogenous MDM2 to the LSP promoter was also detected in parental but not in MDM2-depleted T47D cells (Figure 5B). Interestingly, these qChIP assays indicated that increased mtMDM2 levels correlated with decreased association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) with the LSP, despite total TFAM protein levels remaining constant (Figures 5C and S5B). Consistent with the absence of MDM2 on the HSP, TFAM binding to HSP was not affected by MTS-MDM2 (Figure S5C). The impact of mtMDM2 on TFAM binding to the LSP was confirmed by mTRIP, a single-cell confocal imaging technique combining fluorescence *in situ* hybridization (FISH) performed with an LSP-specific probe with TFAM IF (Figures 5D and S5D) (Chatre and Ricchetti, 2013). Moreover, atomic force microscopy (AFM) showed that purified recombinant MDM2 protein distributed preferentially to the control region of mtDNA containing the LSP but failed to bind to an irrelevant DNA probe *in vitro* (Figures 5E and S5E). To further assess the selective inhibitory activity of MDM2 at the LSP, we evaluated the ability of recombinant MDM2 to inhibit mitochondrial transcription *in vitro* using a dual-promoter template containing both LSP and HSP1 (Uchida et al., 2017). At TFAM concentrations in which both promoters were maximally activated, MDM2 reduced LSP transcription in a dose-dependent manner, whereas it had a much lesser impact on HSP-driven transcription (Figures 5F and S5F).

Transcription from the LSP and HSP generates long polycistronic transcripts encoding rRNAs, tRNAs, and structural subunits of respiratory complexes. The LSP-driven transcript encodes only one structural component of the ETC, NADH-dehydrogenase 6 (*MT-ND6*), an important subunit of the ETC CI (Montoya et al., 1982). RNA-FISH/mTRIP analyses showed that *MT-ND6* RNA levels were lower in H1299 cells expressing MTS-MDM2 than in control cells (Figure 5G). Conversely, shRNA-mediated depletion of endogenous MDM2 resulted in increased *MT-ND6* RNA levels (Figure 5H). qRT-PCR analyses showed that MDM2 depletion increased the RNA level of

Figure 3. MDM2 Regulates Mitochondrial Network Dynamics and Mitochondrial Ultrastructure

(A) Microphotographs of H1299 cells transduced with lentiviruses encoding control (sh *Ctr*) or *MDM2* (sh *MDM2*) shRNAs. Cells were stained using an antibody recognizing the ATP5A subunit of the ATP synthase complex (green) and nuclei with DAPI (blue) and then were analyzed by confocal microscopy. Insets show microphotographs at higher magnification (Zoom). Scale bars, 10 μ M.

(B) Mitochondrial fragmentation in MDM2-depleted H1299 cells. Histograms represent the frequency of cells exhibiting fragmented mitochondria (mean \pm SEM; n = 120 cells from four independent experiments).

(C) IB analysis of total and phosphorylated DRP1 (on Serine 616 or 637), OPA1, MFN2, TIM23 (loading control), and MDM2 protein levels in the same cells as in (A) and (B).

(D) Confocal microscopy analysis of the mitochondrial network in H1299 cells expressing ectopic FL-MDM2 (FL), MTS-MDM2 (MTS), MDM2 1-291 (1-291), or in control cells transfected with the corresponding empty vector (Empty). ATP5A (green), MDM2 (red) and nuclei (blue). Insets show microphotographs at higher magnification (Zoom). Scale bars, 10 μ M.

(E) IB analysis (upper panels) of the subcellular localization of the indicated MDM2 proteins in H1299 cells. Histograms (lower panels) represent the percentage of cells exhibiting perinuclear clustering of mitochondria upon expression of the indicated MDM2 proteins in H1299 cells (mean \pm SEM; n = 150 cells from five independent experiments).

(F and G) TEM analysis of mitochondrial ultrastructure in (F) H1299 cells expressing control (sh *Ctr*) or *MDM2* (sh *MDM2*) shRNAs and in (G) H1299 cells expressing FL-MDM2 (FL), MTS-MDM2 (MTS), or MDM2 1-291 (1-291) or in control cells (Empty). Insets show representative microphotographs at higher magnification (Zoom). Scale bars, 500 nm.

*p \leq 0.05 and **p \leq 0.01, indicating statistical significance of the observed differences. ns, not significant. See also Figure S3.

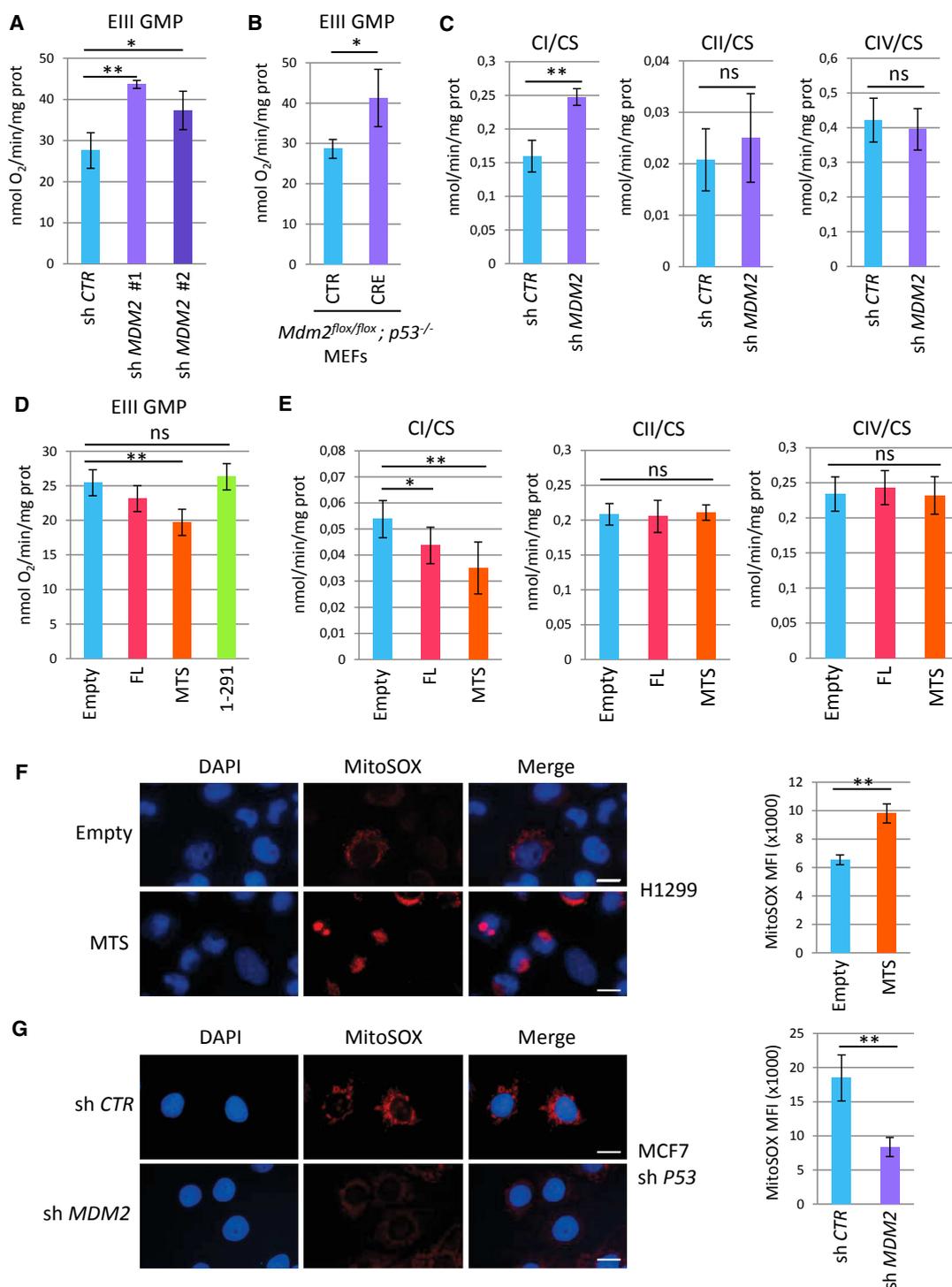


Figure 4. mtMDM2 Controls ETC Complex I Activity and Respiration

(A) Oxygen consumption in H1299 cells transduced with lentiviruses encoding control or two independent *MDM2* shRNAs. ETC CI-driven respiration, in the presence of glutamine, malate, and pyruvate (EIII GMP) as substrates, was measured by using a high-resolution Oxygraph respirometer (mean \pm SEM; $n = 3$). (B) ETC CI-driven respiration (EIII GMP) in *Mdm2^{fllox/fllox}; p53^{-/-}* primary MEFs transduced with control (CTR) or CRE-expressing retroviruses (CRE) (mean \pm SEM; $n =$ four independent populations).

(C) Enzymatic activities of the ETC complexes prepared from H1299 cells expressing control or *MDM2* shRNAs. ETC CI, CII, and CIV activities were normalized to that of citrate synthase (CS) (mean \pm SEM; $n = 3$).

(legend continued on next page)

MT-ND6 in H1299 cells but not that of *MT-ND2*, *MT-ND4*, and *MT-ND5* (Figures 5I and S5G). Moreover, expression of MTS-MDM2-C464A in MDM2-depleted cells still repressed *MT-ND6* expression, confirming that the E3 ligase activity of MDM2 was dispensable for the transcriptional repression of *MT-ND6* (Figure 5J). Consistent with that repressive function, increased *MT-ND6* protein levels were detected both in MDM2-depleted H1299 cells and in *Mdm2*^{KO}; *p53*^{KO} MEFs, whereas expression of MTS-MDM2 in H1299 cells decreased *MT-ND6* protein levels (Figures 5K, 5L, and S5H). Importantly, the specificity of *MT-ND6* immunoblots was confirmed in cell lines harboring a frameshift mutation in *MT-ND6* abolishing its expression (Figure S5I) (Perales-Clemente et al., 2010). These data demonstrate that mtMDM2 directly represses the expression of *MT-ND6*, a key subunit of ETC CI.

Oxidative Stress and Hypoxia Increase mtMDM2 Activities

While screening for MDM2 subcellular localization in H1299 cells exposed to different stress conditions, we found that oxidative stress led to the rapid accumulation of MDM2 in mitochondria. The 4-fold increase of endogenous mtMDM2 levels induced by menadione was abrogated by the addition of the ROS scavenger N-acetyl-cysteine (NAC). MtMDM2 levels also increased upon treatment with rotenone or the pyruvate kinase M2 inhibitor shikonin, likely reflecting the ability of these compounds to induce oxidative stress. In contrast, UV irradiation, the genotoxic agents SN38 and etoposide, or the endoplasmic reticulum (ER)-stress inducer thapsigargin, had no major effect on the amount of mtMDM2 (Figures S6A–S6C). Interestingly, shifting H1299 cells from a 21% O₂ to a 1% O₂ atmosphere, or treatment with the hypoxia-mimetic cobalt chloride (CoCl₂), led to a 3-fold increase of mitochondrial, but not of total, MDM2 levels (Figures 6A and S6D). Co-immunoprecipitation experiments showed that hypoxia increased the binding of endogenous MDM2 to mtHsp70/mortalin and TID1, suggesting that it stimulated the active import of MDM2 into mitochondria (Figures 6B and S6E). Mild PK digestion of purified mitochondria prepared from hypoxic H1299 cells was sufficient to degrade the OMM protein TOM20, but not MDM2 or TFAM, supporting the notion that both basal and hypoxia-induced mtMDM2 are located in the mitochondrial matrix (Figure S6F). Moreover, qChIP assays indicated that hypoxia increased the recruitment of endogenous MDM2 to the LSP and significantly decreased TFAM association with the LSP (Figure 6C). Accumulation of endogenous MDM2 in mitochondria also occurred in NAC-treated H1299 cells cultured in low-oxygen conditions, indicating that increased recruitment of MDM2 into mitochondria during hypoxia was not an indirect effect of electron leakage through defective ETC that leads to superoxide

production (Figure S6G). In line with our findings, increased levels of mtMDM2 during hypoxia or oxidative stress correlated with decreased *MT-ND6* protein levels, and hypoxia-induced repression of *MT-ND6* was abolished upon MDM2 depletion (Figures 6D and S6C). Importantly, MDM2 deficiency altered neither HIF1 α stabilization nor the induction of its target genes *Lactate dehydrogenase A (LDHA)* and *Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1)* during hypoxia, excluding the possibility that the impact of MDM2 depletion on *MT-ND6* regulation was indirectly linked to alterations in HIF-mediated responses (Figures S6H and S6I). Consistent with a previous report, hypoxia induced a rapid perinuclear aggregation of mitochondria in H1299 cells (Al-Mehdi et al., 2012) that was similar to that observed upon expression of MTS-MDM2. Notably, shRNA-mediated depletion of endogenous MDM2 impaired this hypoxia-induced perinuclear clustering of mitochondria (Figure 6E). Thus, we conclude that in cancer cells, both ROS and hypoxia trigger MDM2 recruitment to mitochondria to repress expression of *MT-ND6*, control respiration, and regulate mitochondrial network dynamics.

Mdm2 Inactivation in Striated Muscles Results in Enhanced CI Activity and Increased Muscular Endurance in Mild Hypoxic Conditions

To investigate the relevance of MDM2-mediated control of the ETC CI activity *in vivo*, we first analyzed the impact of hypoxia in murine skeletal muscles. As soon as 3 hr after exposing WT C57BL/6 mice to an atmosphere composed of 15% O₂, mtMDM2 levels in skeletal muscles increased, whereas those of *MT-ND6* decreased (Figure 6F). Next, we evaluated the consequences of *Mdm2* inactivation in striated muscle cells by crossing *Mdm2* conditional knockout (*Mdm2* flox) animals (Grier et al., 2002) with *Acta1-Cre* transgenic (*Acta*) mice that express the Cre recombinase under the control of the skeletal α -actin promoter (Miniou et al., 1999). To confirm that the phenotypes resulting from *Mdm2* inactivation in striated muscles were p53 independent, these animals were also crossed with *p53* knockout (KO) mice. We then monitored Cre-driven deletion of the *Mdm2*^{flox} allele in different tissues harvested from *Mdm2*^{flox/flox}; *ActaCre*^{Tg}; *p53*^{-/-} and *Mdm2*^{+/-flox} or *+/+*; *ActaCre*^{Tg}; *p53*^{-/-} mice (hereinafter referred to as *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} and *Mdm2*^{CTR(ACTA)}; *p53*^{KO} mice, respectively). In this mouse model, *Mdm2* inactivation was restricted to striated skeletal muscles, as evidenced by the strong reduction of *Mdm2* mRNA levels in the gastrocnemius, tibialis, and soleus but not in the heart, lungs, liver, and brain (Figure S6J). *Mdm2* inactivation had no impact on the mRNA levels of the muscular differentiation markers *Myf6*, *Mef2c*, *MyoD*, and *Myogenin* or on the overall histological organization of muscle fibers (Figures S6K and S6L). However, skeletal

(D) ETC CI-driven respiration (EIII GMP) in H1299 cells expressing FL-MDM2 (FL), MTS-MDM2 (MTS), or MDM2 1-291 (1-291) and in control cells transfected with the corresponding empty vector (Empty) (mean \pm SEM; n = 3).

(E) ETC CI, CII, and CIV activities in H1299 cells expressing FL-MDM2 or MTS-MDM2. Complex activities were normalized to that of CS (mean \pm SEM; n = 3).

(F) MitoSOX staining of control (Empty) and H1299 cells expressing ectopic MTS-MDM2.

(G) MitoSOX staining (red) of MCF-7 shp53 cells expressing CTR or *MDM2* shRNAs. Nuclei are indicated in blue.

Histobars in (F) and (G) represent the mean fluorescence intensity (MFI) per cell corresponding to the MitoSOX signal (mean \pm SEM; n = 60 cells from three independent experiments). Scale bars, 10 μ M. *p \leq 0.05 and **p \leq 0.01, indicating statistical significance of the observed differences. ns, not significant. See also Figure S4.

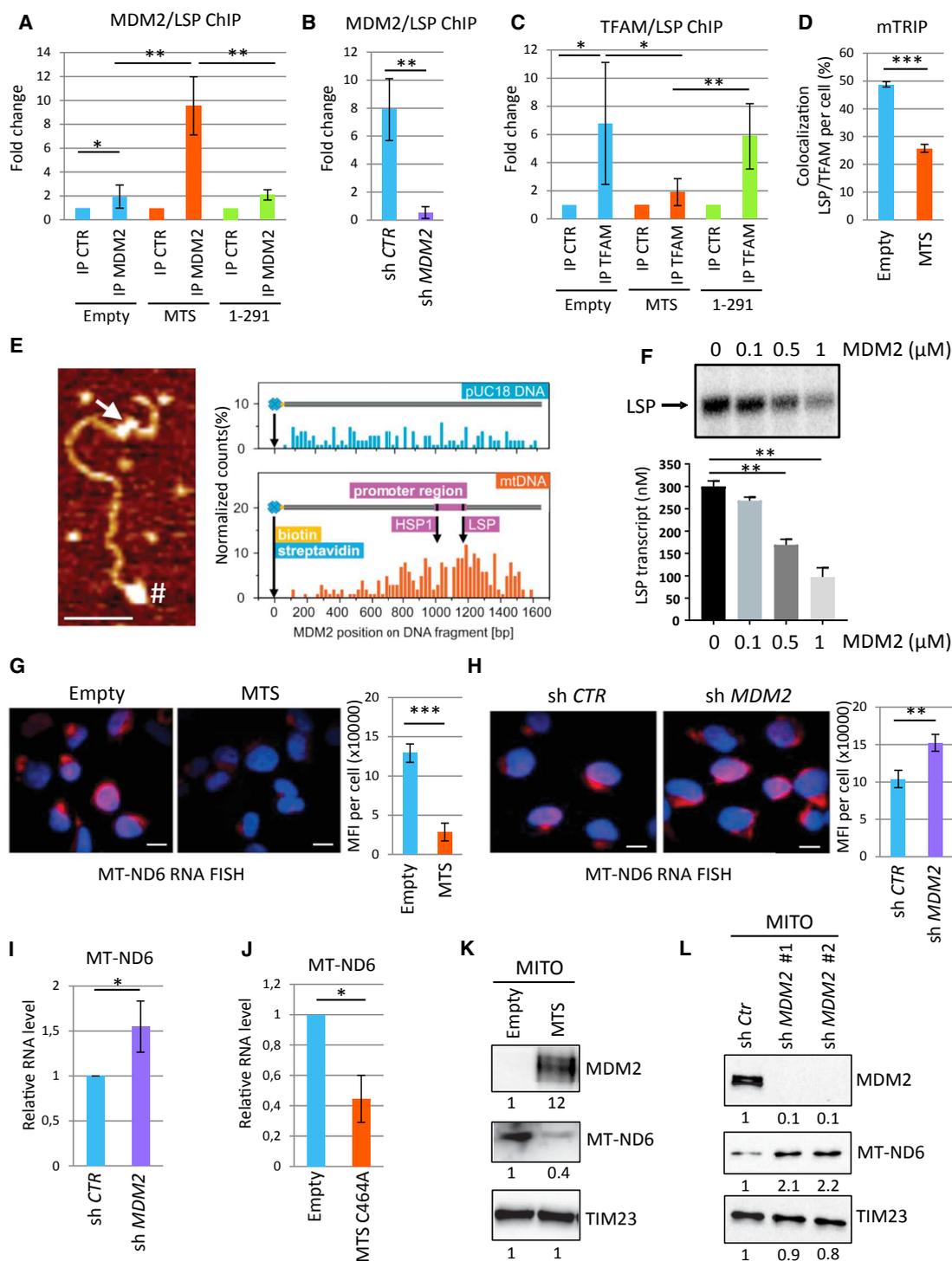


Figure 5. mtMDM2 Represses MT-ND6 Transcription

(A) Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) experiments showing the relative recruitment of mtMDM2 to the light strand promoter (LSP) in H1299 cells expressing MTS-MDM2 (MTS) or MDM2 1-291 (1-291), or in control cells transfected with the corresponding empty vector (Empty). Results were represented as the relative ratio between the mean value of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with an MDM2 polyclonal antibody (N20) and the one obtained with a control irrelevant antibody (mean \pm SEM; $n = 3$).

(B) qChIP analysis of endogenous MDM2 recruitment to the LSP in T47D transduced with lentiviruses expressing control of *MDM2* shRNAs (mean \pm SEM; $n = 4$).

(C) qChIP analysis of TFAM recruitment to the LSP in the same cells as in (A) (mean \pm SEM; $n = 4$).

(legend continued on next page)

muscles of 12- to 16-week-old *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} mice exposed to 15% O₂ for 3 hr displayed higher *MT-ND6* RNA and protein levels than their age-matched *Mdm2*^{CTR(ACTA)}; *p53*^{KO} control littermates in the same hypoxic conditions (Figures 6G and 6H). Of note, HIF1 α protein and *LDHA* mRNA levels were identical in the skeletal muscles of control and *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} mice exposed to mild hypoxia, confirming that MDM2 deficiency did not impair HIF-mediated transcription (Figures S6M–S6O). Notably, ETC CI activity was significantly higher in the hindlimb muscles of *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} mice than in control littermates in these mild hypoxic conditions, whereas ETC CII and IV activities were unaffected (Figure 6I). Next, we evaluated whether MDM2-mediated regulation of CI activity in hypoxic muscles influenced muscular endurance. To answer this question, we measured the locomotor activity of 12- to 16-week-old *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} males and control littermates during an acute exercise workload of forced treadmill running in a normoxic (21% O₂) or a hypoxic (15% O₂) environment. In 21% O₂, the physical capacity of *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} males was indistinguishable from that of control *Mdm2*^{CTR(ACTA)}; *p53*^{KO} animals. Strikingly, while these control mice exhibited an expected alteration of their running capacity when shifted to a 15% O₂ atmosphere, the physical endurance of *Mdm2*^{KO(ACTA)}; *p53*^{KO} mice was identical in normoxic and hypoxic conditions (Figure 6J). Collectively, these data indicate that mtMDM2-mediated control of CI activity is critical to regulate muscular endurance *in vivo*.

MtMDM2 Regulates Migration and Invasion of Cancer Cells

Next, we addressed the relative contribution of the mitochondrial and chromatin-associated pools of MDM2 to the tumorigenic potential of cancer cells. To answer this question, we first assessed the effect of stable expression of MTS-MDM2-C464A or Δ AD-MDM2-C464A on the tumorigenic potential of H1299 cells expressing control or MDM2 shRNAs in xenograft assays in immunocompromised mice. Stable expression of MTS-MDM2-C464A did not enhance the growth rate of control or MDM2-depleted H1299 xenografts, whereas expression of chromatin-bound MDM2 efficiently rescued the tumorigenic po-

tential of MDM2-depleted cells *in vivo* (Figure S7A). However, expression of MTS-MDM2-C464A clearly increased the clonogenic potential of H1299 cells grown in monolayer cultures (two-dimensional; 2D), as well as their ability to form spheroids in 3-dimensional (3D) anchorage-independent growth conditions (Figures 7A, S7B, and S7C). Of note, MTS-MDM2-C464A H1299 cells in clones that grew in 2D conditions exhibited a more dispersed distribution pattern than that observed in control clones (Figure S7D), suggesting that mtMDM2 influenced cancer cell migration and/or invasion. Videomicroscopy coupled with single-cell tracking analyses confirmed that mtMDM2 enhanced the motility of H1299 cells, as illustrated by the longer distance H1299 cells stably expressing MTS-MDM2 traveled in 7 hr and their enhanced ability to maintain directionality during migration (Figures 7B and S7E). Moreover, MDM2-depleted H1299 cells complemented with MTS-MDM2-C464A exhibited enhanced chemotaxis-induced migration in a Transwell assay compared to shRNA-MDM2 cells transduced with an empty lentivirus, as well as increased capacity to invade a semi-solid matrix in 3D-spheroid invasion assays (Figures 7C and 7D). Interestingly, the enhanced invasive properties of H1299 cells expressing MTS-MDM2-C464A correlated with the increased expression of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers, as shown by increased *ZEB1*, *ZEB2*, and *EPHA2* mRNA levels (Figure 7E). Taken together, these findings indicate that mtMDM2 enhances the migratory and invasive properties of cancer cells.

DISCUSSION

The data presented here point to a novel and unexpected role for MDM2 in mitochondria independent of p53. The mitochondrial localization of MDM2 raises important questions regarding the respective roles of the different components of the p53 pathway in mitochondria and the mechanisms by which they are imported in this organelle. Since neither p53 nor MDM2 contains an MTS, it is likely that their active import in mitochondria through the same mitochondrial TOM/TIM transporters involves binding partners that contain classical MTS such as the TID1 protein (Ahn et al., 2010). It is noteworthy that p53 was previously detected both in the OMM and in the mitochondrial matrix and found to control

(D) Confocal microscopy analysis of TFAM (green) recruitment to the LSP (red) following the mTRIP procedure. Histograms represent the percentage of LSP/TFAM co-localization per cell (mean \pm SEM; n = 45 cells from three independent experiments).

(E) *In vitro* binding assay using purified recombinant MDM2 and a 1.6-kb biotinylated DNA probe of the mitochondrial genome encompassing the LSP and the HSP1. Left panel: AFM image showing MDM2 binding to the regulatory region of mtDNA (arrow). # indicates the biotinylated 5' end of the probe used for orientation. Scale bar, 100 nm. Right panel: quantitative distribution of MDM2 binding along the mtDNA probe or a pUC18-derived DNA probe used as a control for non-specific binding (n = 200 DNA fibers).

(F) Upper panel: Autoradiography of a representative *in vitro* mitochondrial transcription assay using a dual-promoter template performed in the presence of increasing concentrations of recombinant MDM2. Lower panel: histograms represent the quantification of LSP-driven transcription (mean \pm SEM; n = 3).

(G) RNA-FISH/mTRIP analysis of *MT-ND6* RNA levels in H1299 cells expressing MTS-MDM2 or in CTR cells transfected with the empty vector (Empty). *MT-ND6* probe is indicated in red; Hoechst is indicated in blue. Scale bars, 10 μ M. Histograms represent the mean fluorescent intensity (MFI) per cell corresponding to *MT-ND6* RNA (mean \pm SEM; n = 45 cells from three independent experiments).

(H) RNA-FISH/mTRIP analysis of *MT-ND6* RNA levels in H1299 cells transduced with lentiviruses expressing control of *MDM2* shRNAs. Scale bars, 10 μ M (mean \pm SEM; n = 45 cells from three independent experiments).

(I) qRT-PCR analysis of *MT-ND6* RNA levels in H1299 cells expressing control or *MDM2* shRNAs (mean \pm SEM; n = 3).

(J) qRT-PCR analysis of the relative *MT-ND6* RNA levels in MDM2-depleted H1299 cells upon transduction with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A or a control empty virus (mean \pm SEM; n = 3).

(K and L) qIB of MDM2, MT-ND6, and TIM23 (loading control) protein levels in purified mitochondria (MITO) prepared (K) from H1299 cells expressing MTS-MDM2 or transfected with the corresponding empty vector and (L) from H1299 cells expressing control (sh Ctr) or two different *MDM2* shRNAs.

*p \leq 0.05, **p \leq 0.01, and ***p \leq 0.001, indicating statistical significance of the observed differences. See also Figure S5.

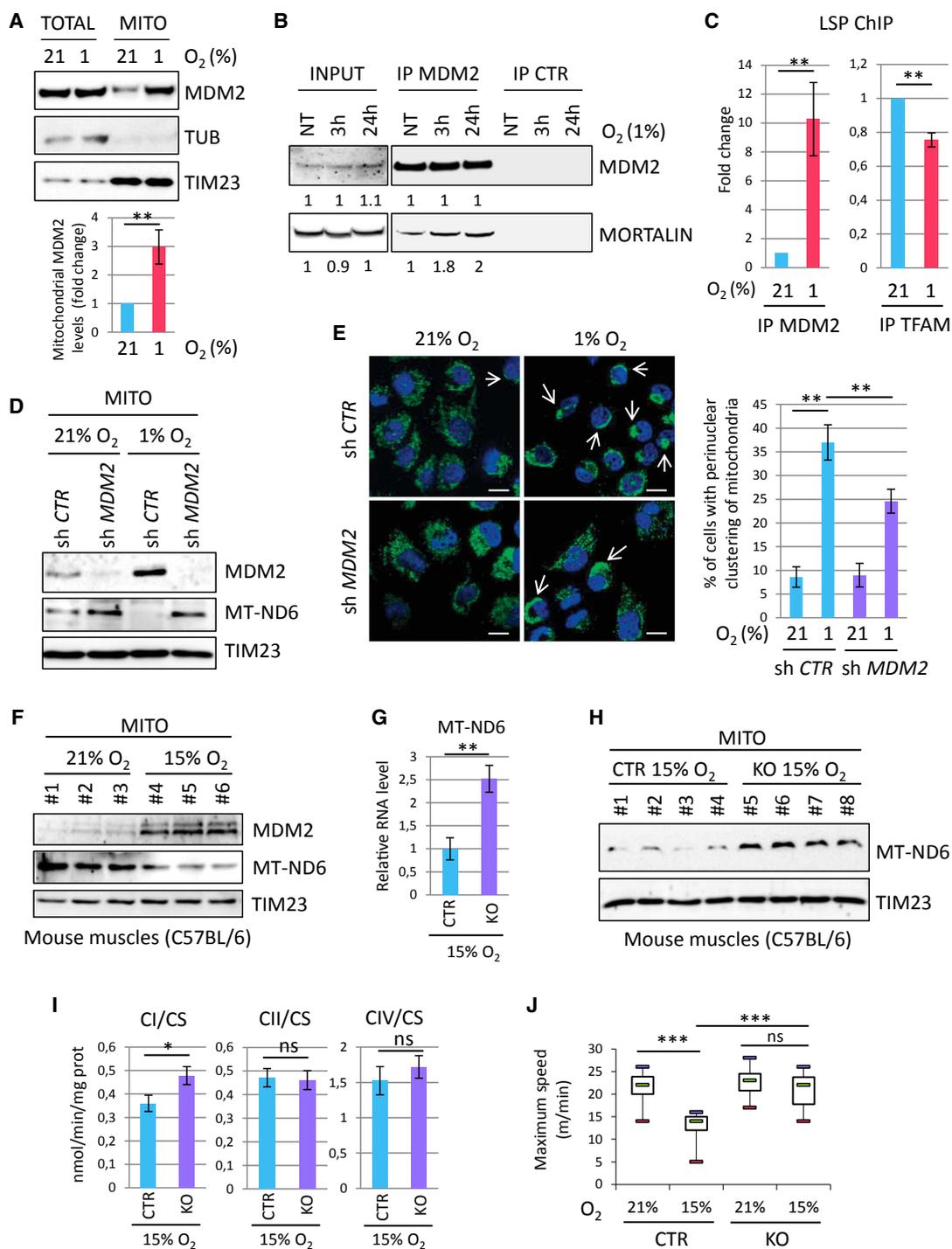


Figure 6. mtMDM2 Represses MT-ND6 Expression and Mitochondrial Respiration during Hypoxia

(A) Top: representative IB analysis of endogenous total (TOTAL) or mitochondrial (MITO) MDM2, TUB, and TIM23 (loading controls) proteins in H1299 cells cultured in 21% or 1% O₂ for 3 hr. Bottom: histograms represent the relative level of endogenous mtMDM2 determined by qIB (mean ± SEM; n = 5).

(B) Co-immunoprecipitation assays showing increased association between endogenous MDM2 and mtHsp70/mortalin in H1299 cells cultured in 21% or 1% O₂ for 3 or 24 hr.

(C) qChIP experiments showing the relative recruitment of endogenous MDM2 (left) and TFAM (right) proteins to the LSP in H1299 cells cultured in 21% or 1% O₂ for 3 hr (mean ± SEM; n = 3).

(legend continued on next page)

cell death through its direct interaction with members of the BCL2 family or Cyclophilin D (Marchenko et al., 2000; Mihara et al., 2003; Vaseva et al., 2012). MDM4, another member of the p53 pathway and direct partner of MDM2, has also been detected in mitochondria where it sustains the pro-apoptotic activities of mitochondrial p53 (mtp53) (Mancini et al., 2009). Interestingly, mtp53 was also found to promote the assembly of the F₀F₁-ATPase and to bind TFAM to increase the expression of the ETC CIV subunit *MT-CO1* (Bergeaud et al., 2014; Saleem and Hood, 2013), suggesting that the role of some components of the p53 pathway in mitochondria extends beyond regulation of cell death. Consistent with that notion, increasing mtMDM2 levels did not trigger apoptosis but, instead, led to *MT-ND6* repression and decreased CI activity. Collectively, these data suggest that mtMDM2 and mtp53 mediate antagonistic, yet independent, activities to fine-tune mitochondrial respiration. Mechanisms coordinating MDM2 and p53 mitochondrial activities are likely to play important functions in several tissues where mitochondria play a central role in physiological responses to environmental changes, including skeletal muscles. Consistently, p53-TFAM interaction increases upon acute physical exercise and *p53* KO animals display decreased muscular endurance due to impaired oxidative metabolism (Park et al., 2009; Saleem et al., 2009; Saleem and Hood, 2013). Strikingly, we found that, in the absence of p53, animals lacking MDM2 in their skeletal muscles exhibited increased exercise endurance that associated with higher *MT-ND6* levels and enhanced ETC CI activity. This phenotype was only detected under mild hypoxic conditions, a situation that leads to the rapid accumulation of MDM2 in mitochondria. These results indicate that several components of the p53 pathway, including MDM2, have important physiological functions in muscles. Future studies will be needed to determine whether mitochondrial functions of MDM2 are also at play in other tissues.

Our data also revealed an important role of MDM2 in the regulation of mitochondrial network dynamics. Perinuclear clustering of mitochondria similar to that triggered by mtMDM2 has been described in hypoxic cells (Al-Mehdi et al., 2012), and consistently, we found that hypoxia triggers active MDM2 import into mitochondria. The exact molecular consequences of this clustering remain enigmatic, but it was suggested that it protects cells from apoptosis induced by mitochondrial depolarization

(Xiao et al., 2017). Thus, it is possible that increasing mtMDM2 levels is part of a defense mechanism to avoid cell death in mild stress conditions. We previously reported that MDM2 is rapidly recruited to chromatin during oxidative stress to control a transcriptional program implicated in redox homeostasis, a function mediated, at least partly, through aa and glutathione metabolism (Riscal et al., 2016). Therefore, it is tempting to speculate that the mitochondrial and chromatin-associated pools of MDM2 contribute to a global metabolic response that is required to cope with an imbalanced redox state.

The potent oncogenic functions of MDM2 prompted us to evaluate the importance of mtMDM2 activities in cancer cells. The exact role of the ETC in cancer development remains controversial. However, our results are consistent with data showing that increased superoxide production by partial inhibition of the ETC CI, or mutations of *MT-ND6*, confers a pro-metastatic phenotype (Ishikawa et al., 2008; Li et al., 2015; Porporato et al., 2014). Further work will be required to investigate whether the effects of mtMDM2 on migration are also linked to increased ROS production or to other effects that may derive from altered ETC activity, such as a change in the NAD⁺/NADH ratio. Nevertheless, our data showing that high mtMDM2 levels enhance the migratory and invasive properties of cancer cells suggest that mitochondrial functions of MDM2 contribute to its oncogenic properties. It also provides a potential molecular explanation for the higher metastatic potential and poor clinical outcome of patients with tumors exhibiting high MDM2 expression (Chen et al., 2012).

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Cell Culture and Treatments
 - Mouse Models
- METHOD DETAILS
 - Constructs, Cloning, and Mutagenesis
 - Transfection and Transduction

(D) IB analysis of endogenous MDM2, *MT-ND6*, and *TIM23* (loading control) protein levels in purified mitochondria prepared from H1299 cells expressing control (sh *Ctr*) or *MDM2* (sh *MDM2*) shRNAs cultured in 21% O₂ or 1% O₂ for 3 hr.

(E) Analysis of the mitochondrial network in H1299 cells expressing control (sh *Ctr*) or *MDM2* (sh *MDM2*) shRNAs cultured in 21% O₂ or 1% O₂ for 24 hr. Left: microphotographs acquired by confocal microscopy after staining with anti-ATP5A (green) antibody and DAPI (blue). Arrows indicate perinuclear clustering of mitochondria. Scale bars, 10 μM. Right: histograms represent the percentage of cells exhibiting perinuclear clustering of mitochondria (mean ± SEM; n = 3).

(F) MDM2, *MT-ND6*, and *TIM23* (loading control) protein levels in purified mitochondria isolated from hindlimb muscles of WT C57BL/6 males housed in normoxic (21% O₂) or mild hypoxic (15% O₂) conditions for 3 hr.

(G) qRT-PCR analysis of *MT-ND6* RNA levels in hindlimb muscles of *Mdm2*^{CTR(ACTA)}, *p53*^{KO} (CTR) and *Mdm2*^{KO(ACTA)}, *p53*^{KO} (KO) animals housed in 15% O₂ for 3 hr (mean ± SEM; n = 6 mice per group).

(H) IB analysis of *MT-ND6* and *TIM23* (loading control) protein levels in purified mitochondria isolated from the hindlimbs of *Mdm2* CTR and KO animals housed in 21% or 15% O₂ for 3 hr.

(I) ETC CI, CII, and CIV activities in the hindlimb muscles of *Mdm2* CTR and KO animals housed in 15% O₂ for 3 hr. Enzymatic activities were normalized to that of CS (mean ± SEM; n = 6 mice per group).

(J) Physical endurance of *Mdm2* CTR and KO males was determined by forced treadmill running in a 21% or 15% O₂ atmosphere. Histograms represent maximal aerobic velocity, expressed in meters per minute (mean ± SEM; n = 10 mice per group).

*p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, and ***p ≤ 0.001, indicating statistical significance of the observed differences. ns, not significant. See also Figure S6.

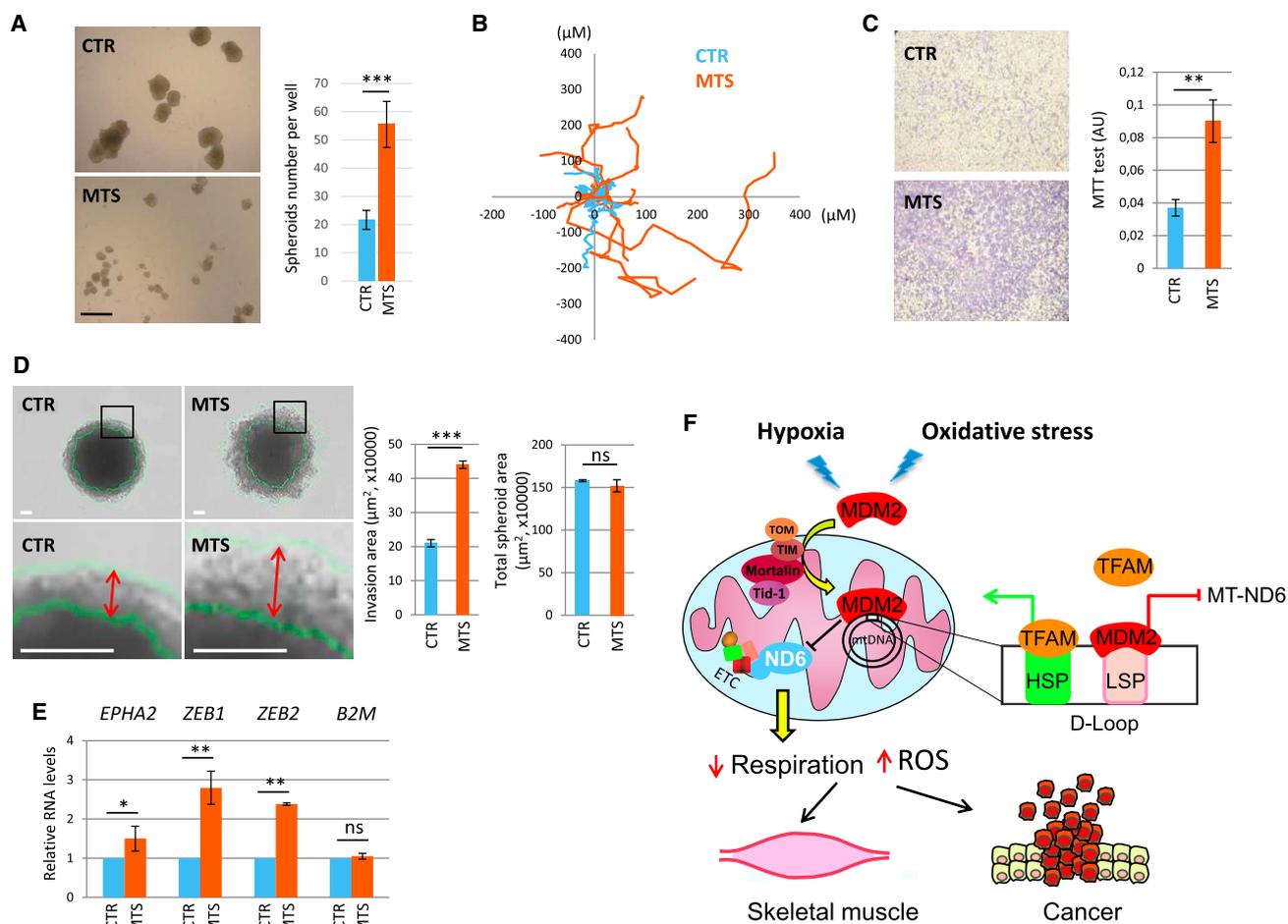


Figure 7. mtMDM2 Increases Migration and Clonogenic Potential of Cancer Cells

(A) Clonogenic potential in anchorage-independent growth conditions of MDM2-depleted H1299 cells transduced with a lentivirus encoding a shRNA-MDM2-resistant version of MTS-MDM2-C464A (MTS) or with a control empty lentivirus (CTR). Left panel: clones were microphotographed 7 days after seeding a single-cell suspension. Scale bar, 500 μM . Right panel: histograms represent the number of clones per well after 7 days of culture (mean \pm SEM; $n = 3$).

(B) Single-cell tracking analysis of H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A (MTS) or with an empty lentivirus. Distance (in microns) to origin and the migratory path of ten representative cells for each population are indicated.

(C and D) mtMDM2 increases invasion in anchorage-independent growth conditions.

(C) Left: microphotographs of Transwell assays performed with MDM2-depleted H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A (MTS) or with an empty lentivirus. Right: histograms represent the number of living cells estimated by a colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay after 16 hr of culture (mean \pm SEM; $n = 3$).

(D) 3D tumor invasion assay. 20,000 MDM2-depleted H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A (MTS) or with an empty lentivirus (CTR) were seeded into ultra-low attachment plates. 24 hr later, the resulting spheroids were transferred in Matrigel-coated plates and microphotographed after 5 days in culture. Scale bars, 100 μM . Histograms represent the invasion area (histograms at left) or the total surface area (histograms at right) of the spheroids (mean \pm SEM; $n = 70$ from three independent experiments). Double arrows indicate the width of the invasion ring.

(E) qRT-PCR analysis of *EPHA2*, *ZEB1*, and *ZEB2* mRNA levels in MDM2-depleted H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A (MTS), or with a control empty lentivirus, after 5 days of culture (mean \pm SEM; $n = 3$).

(F) Schematic representation of mtMDM2 activities in normal muscle and cancer cells. Oxidative stress and hypoxia induce MDM2 localization to mitochondria to repress LSP-driven *MT-ND6* transcription, leading to decreased respiration.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences. ns = not significant. See also Figure S7.

- Subcellular Fractionation Assays
- Protease Protection Assay
- Oxygen Consumption
- Mitochondrial Respiratory Complex Activities
- Immunoblotting
- Co-Immunoprecipitation Assays
- Immunofluorescence and Staining of Mitochondria
- mTRIP Procedure
- Chromatin Immunoprecipitation
- RNA Extraction and Quantitative RT-qPCR

- Electron Microscopy
- Confocal Acquisition, 3D Reconstruction, and Quantification
- Super-Resolution Microscopy
- Spheroid Clonogenic Assay
- 3D Tumor Spheroid Invasion Assay
- Invasion Assay in Boyden Chamber
- *In Vivo* Xenografts
- 2D Clonogenic Assay
- 2D Cell Migration Assay
- Histological Analyses
- Running Tests
- Atomic Force Microscopy
- *In Vitro* Transcription Assays
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures, one table, and one movie and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.023>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Lacroix, R. Rossignol, G. Lenaers, E.M. Valente, R. Kruger, J. Fitzgerald, J.A. Enriquez, R. Acin-Perez, S. Cristae, J. Hsu, A. Vigneron, and J.E. Sarry for discussions, critical reading of the manuscript, and reagents. We are grateful to members of the histology, animal, and imaging facilities of Montpellier BioCampus and Metamus for technical assistance and to the imaging facilities at Institut Pasteur and Institut Curie that are affiliated with the French National Research Infrastructure (ANR) France-Biolmaging (ANR10-INBS-04). This research was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Equipe labélisée 2016), the French National Health Institute for Biomedical Research (INSERM), the French National Cancer Institute (INCa), the General Direction for Care Provision (grant INCa-DGOS-Inserm 6045), and The Laboratory of Excellence EpiGenMed (grant ANR-10-LABX-12-01). G.A. was supported by fellowships from the Région Languedoc-Roussillon, the University of Montpellier, and the Fondation de France. R.R. and M.Y.C. were supported by PhD fellowships from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the French Ministry for Education and Research.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.A., L.K.L., M.R., A.L., C.E.C., C.K.-R., S.E.-M., F.C., and L.L.C. designed the studies, interpreted the data, and wrote the manuscript; G.A., M.Y.C., S.P., L.C., R.R., M.F., M.K., K.N., J.J.A., L.K.L., C.A.-P., K.M., B.O., and B.C. performed the *in vitro* experiments; G.A., S.P., M.Y.C., C.B.-G., L.G., L.K.L., H.D., C.V., and F.B. contributed to the *in vivo* experiments. J.-C.M. provided reagents and mice.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Received: May 3, 2017

Revised: December 21, 2017

Accepted: January 18, 2018

Published: February 15, 2018

REFERENCES

Ahn, B.Y., Trinh, D.L.N., Zajchowski, L.D., Lee, B., Elwi, A.N., and Kim, S.W. (2010). *Tid1* is a new regulator of p53 mitochondrial translocation and apoptosis in cancer. *Oncogene* 29, 1155–1166.

Al-Mehdi, A.B., Pastukh, V.M., Swiger, B.M., Reed, D.J., Patel, M.R., Bardwell, G.C., Pastukh, V.V., Alexeyev, M.F., and Gillespie, M.N. (2012). Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci. Signal.* 5, ra47.

Arnold, J.J., Bernal, A., Uche, U., Sterner, D.E., Butt, T.R., Cameron, C.E., and Mattern, M.R. (2006). Small ubiquitin-like modifying protein isopeptidase assay based on poliovirus RNA polymerase activity. *Anal. Biochem.* 350, 214–221.

Bergeaud, M., Mathieu, L., Guillaume, A., Moll, U., Mignotte, B., Le Floch, N., Vayssière, J.-L., and Rincheval, V. (2014). Mitochondrial p53 mediates a transcription-independent regulation of cell respiration and interacts with the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Cell Cycle* 12, 2781–2793.

Biderman, L., Manley, J.L., and Prives, C. (2012). Mdm2 and MdmX as regulators of gene expression. *Genes Cancer* 3, 264–273.

Chatre, L., and Ricchetti, M. (2013). Large heterogeneity of mitochondrial DNA transcription and initiation of replication exposed by single-cell imaging. *J. Cell Sci.* 126, 914–926.

Chen, H., Xie, L., and Liu, B. (2012). Clinical significance of MDM2 as a tumor biomarker. *Chin.-Ger. J. Clin. Oncol.* 11, 356–360.

Dudek, J., Rehling, P., and van der Laan, M. (2013). Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 274–285.

Fähræus, R., and Olivares-Illana, V. (2014). MDM2's social network. *Oncogene* 33, 4365–4376.

Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2, 287–295.

Geissler, A., Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J., and Pfanner, N. (2000). Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the delta psi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol. Biol. Cell* 11, 3977–3991.

Grier, J.D., Yan, W., and Lozano, G. (2002). Conditional allele of *mdm2* which encodes a p53 inhibitor. *Genesis* 32, 145–147.

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.

Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., and Hayashi, J. (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320, 661–664.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 4, 1–7.

Li, L.-D., Sun, H.-F., Liu, X.-X., Gao, S.-P., Jiang, H.-L., Hu, X., and Jin, W. (2015). Down-regulation of NDUF9 promotes breast cancer cell proliferation, metastasis by mediating mitochondrial metabolism. *PLoS ONE* 10, e0144441.

Mancini, F., Di Conza, G., Pellegrino, M., Rinaldo, C., Prodromo, A., Giglio, S., D'Agnano, I., Florenzano, F., Felicioni, L., Buttitta, F., et al. (2009). MDM4 (MDMX) localizes at the mitochondria and facilitates the p53-mediated intrinsic-apoptotic pathway. *EMBO J.* 28, 1926–1939.

Marchenko, N.D., Zaika, A., and Moll, U.M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 16202–16212.

Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., Mousson de Camaret, B., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., and Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9, 331–339.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11, 577–590.

- Miniou, P., Tiziano, D., Frugier, T., Roblot, N., Le Meur, M., and Melki, J. (1999). Gene targeting restricted to mouse striated muscle lineage. *Nucleic Acids Res.* *27*, e27.
- Minsky, N., and Oren, M. (2004). The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Mol. Cell* *16*, 631–639.
- 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.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., and Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *79*, 7195–7199.
- Oliner, J.D., Pietsenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* *362*, 857–860.
- Park, J.Y., Wang, P.Y., Matsumoto, T., Sung, H.J., Ma, W., Choi, J.W., Anderson, S.A., Leary, S.C., Balaban, R.S., Kang, J.G., and Hwang, P.M. (2009). p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content. *Circ. Res.* *105*, 705–712.
- Perales-Clemente, E., Fernández-Vizarra, E., Acín-Pérez, R., Movilla, N., Bayona-Bafaluy, M.P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., and Enriquez, J.A. (2010). Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3038–3047.
- Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., et al. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Rep.* *8*, 754–766.
- Riscal, R., Schrepfer, E., Arena, G., Cissé, M.Y., Bellvert, F., Heuillet, M., Rambow, F., Bonnell, E., Sabourdy, F., Vincent, C., et al. (2016). Chromatin-bound MDM2 regulates serine metabolism and redox homeostasis independently of p53. *Mol. Cell* *62*, 890–902.
- Saleem, A., and Hood, D.A. (2013). Acute exercise induces tumour suppressor protein p53 translocation to the mitochondria and promotes a p53-Tfam-mitochondrial DNA complex in skeletal muscle. *J. Physiol.* *591*, 3625–3636.
- Saleem, A., Adhichetty, P.J., and Hood, D.A. (2009). Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol. Genomics* *37*, 58–66.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M., and Neupert, W. (1994). Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* *371*, 768–774.
- 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.
- Syken, J., De-Medina, T., and Münger, K. (1999). *TID1*, a human homolog of the *Drosophila* tumor suppressor *l(2)tid*, encodes two mitochondrial modulators of apoptosis with opposing functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 8499–8504.
- Uchida, A., Murugesapillai, D., Kastner, M., Wang, Y., Lodeiro, M.F., Prabhakar, S., Oliver, G.V., Arnold, J.J., Maher, L.J., Williams, M.C., and Cameron, C.E. (2017). Unexpected sequences and structures of mtDNA required for efficient transcription from the first heavy-strand promoter. *eLife* *6*, e27283.
- Vaseva, A.V., Marchenko, N.D., Ji, K., Tsiirka, S.E., Holzmann, S., and Moll, U.M. (2012). p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* *149*, 1536–1548.
- 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.
- Wang, W., Wang, Y., Long, J., Wang, J., Haudek, S.B., Overbeek, P., Chang, B.H.J., Schumacker, P.T., and Danesh, F.R. (2012). Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab.* *15*, 186–200.
- Wienken, M., Dickmanns, A., Nemajerova, A., Kramer, D., Najafova, Z., Weiss, M., Karpiuk, O., Kassem, M., Zhang, Y., Lozano, G., et al. (2016). MDM2 associates with Polycomb Repressor Complex 2 and enhances stemness-promoting chromatin modifications independent of p53. *Mol. Cell* *61*, 68–83.
- Xiao, B., Deng, X., Lim, G.G.Y., Zhou, W., Saw, W.-T., Zhou, Z.D., Lim, K.-L., and Tan, E.-K. (2017). p62-Mediated mitochondrial clustering attenuates apoptosis induced by mitochondrial depolarization. *Biochim. Biophys. Acta* *1864*, 1308–1317.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

| REAGENT OR RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|--|---------------------------|----------------------------------|
| Antibodies | | |
| Mouse monoclonal α -FLAG | Sigma-Aldrich | Cat# F4042 |
| Mouse monoclonal α - β Tubulin | Sigma-Aldrich | Cat# T4026, RRID: AB_477577 |
| Mouse monoclonal α -TFIID (TBP) | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-56795, RRID: AB_786004 |
| Mouse monoclonal α -TIM23 | BD Biosciences | Cat# 611223, RRID: AB_398755 |
| Mouse monoclonal α -MDM2 (4B2C1.11) | Millipore | Cat# OP145, RRID: AB_2235250 |
| Mouse monoclonal α -MDM2 (2A10) | Millipore | Cat# OP115, RRID: AB_564806 |
| Rabbit polyclonal α -MDM2 (N-20) | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-813, RRID: AB_2250633 |
| Mouse monoclonal α -p53 | Cell Signaling Technology | Cat# 2524, RRID: AB_331743 |
| Rabbit monoclonal α -TFAM (D5C8) | Cell Signaling Technology | Cat# 8076S, RRID: AB_10949110 |
| Rabbit polyclonal α -TFAM | Abcam | Cat# ab131607, RRID: AB_11154693 |
| Mouse monoclonal α -TOM20 | BD Biosciences | Cat# 612278, RRID: AB_399595 |
| Mouse monoclonal α -TID1 | Cell Signaling Technology | Cat# 4775, RRID: AB_2094258 |
| Rabbit monoclonal α -Grp75 (Mortalin) | Cell Signaling Technology | Cat# 3593S, RRID: AB_2120328 |
| Rabbit polyclonal α -ATP5A | Abcam | Cat# ab151229 |
| Rabbit polyclonal α -OPA1 | Abcam | Cat# ab42364, RRID: AB_944549 |
| Rabbit monoclonal α -MFN2 | Cell Signaling Technology | Cat# 11925S |
| Rabbit monoclonal α -DRP1 | Cell Signaling Technology | Cat# 8570, RRID: AB_10950498 |
| Rabbit monoclonal α -Phospho-DRP1 (Ser616) | Cell Signaling Technology | Cat# 4494S, RRID: AB_11178659 |
| Rabbit monoclonal α -Phospho-DRP1 (Ser637) | Cell Signaling Technology | Cat# 6319S, RRID: AB_10971640 |
| Rabbit monoclonal α -HSP90 | Cell Signaling Technology | Cat# 4877S, RRID: AB_2233307 |
| Mouse monoclonal α -Cytochrome C | Cell Signaling Technology | Cat# 12963, RRID: AB_2637072 |
| Rabbit monoclonal α -Akt1 | Cell Signaling Technology | Cat# 2938, RRID: AB_915788 |
| Rabbit polyclonal α -cleaved caspase 3 | Cell Signaling Technology | Cat# 9661 |
| Rabbit polyclonal α -ND6 (FL-174) | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-20667, RRID: AB_2282522 |
| Rabbit polyclonal α -ND6 (V-16) | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-20510 |
| Rabbit monoclonal α -HIF1 α | Cell Signaling Technology | Cat# 14179, RRID: AB_2622225) |
| HRP-linked α -mouse IgG | Cell Signaling Technology | Cat# 7076, RRID: AB_330924 |
| HRP-linked α -rabbit IgG | Cell Signaling Technology | Cat# 7074, RRID: AB_2099233 |
| Alexa Fluor 488 α -mouse IgG | Thermo Fisher Scientific | Cat# A-11029, RRID: AB_2534088 |
| Alexa Fluor 555 α -mouse IgG | Thermo Fisher Scientific | Cat# A-21425, RRID: AB_2535846 |
| Alexa Fluor 488 α -rabbit IgG | Thermo Fisher Scientific | Cat# A-11034, RRID: AB_2576217 |
| Alexa Fluor 555 α -rabbit IgG | Abcam | Cat# ab150078 |
| 10 nm gold-conjugated α -mouse IgG | Sigma-Aldrich | Cat# G7777 |
| Normal mouse IgG | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-2025 |
| Normal rabbit IgG | Santa Cruz Biotechnology | Cat# sc-2027 |
| Bacterial and Virus Strains | | |
| ElectroMAX DH10B Cells | Thermo Fisher Scientific | Cat# 18290015 |
| TOP10 chemically competent E. Coli | Thermo Fisher Scientific | Cat# C404010 |
| Rosetta (DE3) competent cells | Novagen | Cat# 70954 |
| Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins | | |
| DMEM, high glucose, GlutaMAX | Thermo Fisher Scientific | Cat# 10566016 |
| MEBM Basal Medium | Lonza | Cat# CC-3151 |

(Continued on next page)

Continued

| REAGENT OR RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|--|-----------------------------|------------------|
| B27 supplement w/o Vitamin A | Thermo Fisher Scientific | Cat# 12587010 |
| Heparin | Fisher Scientific | Cat# 10639163 |
| Human FGF-2IS | Miltenyi Biotech | Cat# 130104922 |
| Human EGF | Miltenyi Biotech | Cat# 130099750 |
| MTT formazan | Sigma-Aldrich | Cat# M2003 |
| 6.5 mm Transwell with 8.0 μ m Pore | Corning | Cat# 3464 |
| Matrigel | Corning | Cat# 354248 |
| ULA plates | Corning | Cat# 3473 |
| Protease Inhibitor Complete | Roche | Cat# 11836153001 |
| VECTASHIELD mounting medium +DAPI | Vector Laboratories | Cat# H-1200 |
| Proteinase K | Thermo Fisher Scientific | Cat# 25530049 |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich | Cat# T9284 |
| Glutaraldehyde 25% | Electron Microscopy Science | Cat# 16220 |
| Paraformaldehyde 20% | Electron Microscopy Science | Cat# 15713 |
| Epon resin (EMBed-812 kit) | Electron Microscopy Science | Cat# 14120 |
| Uranyl acetate | BDH Chemicals | Cat# 30550 |
| LR White Embedding Resin | Electron Microscopy Science | Cat# 14381 |
| Bovine Serum Albumin | Sigma-Aldrich | Cat# A2058 |
| FCCP | Sigma-Aldrich | Cat# C2920 |
| MKT-077 | Sigma-Aldrich | Cat# M5449 |
| 17-AAG | Sigma-Aldrich | Cat# A8476 |
| Ganetespib (STA-9090) | Selleck Chemicals | Cat# S1159 |
| Dynabeads Protein G | Thermo Fisher Scientific | Cat# 10004 |
| Mitotracker Red FM | Thermo Fisher Scientific | Cat# M22425 |
| MitoSOX | Thermo Fisher Scientific | Cat# M36008 |
| N-Acetyl-L-cysteine (NAC) | Sigma-Aldrich | Cat# A7250 |
| Staurosporine | Sigma-Aldrich | Cat# S5921 |
| Digitonin | Sigma-Aldrich | Cat# D5628 |
| Metformine | Sigma-Aldrich | Cat# M0605000 |
| L-Glutamine | Thermo Fisher Scientific | Cat# 25030024 |
| ADP | Sigma-Aldrich | Cat# A2754 |
| Malate | Sigma-Aldrich | Cat# M1125 |
| Pyruvate | Sigma-Aldrich | Cat# P5280 |
| Succinate | Sigma-Aldrich | Cat# S9637 |
| Rotenone | Sigma-Aldrich | Cat# R8875 |
| Menadione | Sigma-Aldrich | Cat# M5625 |
| H ₂ O ₂ | Sigma-Aldrich | Cat# H1009 |
| Shikonin | Sigma-Aldrich | Cat# S7576 |
| SN-38 | Sigma-Aldrich | Cat# H0165 |
| Thapsigargin | Sigma-Aldrich | Cat# T9033 |
| Etoposide | Sigma-Aldrich | Cat# E2600000 |
| Cobalt Chloride | Sigma-Aldrich | Cat# 449776 |
| TRI reagent | Sigma-Aldrich | Cat# T9424 |
| Atto488 NT Labeling kit | Jena Bioscience | Cat# PP-305-488 |
| Atto550 NT Labeling kit | Jena Bioscience | Cat# PP-305-550 |
| Pierce ECL Western Blotting Substrate | Thermo Fisher Scientific | Cat# 32106 |
| SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate | Thermo Fisher Scientific | Cat# 34094 |
| Muscovite Mica V1 25x25mm | Electron Microscopy Science | Cat# 56-25 |

(Continued on next page)

Continued

| REAGENT OR RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|---|-------------------------------------|---|
| Streptavidin | Sigma-Aldrich | Cat# S4762 |
| Ulp1 | LifeSensors | Cat# 4010 |
| TFAM | Indigo Biosciences | Cat# MV200 |
| TFB2M | Indigo Biosciences | Cat# MV300 |
| POLRMT | Indigo Biosciences | Cat# MV100 |
| Critical Commercial Assays | | |
| QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit | Agilent Technologies | Cat# 200521 |
| NucleoBond Xtra Maxi Plus | MACHEREY-NAGEL | Cat# 740416.10 |
| SuperScript III Reverse Transcriptase | Thermo Fisher Scientific | Cat# 18080093 |
| SYBR Green Master Mix | Takara | Cat# RR820L |
| REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit | Sigma-Aldrich | Cat# XNAT-100RXN |
| NucleoSpin Extract II kit | MACHEREY-NAGEL | Cat# 740609.250 |
| In-Fusion HD Cloning Plus | Takara | Cat# 638909 |
| Deposited Data | | |
| Original imaging data | This paper; Mendeley Data | https://doi.org/10.17632/86vx3svs8t.1 |
| Experimental Models: Cell Lines | | |
| Human: H1299 | ATCC | Cat# CRL-5803 |
| Human: 786.O | ATCC | Cat# CRL-1932 |
| Human: MCF7 | ATCC | Cat# HTB-22 |
| Human: T47D | ATCC | Cat# HTB-133 |
| Human: MDA-MB 231 | ATCC | Cat# CRM-HTB-26 |
| Human: MDA-MB 468 | ATCC | Cat# HTB-132 |
| Human: U2OS | ATCC | Cat# HTB-96 |
| Human: 293T | ATCC | Cat# CRL-3216 |
| Murine: 3T3 | Dr. Enriquez lab (CNIC, Madrid) | N/A |
| Murine: 3T3 ND6 delC13887 | Dr. Enriquez lab (CNIC, Madrid) | N/A |
| Murine: Mdm2 ^{flox/flox} ; p53 ^{-/-} MEFs | This paper | N/A |
| Experimental Models: Organisms/Strains | | |
| C57BL/6 | Charles River Laboratory | Cat# 027 |
| C57BL/6 Mdm2 ^{+/-flox} | Grier et al., 2002 | N/A |
| C57BL/6 Acta1-Cre | Miniou et al., 1999 | N/A |
| C57BL/6 p53 KO | Jacks et al., 1994 | N/A |
| C57BL/6 Mdm2 ^{+/-} (Acta); p53 KO | This paper | N/A |
| C57BL/6 Mdm2 ^{flox/flox} (Acta); p53 KO | This paper | N/A |
| Hsd:AthymicNude-Foxn1 ^{nu} | Envigo | Cat# 6904F |
| Oligonucleotides | | |
| See Table S1 | N/A | N/A |
| Recombinant DNA | | |
| pcDNA 3.1 (empty) | Riscal et al., 2016 | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 FL (1-491) | Riscal et al., 2016 | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 101-491 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 201-491 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 301-491 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 1-391 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 1-291 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 Δ291-381 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 Δ331-381 | This paper | N/A |

(Continued on next page)

Continued

| REAGENT OR RESOURCE | SOURCE | IDENTIFIER |
|--|---|---------------------|
| pCMV-FLAG MDM2 Δ 382-429 | This paper | N/A |
| pCMV-FLAG MDM2 Δ 429-491 | This paper | N/A |
| pCMV-HSP90 | This paper | |
| pCMV-MDM2 R181A/K182A/R183A (Δ NLS) | This paper | N/A |
| pCMV-MDM2 MTS | This paper | N/A |
| pCMV-MDM2 C464A | This paper | N/A |
| pLENTI6-MDM2 MTS C464A shMdm2 #2 resistant | This paper | N/A |
| pLENTI6-MDM2 Δ 222-302 C464A (Δ AD C464A) shMdm2 #2 resistant | This paper | N/A |
| pLKO.1_Puro control shRNA (sh Ctr) | Sigma-Aldrich | Cat# SHC002 |
| pLKO.1_Puro shMdm2 #1 | Sigma-Aldrich | Cat# TRCN0000003377 |
| pLKO.1_Puro shMdm2 #2 | Sigma-Aldrich | Cat# TRCN0000003378 |
| pT-REx-DEST30 Mortalin miRNA | R. Kruger and J. Fitzgerald, Hertie-Institute Tubingen | N/A |
| pT-REx-DEST30 neg miRNA control | R. Kruger and J. Fitzgerald, Hertie-Institute Tubingen | N/A |
| pRS-shLuc | Netherlands Cancer Institute (NKI) | N/A |
| pMKO.1 Puro shp53 | Addgene | Cat# 10671 |
| HR-MMP Cre GFP | Silver and Livingston, 2001 | N/A |
| pSUMO-MDM2 | This paper; Arnold et al., 2006 | N/A |
| Software and Algorithms | | |
| Gwyddion | http://gwyddion.net/ | RRID: SCR_015583 |
| FiberApp | Usov I., Mezzenga R., ETH | RRID: SCR_015826 |
| NanoScope Analysis | Bruker Corporation | V1.8 (32bit) |

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact (laurent.lecam@inserm.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Cell Culture and Treatments**

H1299, 786.0, MCF7, T47D, MDA-MB 231, MDA-MB 468, U2OS, 293T and primary MEFs (isolated at E13.5 from *Mdm2*^{flox/flox}; *p53*^{-/-} mice), were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + Glutamax, supplemented with 10% fetal bovine serum and kept at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Wild-type (CTR) and *ND6*-KO (*delC13887*) mouse 3T3 cells were kindly provided by Dr. Enriquez J.A. and Dr. Acin Perez R. (CNIC, Madrid). The indicated drugs were directly added in the culture medium: FCCP (10 or 50 μ M), 17-AAG (5 μ M), STA-9090 (200 nM), MKT-077 (10 μ M), Menadione (100 μ M), H₂O₂ (10 mM), Shikonin (20 μ M), Rotenone (100 nM), SN-38 (2.5 μ g/mL), Thapsigargin (100 nM), Etoposide (100 μ g/mL), NAC (2 mM), Metformin (2 mM), Staurosporine (1 μ M) and Cobalt Chloride (100 μ M). UV irradiation (50 mJ/cm²) was used to induce DNA damage. Hypoxia was obtained by placing cells in a 1% oxygen tri-gaz incubator (37°C, 5% CO₂, balanced N₂).

Mouse Models

To specifically deplete *Mdm2* in skeletal muscle, *Mdm2*^{+/^{flox}} animals ([Grier et al., 2002](#)) were intercrossed with *Acta1*-Cre transgenic mice expressing the Cre recombinase under the control of the skeletal α -actin promoter ([Miniou et al., 1999](#)). These mice were then crossed with *p53* KO mice ([Jacks et al., 1994](#)). 12- to 16-week-old males harboring the *Mdm2* flox or the WT alleles, the *Acta1*-Cre transgene and the *p53* null allele were used to generate age-matched experimental groups. Mice genotyping was performed by PCR on genomic DNA prepared from tail biopsies using the Red-N extract kit. Sequence of primers used can be provided upon request.

8-week-old Hsd:AthymicNude-Foxn1^{nu} mice (Envigo) were used for *in vivo* xenografts assay. Mice were housed under standard conditions with a 12:12 hr light-dark cycle and access to food and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Ethic Committee for Animal Welfare.

METHOD DETAILS

Constructs, Cloning, and Mutagenesis

The following constructs were used for shRNA-mediated knockdown experiments: pLKO.1_Puro shMDM2 #1, pLKO.1_Puro shMDM2 #2 and pMKO.1_puro shp53 (a gift from W. Hahn). Mortalin shRNA and the corresponding control were kindly provided by Prof R. Kruger and Dr. J. Fitzgerald. For inactivation of murine *Mdm2* in primary MEFs, a retroviral construct expressing a self-excising CRE recombinase was used (Silver and Livingston, 2001). The pLKO.1_puro Non-Mammalian shRNA Control and retrovirus expressing shRNA targeting the firefly luciferase gene were used as negative controls. For experiments based on expression of ectopic MDM2, cDNAs were all cloned in the pCMV-FLAG vector to generate N-terminally FLAG-tagged proteins. Deletion mutants were generated using the Quikchange site-directed mutagenesis kit (Agilent). The mitochondrial-targeted MDM2 mutant (MTS-MDM2) was generated by removing the N-terminal FLAG tag and replacing it with the sequence encoding the mitochondrial targeting sequence (MTS) of the E1 subunit of the Pyruvate Dehydrogenase (PDHE1) complex (aa 1-30). For complementation experiments, lentiviruses encoding mitochondrial-targeted MDM2 (pLENTI6-MTS-MDM2-C464A) or chromatin-bound MDM2 (Δ AD-MDM2-C464A) harboring silent mutations allowing resistance to MDM2 shRNA were used.

Transfection and Transduction

For expression of ectopic MDM2, cells were transiently transfected with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer instructions. Lentiviral and retroviral particles were produced in 293T packaging cells as previously described (Hatchi et al., 2011). Transduction was performed by incubating cells with the viral supernatant overnight, in presence of 8 μ g/mL Polybrene.

Subcellular Fractionation Assays

Purified mitochondria and subcellular fractionation assays were mainly performed as previously reported (Frezza et al., 2007). Briefly, cells were resuspended in mitochondria isolation buffer (MIB, 200 mM sucrose, 10 mM Tris/MOPS, 1 mM EGTA/Tris and protease inhibitors), and then lysed using a motor-driven homogenizer operating at 1600 rpm. An aliquot of the resulting extract was used as whole cell lysate (TOTAL). The remaining lysate was centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C. The pellet, mainly containing intact nuclei (80%–90%), was washed twice in MIB and resuspended in Laemmli buffer (NUCL). The supernatant was centrifuged again at 600 g for 10 min at 4°C to remove any contaminants coming from the nuclear fraction, and then centrifuged again at 7000 g for 10 min at 4°C to pellet mitochondria. The mitochondrial fraction represented the organelles, washed once in MIB and finally resuspended in Laemmli buffer. The supernatant resulting from the high speed centrifugation, containing cytosoluble proteins, was centrifuged again at 7000 g for 10 min at 4°C to avoid contamination from the mitochondrial fraction and finally diluted in Laemmli buffer 2X (CYTO). For experiments performed on mitochondria isolated from skeletal muscles, mitochondria were prepared from mouse hind limb muscles as previously described (Frezza et al., 2007). Tata-box binding protein (TBP), Tubulin (TUB), and TIM23 were used as markers of nuclear, cytosolic, and mitochondrial proteins, respectively.

Protease Protection Assay

Purified mitochondria were resuspended in MIB and incubated with either 0.5 or 1 μ g/mL Proteinase K (PK) for 20 min on ice. 1% Triton X-100 was eventually added to permeabilize the mitochondrial membranes and allow PK to reach the mitochondrial matrix. Samples were then subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. Anti-TOM20, TIM23 and TFAM antibodies were used to analyze PK-mediated degradation of proteins located in the outer mitochondrial membrane (OMM), the inner mitochondrial membrane (IMM) and the mitochondrial matrix (MM), respectively.

Oxygen Consumption

To measure oxygen consumption, 5×10^6 cells were resuspended in respiration buffer (EGTA 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, K Lactobionate 60 mM, Taurine 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, HEPES 20 mM, Sucrose 110 mM and BSA 1 mg/mL at pH 7.1) and then permeabilized with digitonin (15 μ g/10⁶ cells). The respiratory rates were recorded at 37°C in 2 mL glass chambers using a high-resolution Oxygraph-2k respirometer (O2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria). Activation of ATP synthesis was induced by the addition of 1.5 mM ADP. Respiration driven by complex I coupled to ATP synthesis (EIII-GMP) was measured by adding glutamine (2 mM), malate (5 mM) and pyruvate (5 mM). The further addition of Succinate (10 mM) and Rotenone (10 μ M) allowed the measurement of respiration driven by complex II (EIII-SR).

Mitochondrial Respiratory Complex Activities

Electron transport chain (ETC) complex activities were determined from total cell lysates or crude homogenates of mixed hind-limb muscles as described previously (Medja et al., 2009). The activities of respiratory chain complexes I, II, and IV were expressed relative to that of the matrix enzyme citrate synthase.

Immunoblotting

Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with the following primary antibodies: anti-p53 (Cell Signaling), -TBP (Santa Cruz), - β Tubulin (Sigma-Aldrich), -MDM2 (clones 4B2 and 2A10, Millipore), -TOM20 (BD Biosciences), -TIM23

(BD Biosciences), -TFAM (clone D5C8, Cell Signaling, and Abcam), -FLAG (Sigma-Aldrich), -TID1 (Cell Signaling), -Grp75/Mortalin (Cell Signaling), -Opa1 (Abcam), -MFN2 (Cell Signaling), -DRP1 (Cell Signaling), -pDRP1 (Ser616, Cell Signaling), -pDRP1 (Ser637, Cell Signaling), -AKT1 (Cell Signaling) -HSP90 (Cell Signaling), -Cytochrome C (Cell Signaling), -cleaved Caspase 3 (Cell Signaling), -MT-ND6 (clones FL-174 and V-16, Santa Cruz), -HIF1a (Cell Signaling). HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit IgG (Cell Signaling) were used as secondary antibodies. Detection was performed by using either the Pierce ECL Western Blotting Substrate or the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific).

Co-Immunoprecipitation Assays

10^7 cells were lysed in RIPA buffer (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing protease inhibitors and incubated 1 hr on ice. Immunoprecipitation (IP) was performed by incubating 500 μ g of the whole-cell lysates (INPUT) with 2 μ g of antibody overnight at 4°C. Irrelevant mouse or rabbit IgGs (Santa Cruz) were used as control. The following day, Dynabeads Protein G were added and incubated for 6 hr at 4°C. The immunocomplexes were then washed 3 times with lysis buffer, resuspended in Laemmli, and processed for immunoblotting.

Immunofluorescence and Staining of Mitochondria

Cells cultured on glass coverslips were fixed in PBS 4% PFA and then washed in PBS. Samples were permeabilized in PBS 0.1% Triton X-100 for 15 min, followed by blocking in PBS 0.1% Triton X-100 + 1% BSA, 1 hr at 37°C. Primary antibodies, including anti-MDM2 (clone 4B2, Calbiochem, 1/50), FLAG (Sigma-Aldrich, 1/500), ATP5A (Abcam, 1/500), TFAM (Cell Signaling, 1/500) and cytochrome c (Cell Signaling, 1/300), were diluted in blocking solution and incubated 2 hr in a humidified chamber. After 3 washes in PBS, samples were incubated with the appropriate Alexa 488- and Alexa 555- conjugated secondary antibodies for 1 hr at room temperature. Coverslips were then washed 3 times in PBS and finally treated with *VECTASHIELD Mounting Medium* containing *DAPI*. Representative microphotographs were acquired using a ZEISS ApoTome. For detection of mitochondrial superoxide ions, cells cultured on glass coverslips were incubated with DMEM + 5 μ M MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator for 10 min at 37°C. For MitoTracker staining, cells were incubated 1 hr with 200 nM MitoTracker Red FM. Cells were then washed 3 times with DMEM, rinsed in PBS twice and finally processed for immunofluorescence.

mTRIP Procedure

mTRIP analysis was performed as previously described (Chatre and Ricchetti, 2013). Briefly, cells plated on glass coverslips were fixed with 2% PFA and permeabilized with 0.5% Triton X-100. Cells were then incubated in 50% formamide/2XSSC for 30 min at RT, and denatured in 70% formamide/2XSSC for 4 min at 75°C. Hybridization was performed with 40 ng of probe for 16 hr at 37°C. *MT-ND6* and LSP probes for FISH were labeled by nick translation of PCR products, incorporating Atto488-dUTP or Atto550-dUTP. Coordinates of *MT-ND6* probes were reported previously (Chatre and Ricchetti, 2013). Coordinates of LSP probe are 213-445. 40 ng of labeled probes were mixed with 400 ng of sonicated salmon sperm DNA in hybridization buffer (50% formamide, 10% dextran sulfate, in 2XSSC pH 7.0), denatured at 80°C for 10 min and kept at 37°C for 30 min. After washing the slides in SSC, the DNA was stained with 10 mg/mL Hoechst. For mTRIP-coupled immunofluorescence (LSP-TFAM colocalization), after hybridization and SSC wash, staining with TFAM antibody was performed.

Chromatin Immunoprecipitation

ChIP assays were mainly performed as previously described (Riscal et al., 2016), with some modifications. Briefly, 10^7 cells were cross-linked in 1% formaldehyde/1% paraformaldehyde for 5 min, followed by addition of 125 mM Glycine to stop the reaction. Cells were then washed in PBS, resuspended in lysis buffer (10 mM Tris pH 8, 140 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Triton X-100, 0.05% NaDoc, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and protease inhibitors) and chromatin was sheared by sonication. qChIPs were carried out by incubating cell lysates (Input) with 20 μ L of protein G-Dynabeads and 5 μ g of antibody (MDM2, clone N20, Santa Cruz; TFAM, Cell Signaling). The same amount of rabbit IgGs (Santa Cruz) was used for control ChIP experiments. After O/N incubation, washing, reverse cross-linking and treatment with both RNase A and Proteinase K, proteins were removed with phenol/chloroform extraction and DNA was recovered using the NucleoSpin Extract II kit. Input and immunoprecipitated DNA were then analyzed by qPCR using the SYBR Green Master mix on a LightCycler 480 SW 1.5 apparatus (Roche). Results are represented as the mean value of at least 3 independent experiments of immunoprecipitated chromatin (calculated as a percentage of the input) with the indicated antibodies after normalization by a control ChIP performed with rabbit IgGs.

RNA Extraction and Quantitative RT-qPCR

Total RNA was isolated using the TRI-reagent and then reverse transcribed with the SuperScript III Reverse Transcriptase. The resulting cDNAs were quantified by real-time qPCR using the SYBR Green Master mix on a LightCycler 480 SW 1.5 apparatus (Roche). The relative mRNA levels were calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method and normalized to *Tata Binding Protein (TBP)* mRNA level.

Electron Microscopy

For immunogold staining, cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) and 0.1% (w/v) glutaraldehyde in PBS for 1 hr, washed 3 times in PBS and then subjected to dehydration with increasing ethanol concentrations. Samples were then embedded in LR White

resin and polymerized by exposure to UV light. Ultrathin sections of the samples were transferred on grids, followed by the hybridization procedure. Sections were first treated with a blocking solution (0.5% glycine, 1% BSA in PBS for 10 min) and then incubated 1 hr with anti-FLAG antibody (1/150, in PBS 1% BSA); grids were washed 3 times, followed by incubation with 10 nm gold-conjugated anti-mouse antibody (1/20 in PBS 1% BSA, 1 hr). Sections were then washed 3 times in PBS and 3 times in distilled water, and finally counterstained in 3% uranyl acetate. Samples were analyzed by using a JEOL JEM 1200 EX2 transmission electron microscope. For ultrastructure analysis, cells were fixed 1 hr in PBS 2.5% glutaraldehyde, washed 3 times in PBS and dehydrated. Samples were then embedded in Epon resin and polymerized at 60°C. Ultrathin sections were transferred on grids and finally counterstained in 2% uranyl acetate. Samples were analyzed using a HITACHI H 7100 transmission electron microscope.

Confocal Acquisition, 3D Reconstruction, and Quantification

Confocal acquisitions were performed using a spinning-disk Perkin-Elmer Ultraview RS Nipkow Disk, an inverted laser-scanning confocal microscope Zeiss Axiovert 200 M with an Aplanachromat 63X/1.4 NA oil objective and a Hamamatsu ORCA II ER camera (Institut Pasteur, Paris). Microphotographs were acquired using non-saturating settings, and the same imaging parameters were used for all samples. Optical z-slices in 200-nm steps covering the whole depth of the cell were collected, at resolution of 1.024/1.024 pixels. Three-dimensional reconstruction of all the z stacks was achieved using the 3D-volume rendering of IMARIS software (Bitplane). Representative 2D images generated from 3D volume rendering were used for fluorescence quantification using the Integrated Density measurement tool of ImageJ 2.0.0 software (post-acquisition analysis).

Super-Resolution Microscopy

For super-resolution microscopy, images were acquired on a spinning disk system (Roper Scientific France) based on an inverted microscope (Ti-E, Nikon) equipped with a sCMOS camera (Prime 95B, Photometrics), a confocal spinning head (X1, Yokogawa), a 100x 1.4 NA Plan Apo objective lens and a super-resolution module (Gatca systems) based on optical photon reassignment with online processing. Multi-dimensional acquisitions were performed in streaming mode using Metamorph 7.7.6 software (Molecular Devices, France).

Spheroid Clonogenic Assay

H1299 transduced with MTS-MDM2-C464A or control lentiviruses (100 cells per well) were seeded in low attachment multi-well plates and cultured in MEBM (B27 1X, 20 ng/mL EGF, 20 ng/mL bFGF, 4 μg/mL heparin). Spheroids were counted 7 days after seeding.

3D Tumor Spheroid Invasion Assay

H1299 transduced with MTS-MDM2-C464A or control lentiviruses (20,000 cells per well) were seeded into ultra-low attachment (ULA) 96-well round bottom plates. 24 hr later, spheroid formation was visually confirmed before starting the 3D invasion assay. Briefly, 100 μL of matrigel (100 μg/mL) were gently dispensed into the U-bottom wells, followed by centrifugation of the plate (at 300 g for 3 min at 4°C) to ensure central localization of spheroids in each well. Plates were then transferred to 37°C to allow matrigel solidification. 1 hr later, complete growth medium was added and spheroids maintained in culture for 5 days. Plates were scanned and analyzed by Celigo Imaging Cell Cytometer (Nexcelom Bioscience).

Invasion Assay in Boyden Chamber

H1299 cells transduced with MTS-MDM2-C464A or control lentiviruses were cultured in FBS-free DMEM for 16 hr and then seeded in a Matrigel-coated Boyden Chamber with 8 μm pore polyester membrane. 500 μL of DMEM 10% FBS were added in the lower part of the chamber as chemoattractant. After 16 hr, the migrating cells were stained with crystal violet and their number estimated by using a MTT colorimetric assay.

In Vivo Xenografts

Bilateral subcutaneous injections of 8×10^6 H1299 cells were carried out on 8-week-old Hsd: AthymicNude-Foxn1^{nu} mice (Envigo). Volumetric measurements of engrafted 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 = 1000 mm³).

2D Clonogenic Assay

5000 H1299 cells transduced with MTS-MDM2 or control lentiviruses were seeded in 10 cm plates and maintained in DMEM 10% FBS. 8 days later, cells were fixed in PFA and stained with crystal violet for 2 hr. Microphotographs of representative clones were taken by bright field microscopy.

2D Cell Migration Assay

Matrigel-coated Ibidi HiQ4 chambers were used for video microscopy of H1299 cells transduced with a lentivirus encoding MTS-MDM2-C464A (MTS) or with an empty control (CTR) lentivirus. Images were acquired in a Nikon Biostation IM-Q (20x objective) every 15 min for 7 hr. Videos were analyzed using the Fiji “manual tracking” plug-in. Displacement (Euclidean distance between the first and

last time points) and persistence (ratio of displacement over the total distance traveled) were calculated for 100 randomly selected cells.

Histological Analyses

Muscle biopsies were fixed in 4% (vol/vol) neutral-buffered formalin (VWR Chemicals) for 24 hr. Paraffin-embedded tissues were then sectioned (4 μm) and processed for Hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Running Tests

Mice were first trained to run on a treadmill (Colombus Instruments) for 2 sessions (around 15 min/session at constant speed of 10 m/min with no slope). 72 hr later, their maximal aerobic velocity (MAV) was determined by gradually increasing speed (1 m/min increment every 60 s), starting from 10 m/min until exhaustion. For tests performed under mild hypoxic conditions (simulating an altitude of 3000 m), running performances were evaluated in a chamber mimicking moderate hypobaric (-0.3 bars) hypoxia (15% O_2) after an acclimatization of 3 hr.

Atomic Force Microscopy

The mtDNA construct used for the localization of MDM2 via AFM was prepared by PCR as described (Uchida et al., 2017) and was a fragment of mtDNA that began 510 bp downstream of LSP and 1000 bp downstream of HSP1 (Sequence of primers used can be provided upon request). The concentration of mtDNA and of the control pUC18 DNA used for the experiments was 0.5 nM; the MDM2 protein concentration was 10 nM. The experiment was conducted by end-labeling the biotin-tagged mtDNA or pUC18 constructs (via biotinylated primers) via adding 20 nM streptavidin (Sigma-Aldrich) to the DNA solution for 5 min in 25 mM NaCl, 25 mM HEPES, 10 mM MgCl_2 at pH 7.5. Subsequently, MDM2 was added and incubated for 5 min. The solution was deposited on a freshly cleaved mica surface, washed with MilliQ- water after 10 min and gently dried under a stream of nitrogen. For AFM imaging in air we used a Bruker Bioscope Resolve (Bruker) with PeakForce Tapping mode. Olympus OMCL-AC160TS probes ($f = 300$ kHz, $k = 26$ N/m) were used for topographical imaging of the DNA-protein complexes. The scan range was varied from $1 \times 1 \mu\text{m}$ to $3 \times 3 \mu\text{m}$ at 512×512 pixels. 200 DNA segments bound by MDM2 were exported with Nanoscope analysis (Bruker) and Gwyddion (<http://gwyddion.net/>) and further traced and analyzed with FiberApp software.

In Vitro Transcription Assays

Reactions were performed essentially as previously described (Uchida et al., 2017). Briefly, reactions were performed in $1 \times$ reaction buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM TCEP and 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA) with 10 μM ^{32}P -end-labeled RNA primer (pAAA), 500 μM NTPs and 100 nM DNA template. Reactions were performed by incubating template DNA in reaction buffer at 32°C for 5 min and then adding in the following order: MDM2 (0 to 1 μM), TFAM (0.1 or 0.5 μM), TFB2M (0.1 μM) and POLRMT (0.1 μM). Between each addition of protein to the reaction there was an incubation time of 2 min. After addition of POLRMT, the reaction was allowed to incubate at 32°C for 30 min. At each time point 5 μL of the reaction mix were quenched into 5 μL of stop buffer (79.2% formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol and 50 mM EDTA final). Products were resolved by denaturing 20% (37:3, acrylamide:bis-acrylamide ratio) PAGE. Proteins were diluted immediately prior to use in 10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM TCEP, and 20% glycerol. The volume of protein added to any reaction was always less than or equal to one-tenth of the total volume.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Data are expressed as mean \pm SEM. To determine statistical significance between groups, comparisons were made using Student's *t* or non-parametric Mann-Whitney tests. Analyses of multiple groups were performed using a one-way ANOVA test. Data were analyzed with R software. *p* values less than 0.05 were considered significant.

Quantification of immunoblots was performed using the ImageJ software, after densitometric analysis of the corresponding bands detected upon revelation with a peroxidase-coupled secondary antibody.

For super-resolution microscopy, quantification of colocalization was performed by using the Fiji Coloc 2 plugin (Manders' coefficient, with thresholds).

Article :

Targeting MDM2-dependent serine metabolism as a new therapeutic strategy for liposarcoma.

Madi Y. Cissé, Samuel Pyrdziak, Nelly Firmin, Laurie Gayte, Maud Heuillet, Floriant Bellvert, Maryse Fuentes, Hélène Delpech, Romain Riscal, Giuseppe Arena, Frédéric Chibon, Sophie Le Gellec, Aurélie Maran-Gonzalez, Marie-Christine Château, Charles Theillet, Sébastien Carrere, Jean-Charles Portais, Laurent Le Cam, Laetitia K Linares.

Submitted to *Science translational Medecin*.

Introduction :

Les liposarcomes bien diff erenci es et d ediff erenci es (LPS) sont caract eris es par une amplification systématique de l'oncogène *MDM2* qui code pour un régulateur négatif clé de la voie p53. Les mécanismes moléculaires aboutissant à la surexpression de MDM2, tout en conservant une forme sauvage de p53 dans les LPS, restent mal compris. Nous montrons ici que les fonctions métaboliques de MDM2, associ es à la chromatine et indépendantes de p53, sont exacerbées dans les LPS et entraînent une dépendance vis-à-vis du métabolisme de la sérine, favorisant ainsi la synthèse des nucléotides et la croissance tumorale. Le traitement des cellules de LPS avec la Nutlin-3A, un inhibiteur pharmacologique de l'interaction MDM2-p53, stabilise p53 mais promeut de manière inattendue le contrôle du métabolisme de la sérine par le biais de MDM2 en augmentant son recrutement à la chromatine, ce qui explique probablement la faible efficacité clinique de cette classe d'inhibiteurs de MDM2. En revanche, l'inhibition génétique ou pharmacologique de MDM2 (li e à la chromatine), par le SP141 (un dégradeur de MDM2), ou en interférant avec la synthèse *de novo* de sérine, altère la croissance des LPS tant *in vitro* que dans des modèles de xénogreffe d eriv es de tumeurs de patient (PDX). Nos données indiquent que le ciblage des fonctions de MDM2 dans le métabolisme de la sérine représente une stratégie thérapeutique efficace pour les LPS.

Résultats :

L'étude des fonctions métaboliques de MDM2 associé à la chromatine dans la tumorigenèse, m'a poussé à cribler dans un premier temps des lignées cellulaires cancéreuses afin de voir si certains cancers exprimaient de façons basales MDM2 au niveau de la chromatine. Il s'est avéré que les liposarcomes présentent des taux élevés de MDM2 chromatinien, notamment en comparaison avec d'autres types de sarcomes. Le crible d'un TMA de près de 70 échantillons de sarcomes humains a confirmé la présence nucléaire de MDM2 dans les LPS. Grâce à la technologie CrispR/cas9, j'ai établi une lignée de LPS KO pour p53 (IB115 p53 KO) et ainsi pu constater que les niveaux de MDM2 associé à la chromatine étaient inchangés par rapport à la lignée parentale p53 WT, suggérant que le recrutement chromatinien de MDM2 était un processus indépendant de p53.

Par la suite, pour étudier les fonctions de MDM2 associé à la chromatine dans les LPS, j'ai, par l'utilisation de shRNA dirigés contre *MDM2*, mesuré l'expression des gènes cibles de MDM2 après diminution de l'expression de MDM2. Ainsi, nous avons pu confirmer que MDM2 dans les LPS jouait un rôle de régulateur du métabolisme de la sérine. La diminution de l'expression des enzymes de la synthèse *de novo* de sérine (*PHGDH*, *PSAT*, *PSPH*) et des transporteurs membranaires de sérine (*SLC1A4*) a pour conséquence une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* et une diminution de la croissance tumorale *in vivo*. Le même phénotype est observé lors d'une diminution de l'expression de PHGDH, ce qui confirme l'importance de cette voie métabolique pour le développement des LPS. De plus, une déprivation en sérine/glycine associée à la déplétion de MDM2 provoque une diminution encore plus importante de la prolifération tant *in vitro* qu'*in vivo*, soulignant le caractère crucial de cet acide aminé.

La faible efficacité de la nutline pour le traitement des patients atteints de LPS, nous a poussés à essayer de comprendre comment moléculairement ces tumeurs pourtant non mutées pour p53 ne répondaient que si peu à cet inhibiteur de l'interaction MDM2/p53. Nous avons observé *in vitro* qu'en réponse à la Nutlin-3A, les lignées de LPS présentaient une stabilisation de p53 mais aussi une augmentation de l'expression de MDM2. Les niveaux de MDM2 associé à la chromatine étant également fortement augmentés, nous avons pu constater que l'expression des gènes du métabolisme de la sérine l'était aussi. Nous avons donc émis l'hypothèse que paradoxalement les effets secondaires de la nutline sur le contrôle du métabolisme par MDM2 étaient bénéfiques à la croissance des LPS.

C'est pourquoi nous avons tenté d'évaluer les bénéfices d'une molécule induisant la dégradation de MDM2. Le traitement au SP141 a montré qu'avec la perte de MDM2, on induisait une diminution de l'expression des enzymes du métabolisme de la sérine ainsi qu'une rapide mort cellulaire. Des expériences de profilage isotopique avec de la sérine ou du glucose marqué au C13 nous ont également permis de montrer que la perte de MDM2 conduisait à une diminution de l'incorporation du carbone dans la synthèse des nucléotides. Nos données suggèrent que le métabolisme de la sérine

dont la régulation est médiée par MDM2, servirait entre autres à supporter la synthèse des nucléotides afin d'assurer la prolifération cellulaire.

En parallèle de ces observations, il se trouve que le traitement au SP141 induit également des dommages à l'ADN. Par l'utilisation de différents agents inhibant la mort cellulaire, nous avons montré qu'une forme de mort cellulaire non caspase dépendante, appelée parthanatose, soit en partie impliquée dans la mort induite par le SP141. Cette mort cellulaire qui se manifeste généralement en réponse à des dommages à l'ADN, est parfois qualifiée de mort métabolique, puisqu'elle fait intervenir une cascade de signalisation entre la mitochondrie et le noyau cellulaire.

L'utilisation d'un mutant de MDM2 (MDM2 Δ AD-C464A) possédant une délétion de son domaine acide (Δ AD, induisant de ce fait sa translocation à la chromatine) ainsi qu'une délétion dans son domaine E3 ligase (C464A, l'empêchant ainsi de s'auto-ubiquitinyler), nous a permis de montrer, d'une part, que le SP141 était spécifique de la dégradation de MDM2, et d'autre part, que la fraction chromatiniennne de MDM2 était essentielle au développement des LPS. En effet, lorsque ce mutant est sur-exprimé dans des lignées cellulaires de LPS, il empêche quasiment totalement la mort induite par le SP141.

Dans le but d'évaluer le potentiel clinique du SP141, nous avons traité avec ce composé des souris nudes xenogreffées avec des lignées cellulaires de LPS ou portant des tumeurs dérivées de patients (PDX) et ainsi pu constater que la croissance tumorale des LPS était fortement diminuée en réponse au SP141. De plus, les tumeurs sur-exprimant le mutant MDM2 Δ AD-C464A, se trouvent être insensibles au SP141, confirmant ainsi la notion selon laquelle le ciblage de MDM2 associé à la chromatine semble être une bonne stratégie thérapeutique pour le LPS.

Conclusion :

Ces dernières années, les recherches du laboratoire ont permis d'améliorer nos connaissances sur le fonctionnement de l'oncogène MDM2. Mon projet de thèse qui s'appuie sur ces découvertes, a permis de montrer que le contrôle du métabolisme par la fraction chromatiniennne de MDM2, contribuait à la tumorigenèse du Liposarcome et pouvait ainsi être considéré comme une cible thérapeutique d'intérêt.

Targeting MDM2-dependent serine metabolism as a new therapeutic strategy for liposarcoma

Madi Y. Cissé^{1,2}, Samuel Pyrdziak^{1,2*}, Nelly Firmin^{3*}, Laurie Gayte^{1,2}, Maud Heuillet^{4,5}, Floriant Bellvert^{4,5}, Maryse Fuentes^{1,2}, Delpech Hélène^{1,2}, Romain Riscal^{1,2}, Giuseppe Arena^{1,2}, Frédéric Chibon⁷, Sophie Le Gellec^{7,8}, Aurélie Maran-Gonzalez³, Marie-Christine Chateau³, Charles Theillet^{1,2}, Sébastien Carrere³, Jean-Charles Portais^{4,5,6}, Laurent Le Cam^{1,2,9*}, Laetitia K Linares^{1,2,9*}

¹Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, Université de Montpellier, Institut Régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

²Equipe Labélisée par la Ligue contre le Cancer

³Institut régional du Cancer Montpellier, Montpellier, France

⁴LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France.

⁵MetaToul-MetaboHUB, National Infrastructure of Metabolomics and Fluxomics, Toulouse, 31077, France

⁶ Université Paul Sabatier, Université de Toulouse, Toulouse, 31062, France

⁷ INSERM UMR 1037, CRCT, Université Paul Sabatier Toulouse-III, Toulouse, France

⁸ Department of Pathology, Institut Claudius Regaud, IUCT-Oncopole, Toulouse, France

⁹ *Correspondance: laetitia.linares@inserm.fr (L.K.L) and laurent.lecam@inserm.fr (L.L.C.)*

**equally contributed to this work.*

The authors declare no potential conflicts of interest.

Abstract

Well-differentiated and de-differentiated liposarcomas (LPS) are characterized by a systematic amplification of the *MDM2* oncogene that encodes a key negative regulator of the p53 pathway. The molecular mechanisms underlying MDM2 overexpression, but sparing wild-type p53, in LPS remain poorly understood. Here, we show that the p53-independent metabolic functions of chromatin-bound MDM2 are exacerbated in LPS and mediate an addiction to serine metabolism that sustains nucleotide synthesis and tumor growth. Treatment of LPS cells with Nutlin-3A, a pharmacological inhibitor of the MDM2-p53 interaction, stabilized p53 but unexpectedly enhanced MDM2-mediated control of serine metabolism by increasing its recruitment to chromatin, likely explaining the poor clinical efficacy of this class of MDM2 inhibitors. In contrast, genetic or pharmacological inhibition of chromatin-bound MDM2 by SP141, a distinct MDM2 inhibitor triggering its degradation, or interfering with *de novo* serine synthesis, impaired LPS growth both *in vitro* and in clinically-relevant Patient-Derived Xenograft models. Our data indicate that targeting MDM2 functions in serine metabolism represents an efficient therapeutic strategy for LPS.

Significance

Our data provide molecular evidence explaining the poor therapeutic response of LPS patients to Nutlin-3A and define new therapeutic strategies for LPS based on MDM2 metabolic functions.

Introduction

Sarcomas, which represent about 1% of all cancers, are malignant tumors of mesenchymal origin that develop from soft or bone tissues. Among the 100 different histological subtypes of sarcomas, liposarcomas (LPS) represent the second most frequent subtype after gastrointestinal stromal tumors (GIST), accounting for 15-20% of all sarcomas. The prognosis of LPS is very heterogeneous and depends on the tumor location, the histological subtype, and the grade/size of the tumor at diagnosis (1). The risk of recurrence and metastatic dissemination of advanced LPS vary between 20 to 40% in case of localized tumors, and depend mainly on the quality of their surgical resection, which remains the most efficient therapeutic strategy to date. LPS are poorly responsive to classical chemotherapies and, despite new-targeted therapies based on the tyrosine kinase inhibitor Pazopanib have demonstrated efficacy in patients with several types of sarcomas, they provide no benefit to patients with LPS (2). Moreover, there is currently no cure available for metastatic or non-resectable LPS, and the median overall survival is around 15 months after diagnosis for these patients. Hence, finding new therapeutic strategies for LPS is urgently needed.

The most common LPS subtypes, well-differentiated and dedifferentiated LPS (WD-LPS and DD-LPS, respectively), are characterized by the systematic amplification (nearly 100% of cases) of the q13-15 region of chromosome 12 encompassing the *MDM2* oncogene that encodes a well-characterized negative regulator of the p53 tumor suppressor. *MDM2* amplification is currently used as a diagnostic biomarker to distinguish WD/DD-LPS from other sarcoma subtypes that more commonly harbor p53 mutations (3–8). However, the molecular mechanisms underlying the systematic amplification of *MDM2* in LPS remain completely unknown.

The oncogenic function of *MDM2* has been, so far, mainly attributed to its ubiquitin E3 ligase activity that targets p53 for proteasomal degradation (9,10,11). However, growing evidence

indicates that its oncogenic activities extend beyond the regulation of p53. Consistent with this notion, some human tumors harbor both MDM2 overexpression and p53 mutations, and MDM2 overexpressing mice in a p53 null background exhibit an increased incidence of sarcomas relative to p53 knock-out (KO) mice (12–14). At the molecular level, MDM2 is involved in a complex network of protein-protein interactions that bestow MDM2 with p53-independent functions that can contribute to oncogenesis (15,16). Thus, MDM2-mediated ubiquitylation of other targets including ATFs, FOXOs, Histones H2A and H2B, RB, E2F1 and SMADs can influence cell proliferation, DNA repair, transcription, ribosome biosynthesis, and cell fate (17–19). Moreover, chromatin-associated MDM2 influences transcriptional repression of genes involved in cell identity and pluripotency through its direct interaction with the polycomb repressor complex 2 (PRC2) (19,20). MDM2 can also have a cell survival function, independently of p53, by interacting with proteins involved in DNA repair (15,21). In addition, we recently characterized an additional function of the MDM2 protein, independent of p53 and of its ubiquitin E3 ligase activity, that plays a key role in serine metabolism (22). We found that chromatin-bound MDM2 controls the transcription of genes implicated in *de novo* serine synthesis, amino-acid transport and glutathione metabolism. These results suggest that the role of the p53 pathway in serine metabolism that was originally attributed to p53 is, at least in part, directly regulated by MDM2 (23). Here, we show that MDM2-associated functions in serine metabolism are exacerbated in LPS cells, rendering these cells highly sensitive to pharmacological manipulation of MDM2 protein levels. Hence, our findings open promising therapeutic opportunities for LPS patients.

Results

MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 in LPS cells

To further investigate the importance of MDM2 in LPS, we first analyzed MDM2 localization in human LPS using a Tissue Micro Array (TMA) including 38 samples of DD/WD-LPS and 29 samples of other sarcoma subtypes. Immunohistochemical (IHC) analysis of MDM2 subcellular localization in these samples indicated that MDM2 predominantly localized in the nucleus of DD/WD-LPS cells whereas it presented a weaker and more cytoplasmic expression pattern in other sarcomas (Fig.1A-B and supplementary Fig.1A). Immunofluorescence (IF) analysis of MDM2 localization in a panel of 6 cell lines representing different sarcoma subtypes that were cultured in similar conditions showed that MDM2 was nuclear in 60 to 95% of DD-LPS cells, whereas it exhibited a more cytoplasmic localization in other sarcoma subtypes (Fig.1C-D). The nuclear localization of MDM2 in WD/DD-LPS cells prompted us to evaluate whether nuclear-MDM2 associated to chromatin. Chromatin fractionation assays performed on these 6 sarcoma cell lines indicated that approximately 50% of endogenous MDM2 was detected in the fraction enriched in chromatin-bound proteins in LPS cells, whereas no more than 5% of total MDM2 was detected in the chromatin fraction prepared from cell lines originating from other sarcoma subtypes (Fig.1E-F and supplementary Fig.1B). Furthermore, high levels of endogenous chromatin-bound MDM2 were detected in primary naive tumor samples of human WD/DD-LPS, ranging from 60 to 95% of total MDM2, whereas MDM2 was mainly present in the fraction containing cyto/nucleosoluble proteins in other sarcoma subtypes (Fig. 1G-H). Strikingly, MDM2 was similarly detected in the nucleus of parental IB115 cells and in several independent clones derived from this DD-LPS cell line in which *TP53* was genetically inactivated by the CrispR/Cas9 gene-editing technology, indicating that MDM2 localized to the nucleus independently of p53 in LPS cells (Fig. 1I-J and supplementary Fig.1C-D). Moreover, and consistent with our previous data showing that MDM2 is recruited to

chromatin independently of p53, the levels of chromatin-bound MDM2 were identical in p53-proficient and in p53-deficient IB115 cells (Fig. 1K-L).

Altogether, these data indicate that MDM2 exhibits a specific subcellular localization and is recruited to chromatin independently of p53 in human DD-LPS.

MDM2 is a master regulator of serine metabolism in LPS

We previously showed that MDM2 regulates a transcriptional program implicated in *de novo* serine synthesis and serine transport (22). To further investigate the role of chromatin-bound MDM2 in LPS, we examined the expression levels of several MDM2-direct target genes involved in serine metabolism upon shRNA-mediated depletion of endogenous MDM2, including 3- *phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH)*, *phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1)*, and *phosphoserine phosphatase (PSPH)*, 3 genes encoding enzymes involved in *de novo* serine synthesis, and of *Solute carrier family 1 member 4 (SLC1A4)*, a gene encoding a neutral amino-acid transporter implicated in serine uptake. Of note, to distinguish between p53 -dependent and -independent functions of MDM2 in LPS cells, we performed experiments in parallel in parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells. The mRNA levels of *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and *SLC1A4* decreased in LPS cells expressing two independent shRNAs targeting *MDM2* (Fig. 2A and supplementary Fig. 2A). Immunoblotting of total protein extracts prepared from these cells showed that MDM2 depletion impacted on the protein levels of PHGDH, PSAT1, PSPH and SLC1A4 (Fig. 2B and supplementary Fig. 2B-C). Because previous reports showed that some cancer cells are highly dependent on the non-essential amino-acids serine and glycine for proliferation, we hypothesized that interfering with MDM2-mediated regulation of serine/glycine metabolism in LPS cells would influence their growth (24–27). Regardless of their p53 status, the expansion of IB115 DD-LPS cells *in vitro* was impacted upon MDM2-depletion, an effect that was further increased when these cells were cultured in a serine and glycine-deprived (-Ser/Gly) medium (Fig. 2C

and supplementary Fig. 2D). The importance of serine/glycine metabolism in LPS was confirmed in cultured p53-KO IB115 cells in which *PHGDH* was silenced by shRNA (Fig. 2D and supplementary Fig. 2E).

Next, we evaluated the importance of MDM2-mediated control of serine/glycine metabolism on tumor growth *in vivo*. To answer this question, IB115 DD-LPS cells stably expressing p53-shRNA together with a control or MDM2 shRNAs were subcutaneously injected in nude mice under normal chow or fed a serine and glycine-deprived diet (-Ser/Gly) of equivalent caloric value and equal content in total amino acids. Strikingly, the decreased availability of exogenous serine and glycine combined with the depletion of endogenous MDM2 in LPS cells synergistically impacted on tumor growth (Fig. 2E and supplementary Fig. 2F-G). Moreover, interfering with endogenous PHGDH also impaired LPS tumorigenic potential, an effect that was further increased in mice fed with a -Ser/Gly diet (Fig. 2F and supplementary Fig. 2H). Hence, these data indicate that MDM2-mediated control of serine/glycine metabolism is a driving event that sustains tumor growth of LPS.

Nutlin3A treatment enhances MDM2-associated metabolic functions in LPS cells

The ubiquitin E3 ligase activity of MDM2 for p53 has been the rationale for the clinical use of compounds, such as Nutlins, that interfere with MDM2-p53 protein interaction and reactivate p53 tumor suppressor functions in tumors harboring WT-p53 (28–31). Unfortunately, most clinical trials performed with this class of pharmacological inhibitors have demonstrated poor, if any, therapeutic benefit for LPS patients (28). As in all other cell types harboring WT-p53, p53 was rapidly stabilized in a panel of LPS cells in response to Nutlin-3A treatment (Fig. 3A and supplementary Fig. 3A). Nutlin3A also increased the mRNA and total protein levels of MDM2, likely as a result of the induction of the well-described p53-MDM2 positive feedback loop (Fig. 3A-B). Strikingly, the levels of chromatin-bound MDM2

strongly increased in 2 distinct Nutlin-treated LPS cell lines (Fig. 3C), an effect that correlated with increased mRNA and protein levels of MDM2-target genes involved in serine/glycine metabolism (Fig. 3D,E). Our data indicate that Nutlin3A stabilizes the levels of chromatin-bound MDM2 and potentiates its p53-independent functions in serine/glycine metabolism.

The pharmacological inhibitor SP141 inhibits MDM2-associated functions in serine metabolism and impacts on nucleotide biosynthesis in LPS cells

Our data indicate that small compounds such as Nutlins that interfere with MDM2-p53 interaction but stabilize MDM2 have modest impact on LPS growth (data not shown), likely as a consequence of its effect on MDM2-associated metabolic functions. In order to circumvent the limitations of Nutlins, we evaluated the effect of SP141, the lead compound of a class of pyrido-indol molecules that trigger MDM2 self-ubiquitylation and proteasomal degradation (32). As expected, treatment of IB115 DD-LPS cells with SP141 led to a strong decrease of MDM2 protein levels (Fig. 4A and supplementary Fig. 4A).

Consequently, the mRNA and protein levels of the MDM2-target genes *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and *SLC1A4* decreased in both parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells upon treatment with SP141 (Fig. 4A-B and supplementary Fig. 4A-B).

To further investigate the role of MDM2-mediated regulation of serine metabolism in LPS cells, we next performed stable isotope tracing experiments to determine the metabolic fate of exogenous serine or glucose. First, we incubated mock- or *SP141*- treated parental or p53-KO IB115 DD-LPS cells with uniformly labelled [U-¹³C] serine 24 hours before harvesting these cells for analysis of ¹³C-labelled intracellular metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Fig. 4C). The global ¹³C-enrichment in the purine nucleotides adenosine and guanosine triphosphates (ATP and GTP, respectively), and their mono/diphosphate precursors (AMP/ADP and GMP/GDP), was greatly reduced

both in parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells upon treatment with SP141 (Fig. 4D). Quantitative analysis of mass isotopologue distribution (MID) indicated a reduction of the different ^{13}C -labelled isotopologues of AMP, ADP, ATP, GMP, GDP and GTP that derive from serine/glycine metabolism and the folate pathway (m+1 to m+4) (Fig. 4E). The impact of SP141 on serine metabolism was then corroborated by stable isotope tracing experiments using uniformly labelled $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose performed in parental IB115 DD-LPS cells cultured in a serine and glycine-deprived medium. These analyses showed that m+6 to m+9 isotopologues of purines, which are generated upon incorporation of glucose-derived serine and glycine into the purine ring, were less abundant in SP141-treated cells than in control cells (Fig. 4F). Similar observations were made in parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells upon shRNA-mediated depletion of endogenous MDM2, indicating that pharmacological as well as genetic inhibition of MDM2 impinged on purines synthesis through deregulation of serine/glycine metabolism (supplementary Fig. 4C-F). Interestingly, the *de novo* serine synthesis pathway has recently been shown to coordinate purines and pyrimidines biosynthesis by maintaining proper mass balance within central carbon metabolism (33). To evaluate whether such mechanism contributed to the metabolic defects observed in MDM2-deficient LPS cells, we evaluated the incorporation of glucose-derived carbons in aspartate, an amino-acid that contributes to the pyrimidine ring. Consistent with this hypothesis, ^{13}C -enrichment in aspartate in parental IB115 DD-LPS cells decreased upon SP141 treatment (Fig. 4G). Moreover, in these cells, the global ^{13}C -enrichment in pyrimidines was strongly downregulated upon MDM2 inhibition by SP141 (Fig. 4H). Importantly, similar effects were also observed upon shRNA-mediated depletion of MDM2 (supplementary Fig. 4G-H). Altogether, these data indicate that pharmacological and genetic inhibition of MDM2 impairs *de novo* serine synthesis and impacts on nucleotide metabolism in LPS cells.

MDM2 depletion by SP141 induces cell death by parthanatos

To further delineate the role of MDM2 in LPS cells, we next examined cell viability and the cell-cycle profile of IB115 DD-LPS cells upon treatment with SP141. SP141 drastically impaired the growth of parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells (supplementary Fig. 5A). We observed a rapid loss of cell viability of IB115 LPS cells as soon as 24 hours after treatment with 2 μ M of SP141 (Fig. 5A). Of note, this effect was observed both in parental and in p53-KO ID115 DD-LPS cells, indicating that this effect of SP141 was mainly p53-independent (Fig. 5A and supplementary Fig. 5A). The strong efficacy of SP141 on the growth of LPS cells was confirmed on a panel of 10 different DD-LPS cell lines. Interestingly, the IC₅₀ of SP141 was significantly lower in LPS cells than in cell lines isolated from other sarcoma subtypes, ranging from 200nM to 3,2 μ M and from 5 to 40 μ M, respectively (Fig. 5B). Moreover, the enhanced sensitivity of DD-LPS cells to SP141 compared to other sarcoma subtypes was also confirmed when these cells were cultured in anchorage-independent conditions. Thus, massive cell death was evidenced in spheroids generated from both p53-proficient or p53-deficient IB115 DD-LPS cells upon treatment with SP141, but not in spheroids generated from cells originating from other sarcoma subtypes (Fig. 5C and supplementary Fig. 5B). ShRNAs directed against *MDM2* or *PHGDH* also impacted cell viability of IB115 DD-LPS cells cultured in 3D conditions, irrespectively of their p53 status, suggesting that the impact of MDM2 inhibition on cell survival of LPS cells resulted from impaired serine metabolism that occurred independently of p53 (Fig. 5D and supplementary Fig. 5C). To demonstrate that the impact of SP141 on LPS cells was linked to the inhibition of chromatin-bound MDM2 rather than off-targets effects, we transduced p53-KO IB115 cells with lentiviral particles encoding a previously-characterized MDM2 mutant (Δ AD-C464A) that predominantly localizes to chromatin due to the deletion of its central acidic domain and harbors a mutation in its E3 ligase domain (C464A) that confers resistance to SP141 by abolishing its auto-ubiquitylation (34). Stable expression of MDM2 Δ AD-C464A

rescued the cell viability and the expansion of p53-KO IB115 DD-LPS cells under SP141 treatment, as well as the expression of MDM2-target genes implicated in serine metabolism (Fig. 5E-F and supplementary Fig. 5D-E). Hence, these data demonstrate that the strong impact of SP141 on the growth of LPS cells mainly results from inhibition of chromatin-bound MDM2.

Next, we evaluated whether the impairment of serine metabolism and nucleotide synthesis observed upon MDM2 inhibition in LPS cells contributed to their growth defects. Consistent with this hypothesis, addition of a mix of nucleosides in the culture medium partly rescued the viability of SP141-treated p53-KO IB115 DD-LPS cells (Fig. 5G). Since depletion of nucleotide pools is known to induce replication stress and DNA damage, we then evaluated whether MDM2-depleted LPS cells displayed evidences of DNA damage. Increased phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γ H2AX), a hallmark of DNA damage (35), was detected by immunoblotting and immunofluorescence as soon as 12h after treatment of LPS cells with a low dose (0,5 μ M) of SP141 (Fig. 5H and supplementary Fig. 5F). Consistent with these findings, LPS cells exhibited an altered cell cycle profile with cells accumulating in the S and G2 phases of the cell cycle upon pharmacological inhibition of MDM2 (Fig. 5I and supplementary Fig. 5G).

These data suggested that perturbations of chromatin-bound MDM2 upon SP141 treatment led to nucleotide biosynthesis and replication defects that ultimately turned on a cell death program. In an attempt to identify the cell death pathway activated after MDM2 inhibition, we used several drugs that interfere with different cell death programs, including the apoptosis inhibitor ZVAD, the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1, and the PARP1 inhibitor PJ34 (36). Ferrostatin-1 treatment failed to rescue SP141-induced LPS cell death. Addition of ZVAD partly rescued the viability of SP141-treated IB115 DD-LPS cells, as well as PARP inhibition by PJ34. Similar effects were obtained both in parental and p53-KO IB115 DD-LPS cells, indicating that this cell death program occurred independently of p53 (Fig. 5J and

supplementary Fig. 5H). Interestingly, depletion of nucleotide pools has been shown to induce parthanatos, an atypical cell death program mediated by PARP and AIF1 (37). In line with the induction of parthanatos by SP141-mediated inhibition of MDM2, PARP activity and cytosolic release of AIF from mitochondria increased upon SP141 treatment (Fig. 5K and supplementary Fig. 5I). Moreover, addition of DPI, a pharmacological inhibitor of AIF1, reduced cell death to a comparable extent than PJ34 (Fig. 5J) (38).

Taken together, our results show that MDM2 inhibition by SP141 affects nucleotide synthesis in LPS cells, resulting in DNA damage and subsequently cell death by parthanatos.

Targeting MDM2-associated metabolic functions as a new therapeutic strategy for LPS

To evaluate the clinical relevance of our findings and the applicability of therapeutic strategies aiming at targeting MDM2-associated metabolic activities, we compared the *in vivo* efficacy of SP141 and doxorubicin, a chemotherapy used as a first line treatment for primary LPS, in a xenograft model in which IB115 DD-LPS cells were subcutaneously injected in nude mice. When tumors reached 150mm³, xenografted mice were treated with SP141 (40mg/kg, daily) or doxorubicin (2mg/kg, 2 times per week) and tumor growth was followed over a period of 3 weeks. SP141 treatment strongly impacted on tumor growth, whereas doxorubicin had a modest, yet not statistically significant, effect in this xenograft model (Fig. 6A and supplementary Fig. 6A). Importantly, in contrast to doxorubicin, a 3-week-treatment with SP141 did not result in obvious side effects in this xenograft model, as illustrated by the lack of weight loss or major histological defects in peripheral tissues (supplementary Fig. 6B-C). The same SP141-regimen resulted in similar anti-tumor effects in xenograft models generated with 4 independent DD-LPS cell lines, including p53-depleted

IB115 cells (Fig. 6B-C and supplementary Fig. 6D). Consistent with the role of MDM2 in serine metabolism, immunoblotting analysis of total protein extracts prepared from control- or SP141- treated tumors showed that MDM2 inhibition *in vivo* led to the decreased expression of PHGDH and PSAT1 (Fig. 6D).

To confirm that the effects observed upon SP141 treatment resulted from inhibition of chromatin-bound MDM2, we next measured tumor growth upon injection of IB115 DD-LPS cells that stably expressed the MDM2 Δ AD-MDM2-C464A mutant. Consistent with our *in vitro* data, tumors generated with these cells grew as efficiently as control tumors despite the daily administration of SP141 and exhibited mRNA levels of MDM2-target genes implicated in serine metabolism comparable to those measured in control cells (Fig. 6E-G and supplementary Fig. 6E). These results show that inhibition of chromatin-bound MDM2 by SP141 influences serine metabolism *in vivo* and efficiently decreases tumor growth. Finally, to confirm the effect of MDM2 inhibition in clinically-relevant murine models of human LPS, we developed several patient-derived tumor xenograft (PDX) models generated upon the rapid transfer of freshly resected human tumor samples of primary naive LPS and other sarcoma subtypes into immunodeficient nude mice. In these pre-clinical models, administration of SP141 efficiently decreased tumor growth in 3 independent DD-LPS PDX models, whereas it had no significant effect on 2 different PDXs originating from other sarcoma subtypes (Fig. 6H-I and supplementary Fig. 6F-G). These data support the notion that pharmacological inhibition of MDM2 by SP141 is a suitable strategy to treat LPS.

Discussion

WD- and DD- LPS, the most frequent LPS subtypes, are known to be poorly responsive to classical chemotherapies and there is currently no cure available for metastatic or non-resectable LPS. The first line treatment for LPS patients is high doses of doxorubicin, despite it provides limited clinical benefit and commonly results in severe side effects. Hence, finding new therapeutic strategies for LPS remains an urgent clinical challenge. The specific genetic signature of WD/DD-LPS, that harbor WT-p53 but are characterized by a systematic amplification of *MDM2*, has been the scientific rationale for the clinical evaluation of compounds that disrupt MDM2-p53 interaction, hoping that these molecules would unleash p53-associated tumor suppressor activities. Inhibition of MDM2-p53 interaction by Nutlins, a class of pharmacological compounds that bind to a well-defined hydrophobic pocket of MDM2 involved in p53 binding, results in the accumulation of active p53 and leads to cell cycle arrest or cell death in most p53-proficient tumor cells *in vitro* (39). Unfortunately, clinical data showed that compounds of the Nutlin family, have little, if any, efficacy in LPS and lead to drug resistance mainly attributed to p53 mutations (28). Our data suggest that the poor clinical response of LPS to Nutlins likely reflects the paradoxical stabilization of MDM2 that stems from p53-mediated activation of *MDM2* transcription during Nutlin3A treatment. Moreover, we show that Nutlin3A increases the level of chromatin-bound MDM2 in LPS cells and promotes the expression of its target genes implicated in amino-acid metabolism, a process that may further enhance its pro-oncogenic activities. Thus, as exemplified by Nutlins, therapies aiming at interfering with MDM2-p53 interaction but resulting in MDM2 stabilization are likely to provide a poor clinical response. In contrast, we provide strong genetic and pharmacological evidence that targeting MDM2-associated metabolic functions represents an efficient alternative strategy for LPS. In that context, MDM2 degraders, such as SP141, should be considered as a new strategy for targeting p53-independent metabolic functions of MDM2 that should synergize with p53-mediated

effects. It is noteworthy that LPS are more sensitive than other sarcoma subtypes to pharmacological inhibition of MDM2 by SP141 due to the strong addiction of WD/DD-LPS cells to *MDM2*. Further work will be required to evaluate the efficacy of this MDM2 inhibitor in other cancer types harboring *MDM2* amplification.

Metabolic rewiring is considered a hallmark of cancer cells and many oncogenes or tumor suppressors control multiple metabolic pathways (40). Among those, the p53 protein has been shown to be a central regulator of metabolism. Interestingly, MDM2 also plays important roles in cellular metabolism independently of p53, by regulating serine metabolism, the folate cycle, redox homeostasis, mitochondria functions and respiration (22,34,41–43). The importance of serine/glycine metabolism in LPS has not been documented yet. Other metabolic pathways have been suggested to contribute to LPS development, including the nucleoside salvage pathway and *de novo* long-chain fatty acid synthesis (44,45). Here, we demonstrate that interfering with MDM2-mediated control of serine/glycine metabolism, or inhibiting *PHGDH*, have strong anti-cancer effects both *in vitro* and in clinically-relevant pre-clinical mouse models of LPS. Moreover, our observation showing that these effects can be further increased in conditions where an exogenous source of serine and glycine is limited raises important questions about the potential interest of serine and glycine-poor diets that could exacerbate the effects of pharmacological inhibitors of this metabolic pathway.

Serine/glycine metabolism supports the growth of cancer cells by contributing to their anabolic demands and their epigenome as well as by regulating their redox state (25). Strikingly, we found that MDM2 controls serine/glycine metabolism and sustain LPS growth by promoting *de novo* nucleotide synthesis. Our results indicate that interfering with MDM2 functions in purine and pyrimidine synthesis compromises the proliferative and survival capacities of LPS cells, thereby impinging on their tumorigenic potential. Our findings are intriguing in light of a previous report showing that high-grade LPS cells exhibit an

upregulation of the nucleoside salvage pathway as a consequence of increased deoxycytidine kinase activity (45). Hence, these data suggest that LPS cells utilize in a non-mutually exclusive manner several metabolic pathways to sustain their high demand in nucleotides, a notion that is consistent with their high proliferative rate and rapid growth in patients. Validation of this hypothesis will require further investigations but these results open new avenues for combinatorial therapies based on MDM2 inhibitors and the nucleoside analogue gemcitabine.

Interestingly, we show that pharmacological inhibition of MDM2 by SP141 induces a specific cell death program by parthanatos in LPS cells. Parthanatos is described as a unique, caspase-independent, cell-death pathway that is distinct from apoptosis, necrosis or other identified forms of regulated cell death (46). Toxic stimuli that induce parthanatos activate nuclear PARP-1 excessively, causing the accumulation of poly(ADP-ribosyl)ated proteins in mitochondria, the translocation of AIF from the mitochondria to the nucleus where it induces large-scale DNA fragmentation and ultimately leads to cell death. Parthanatos can be triggered by multiple cues, including severe DNA damage and oxidative stress. Although we identified massive DNA damage in SP141-treated LPS cells, we do not exclude the possibility that other defects, such as increased production of Reactive Oxygen Species (ROS), also contributed to the induction of parthanatos, and likely other forms of cell death, in these cells. Although parthanatos has been mainly reported so far to contribute to cardiovascular and renal disorders, diabetes and neurological diseases, our data suggest that strategies aiming at triggering parthanatos is a suitable strategy for certain cancer types, in particular in cancers harboring MDM2 overexpression.

Altogether, our data showing that the control of cellular metabolism by chromatin-bound MDM2 is an important driver of liposarcomagenesis pave the way for new strategies for this cancer type for which there is currently little therapeutic options.

Methods

IC50 measurement

Growth inhibition after SP141 treatment (IC50) was determined using the sulforhodamine B (SRB) assay. Briefly, cells were seeded in 96-well plates (5 000 cells per well) in complete medium for assays in triplicates. 24 hrs later, serial dilutions of the indicated compounds were added to the cells. After 48 hours, cells were fixed by adding a trichloroacetic acid solution (10% final) and stained with a 0.4% sulforhodamine B solution in 1% acetic acid. Fixed sulforhodamine B was dissolved in 10 mM Tris-HCl solution and absorbance at 560 nm was read using an MRX plate reader.

¹³C Stable isotope tracing experiments

Measurement of ¹³C incorporation in intracellular metabolites upon incubation with ¹³C-labelled glucose or serine was performed as previously described(23). For more details see supplementary informations.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. Statistical significance was evaluated using Student's t tests or non-parametric Mann-Whitney U tests. P values less than 0.05 were considered to be statistically significant. *<0,05 ; 0,01<**<0,001 ; 0,001<***

Authors' Contributions

M.Y.C, L.L.C, L.K.L, designed the studies, interpreted the data and wrote the manuscript; M.Y.C, S.P., L.G, R.R, L.K.L, M.F., M.H, G.A. and F.B performed the experiments; M.Y.C.,

L.G., L.K.L, C.T. and H.D. contributed to the *in vivo* experiments. N.F., S.C. and S.L. assisted with a medical expertise, J.C.P, and F.C. assisted with data interpretation.

Acknowledgments

The authors thank the CRB-ICM (BB-033-0059) and CRB-IUCT for the biological resources supplied for the study. The authors thank M. Lacroix for input and critical reading of the manuscript. We thank all members of the animal, imaging, cytometry, and histology facilities (Unité Mixte de Service, UMS3426 Montpellier BioCampus) for technical help. We thank the Cancéropole GSO for their support for metabolomic analyses. This research was supported by grants from the ARC, the Ligue contre le Cancer (Equipe labellisée 2016), and Montpellier SIRIC. G.A was supported by a fellowship from the Fondation de France. M.Y.C. was supported by a fellowship from the french ministry of research and the FRM foundation.

Supplemental Information consists of Full Methods, Supplementary Figures 1-6.

References

1. Verweij J, Baker LH. Future treatment of soft tissue sarcomas will be driven by histological subtype and molecular aberrations. *Eur J Cancer*. 2010;46:863–8.
2. van der Graaf WTA, Blay J-Y, Chawla SP, Kim D-W, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379:1879–86.
3. Crago AM, Singer S. Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Curr Opin Oncol*. 2011;23:373–8.
4. Ducimetière F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, Decouvelaere A-V, Péoc'h M, Istier L, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PLoS ONE*. 2011;6:e20294.
5. ESMO/European Sarcoma Network Working Group. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii102-112.
6. Italiano A, Garbay D, Cioffi A, Maki RG, Bui B. Advanced pleomorphic liposarcomas: clinical outcome and impact of chemotherapy. *Ann Oncol*. 2012;23:2205–6.
7. Lokka S, Scheel AH, Dango S, Schmitz K, Hesterberg R, Rüschoff J, et al. Challenging dedifferentiated liposarcoma identified by MDM2-amplification, a report of two cases. *BMC Clin Pathol*. 2014;14:36.
8. Mastrangelo G, Coindre J-M, Ducimetière F, Dei Tos AP, Fadda E, Blay J-Y, et al. Incidence of soft tissue sarcoma and beyond: a population-based prospective study in 3 European regions. *Cancer*. 2012;118:5339–48.
9. Marine J-C, Lozano G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ*. 2010;17:93–102.
10. Montes de Oca Luna R, Wagner DS, Lozano G. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*. 1995;378:203–6.
11. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*. 1995;378:206–8.
12. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 1994;54:794–9.
13. Watanabe T, Hotta T, Ichikawa A, Kinoshita T, Nagai H, Uchida T, et al. The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin. *Blood*. 1994;84:3158–65.
14. Jones SN, Hancock AR, Vogel H, Donehower LA, Bradley A. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:15608–12.

15. Bouska A, Eischen CM. Mdm2 affects genome stability independent of p53. *Cancer Res.* 2009;69:1697–701.
16. Léveillard T, Wasylyk B. The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter. *J Biol Chem.* 1997;272:30651–61.
17. Bohlman S, Manfredi JJ. p53-independent effects of Mdm2. *Subcell Biochem.* 2014;85:235–46.
18. Marine J-C, Lozano G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ.* 2010;17:93–102.
19. Wienken M, Dickmanns A, Nemajerova A, Kramer D, Najafova Z, Weiss M, et al. MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of p53. *Mol Cell.* 2016;61:68–83.
20. Klusmann I, Wohlberedt K, Magerhans A, Teloni F, Korbel JO, Altmeyer M, et al. Chromatin modifiers Mdm2 and RNF2 prevent RNA:DNA hybrids that impair DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:E11311–20.
21. Feeley KP, Adams CM, Mitra R, Eischen CM. Mdm2 Is Required for Survival and Growth of p53-Deficient Cancer Cells. *Cancer Res.* 2017;77:3823–33.
22. Riscal R, Schrepfer E, Arena G, Ciss  MY, Bellvert F, Heuillet M, et al. Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of p53. *Mol Cell.* 2016;62:890–902.
23. Maddocks ODK, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature.* 2013;493:542–6.
24. Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science.* 2012;336:1040–4.
25. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:572–83.
26. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet.* 2011;43:869–74.
27. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature.* 2011;476:346–50.
28. Ray-Coquard I, Blay J-Y, Italiano A, Le Cesne A, Penel N, Zhi J, et al. Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol.* 2012;13:1133–40.
29. Li Q, Lozano G. Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2013;19:34–41.

30. Saiki AY, Caenepeel S, Cosgrove E, Su C, Boedigheimer M, Oliner JD. Identifying the determinants of response to MDM2 inhibition. *Oncotarget*. 2015;6:7701–12.
31. Khoo KH, Hoe KK, Verma CS, Lane DP. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:217–36.
32. Wang W, Qin J-J, Voruganti S, Wang M-H, Sharma H, Patil S, et al. Identification of a new class of MDM2 inhibitor that inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors in mice. *Gastroenterology*. 2014;147:893-902.e2.
33. Reid MA, Allen AE, Liu S, Liberti MV, Liu P, Liu X, et al. Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism. *Nature Communications*. 2018;9:5442.
34. Arena G, Cissé MY, Pyrdziak S, Chatre L, Riscal R, Fuentes M, et al. Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53. *Mol Cell*. 2018;69:594-609.e8.
35. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol*. 2014;16:2–9.
36. Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, et al. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med*. 2001;7:255–60.
37. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:233–41.
38. Sica V, Bravo-San Pedro JM, Izzo V, Pol J, Pierredon S, Enot D, et al. Lethal Poisoning of Cancer Cells by Respiratory Chain Inhibition plus Dimethyl α -Ketoglutarate. *Cell Rep*. 2019;27:820-834.e9.
39. Chène P. Inhibition of the p53-MDM2 interaction: targeting a protein-protein interface. *Mol Cancer Res*. 2004;2:20–8.
40. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015;17:351–9.
41. Maguire M, Nield PC, Devling T, Jenkins RE, Park BK, Polański R, et al. MDM2 regulates dihydrofolate reductase activity through monoubiquitination. *Cancer Res*. 2008;68:3232–42.
42. Way L, Faktor J, Dvorakova P, Nicholson J, Vojtesek B, Graham D, et al. Rearrangement of mitochondrial pyruvate dehydrogenase subunit dihydrolipoamide dehydrogenase protein-protein interactions by the MDM2 ligand nutlin-3. *Proteomics*. 2016;16:2327–44.
43. Elkholi R, Abraham-Enachescu I, Trotta AP, Rubio-Patiño C, Mohammed JN, Luna-Vargas MPA, et al. MDM2 Integrates Cellular Respiration and Apoptotic Signaling through NDUF51 and the Mitochondrial Network. *Mol Cell*. 2019;
44. Olsen AM, Eisenberg BL, Kuemmerle NB, Flanagan AJ, Morganelli PM, Lombardo PS, et al. Fatty acid synthesis is a therapeutic target in human liposarcoma. *Int J Oncol*. 2010;36:1309–14.

45. Braas D, Ahler E, Tam B, Nathanson D, Riedinger M, Benz MR, et al. Metabolomics strategy reveals subpopulation of liposarcomas sensitive to gemcitabine treatment. *Cancer Discov.* 2012;2:1109–17.
46. Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol.* 2014;171:2000–16.

Figure 1:

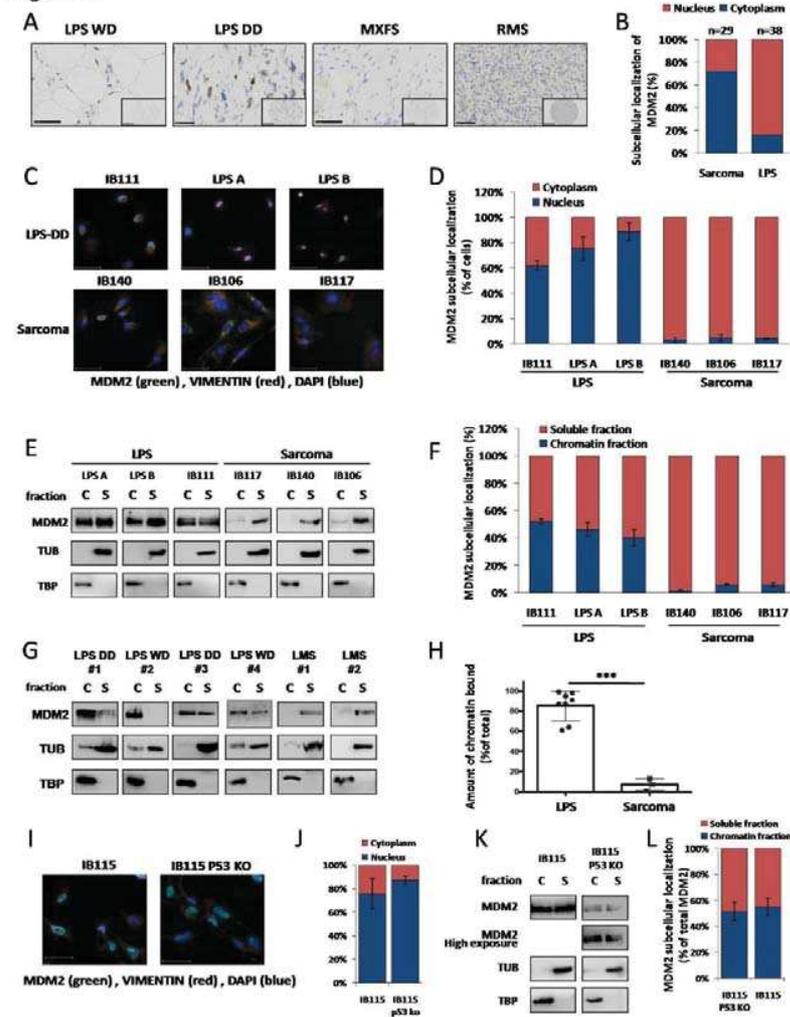


Figure 1: MDM2 is preferentially localized on chromatin in liposarcoma cells

A, MDM2 subcellular localization (nuclear or cytoplasmic) was determined by immunohistochemistry (IHC) analysis of a TMA composed of 38 DD/WD-LPS and 29 sarcomas of other subtypes. Microphotographs of a representative panel of DD/WD-LPS and sarcomas of other subtypes. Scale bars=100 μ m. **B**, Histograms represent the percentage of cells exhibiting MDM2 nuclear or cytoplasmic staining in each sample (n=100 cells analyzed per sample) **C** The subcellular localization of endogenous MDM2 in human cell lines derived from DD-LPS or sarcomas of other subtypes was determined by immunofluorescence (IF) analysis. MDM2 (green), Vimentin (red) and nuclei (blue). Scale bar, 50 μ m. **D**, Histograms represent the percentage of cells exhibiting cytoplasmic or nuclear localization of MDM2 in the same cells than in C (mean \pm SD of n=3 independent experiments in which 100 to 500 cells were analyzed for each experiment.) **E**, The localization of endogenous MDM2 was determined by immunoblotting in a representative panel of human sarcoma cell lines by subcellular fractionation assays. C indicates the fraction enriched in chromatin-associated proteins. S indicates the pooled fractions enriched in nucleo- and cyto- soluble proteins. The quality of the fractionation and equal loading were verified by Tubulin (TUB) and Tubulin (TUB) levels. **F**, Histograms represent the amount of chromatin-bound versus soluble (cyto and nucleosoluble) MDM2, relative to total MDM2, as determined by immunoblotting in a representative panel of human sarcoma cell lines. (mean \pm SD; n=5 independent experiment). **G**, Subcellular localization of endogenous MDM2 was determined in fresh sarcoma samples by fractionation assays as in E. **H**, Immunoblot analysis of MDM2, TBP and ACTIN in C and S fractions in a representative panel of WD/DD-LPS or sarcomas of other subtypes. **I**, Microscopy analysis of endogenous MDM2 localization in liposarcoma cell line IB115 parental or KO for p53. MDM2 (green), Vimentin (red) and nuclei (blue). Scale bar, 50 μ m. **J**, quantification of the intracellular localization of MDM2 in IB115 parental or KO for p53. MDM2 localization was analysed with image J using colocalization between MDM2 and DAPI staining (mean \pm SD; 100 to 500 cells were counted per cell line in 3 independent experiments). **K**, Localization of endogenous MDM2 was assessed in parental IB115 DD-LPS cells or in p53 KO clones by subcellular fractionation as in E. **L**, Histograms represent the quantification of immunoblots assessing MDM2 subcellular localization upon fractionation assays in parental or p53 KO IB115 DD-LPS cells. (mean \pm SD; n=5 independent experiment).

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

Figure 2:

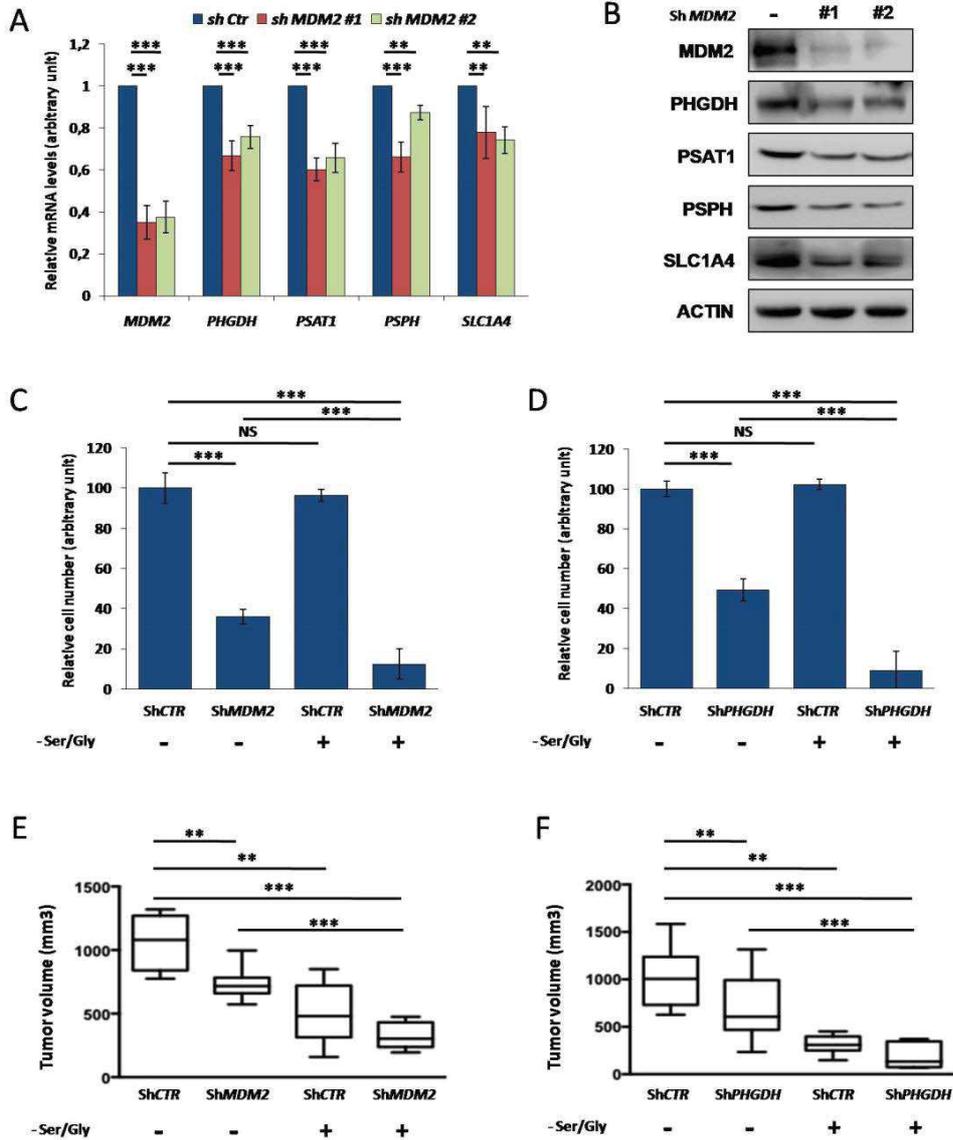


Figure 2: MDM2 is a master regulator of the serine metabolism in LPS

A, Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PSPH*, *PSAT*, *PHGDH*, and *SLC1A4* in IB115 p53 KO cells, 64 hours after shRNA-mediated depletion of MDM2 (shMDM2). mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the corresponding control samples prepared from IB115 p53 KO cells transduced with a lentivirus expressing a control shRNA (mean +/- SD; n=6 independent experiments). **B**, Protein levels of MDM2, PSPH, PHGDH, PSAT and SLC1A4 were determined by quantitative immunoblotting of whole cell extracts prepared from IB115 p53 KO cells, 64 hours after transduction with a lentivirus encoding a control- or MDM2-shRNA. **C**, Cell proliferation was monitored in real-time using the xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) assay. Histogram represents the number of cells in control- or MDM2-shRNA-treated IB115 p53 KO cells cultured for 4 days in complete or serine/glycine-deprived (-Ser/Gly) medium. (mean +/- SD; n=3 independent experiments performed in quadruplicates). **D**, Histogram represents the number of cells in control- or PHGDH-shRNA-treated IB115 p53 KO cells cultured for 4 days in complete or -Ser/Gly medium. Analyses were done using xCELLigence (RTCA) (mean +/- SD; n=3 independent experiments performed in quadruplicates). **E**, Nude mice were subcutaneously xenografted with IB115 shp53 cells stably expressing control- or MDM2-shRNAs, and fed with a complete or a serine and glycine deprived diet (-Ser/Gly). Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=9 tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical end-point. **F**, Nude mice were subcutaneously xenografted with IB115 shp53 cells stably expressing control- or PHGDH-shRNAs, and fed with a complete or -Ser/Gly diet. Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=10 tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical end-point. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ indicate statistical significance of the observed differences.

Figure 3:

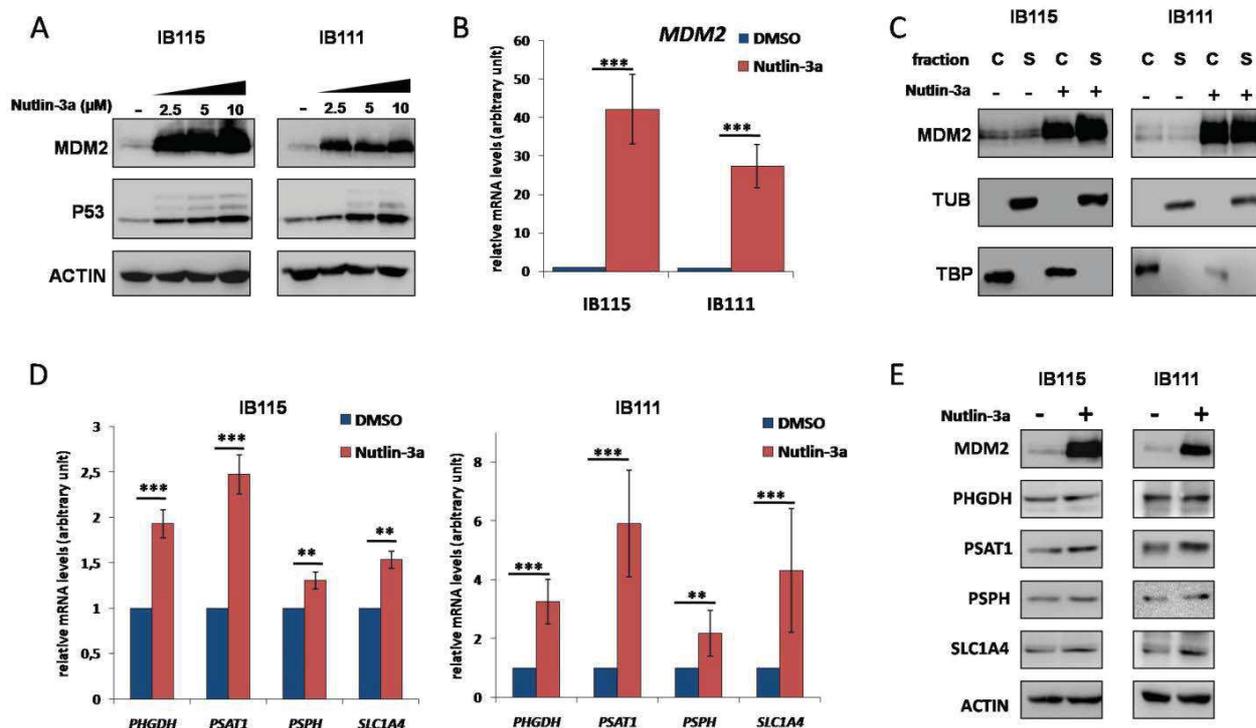


Figure 3: Nutlin3A treatment enhances MDM2-associated metabolic functions in LPS cells

A, Immunoblot analyses of MDM2 and p53 protein levels in whole extract prepared from IB115 and IB111 LPS cell upon Nutlin-3a treatment for 24 hours (2,5 to 10 μ M). Equal loading was verified by ACTIN levels. **B**, Relative mRNA levels of the *MDM2* gene 24h after Nutlin-3a treatment (10 μ M). MDM2 mRNA levels were determined by RT-qPCR in mock or Nutlin3A-treated IB115 or IB111 DD-LPS cells (mean \pm SD; n=7 independent experiments). **C**, Localization of endogenous MDM2 was assessed in IB115 and IB111 cells treated with 10 μ M Nutlin for 24 hours by subcellular fractionation. Fractions enriched in chromatin-associated proteins (c) were separated from pooled fractions containing nucleo- and cyto-soluble proteins (s) and analyzed by immunoblotting. The quality of the fractionation and equal loading were verified by Tata Binding Protein (TBP) and Tubulin (TUB) levels. **D**, Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PSPH*, *PSAT*, *PHGDH*, and *SLC1A4* in IB115 and IB111 cells, 24 hours after Nutlin-3a treatment (10 μ M). mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the corresponding control samples prepared from IB115 cells treated with DMSO (mean \pm SD; n=7 independent experiment). **E**, Protein levels of *PSPH*, *PHGDH*, *PSAT* and *SLC1A4* were determined by quantitative immunoblotting of whole cell extracts prepared from in IB115 and IB111 cells, 24 hours after Nutlin-3a treatment.

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

Figure 4:

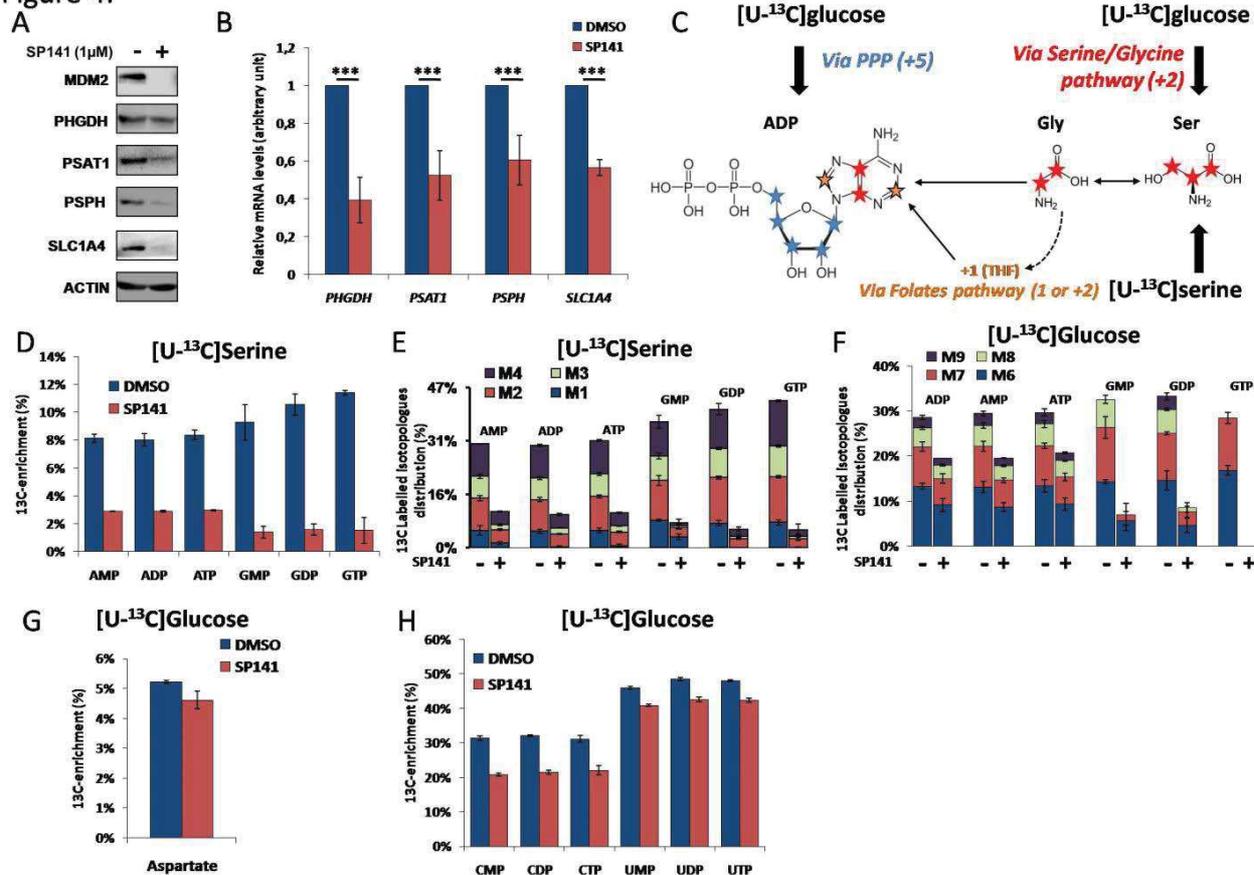


Figure 4: The pharmacological inhibitor SP141 inhibits MDM2-associated metabolic functions and impacts on nucleotide biosynthesis in DD-LPS cells

A, Protein levels of MDM2, PSPH, PHGDH, PSAT, SLC1A4 and ACTIN (loading control) were determined by immunoblotting of whole cell extracts prepared from IB115 p53 KO cells, 20 hours after treatment with the MDM2 inhibitor, SP141 (1μM). **B**, Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PSPH*, *PSAT*, *PHGDH*, and *SLC1A4* in IB115 p53 KO cells, 20 hours after treatment with SP141 (1μM). mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the corresponding control samples prepared from IB115 p53 KO cells treated with DMSO (mean +/- SD; n=5 independent experiments). **C**, schematic representation of ¹³C incorporation into nucleotides from the indicated carbon source and metabolic pathways. **D**, Stable isotope tracing experiments. IB115 p53 KO cells treated or not 20 hours with SP141 (0.5μM) were cultured for 12 hours, in the presence of uniformly labeled [U-¹³C]. LC-MS was used to detect the ¹³C-enrichment in purine bases. **E**, LC-MS was used to detect the relative intracellular levels of ¹³C-labeled (m+1 to m+4) isotopologues detected in purines that derive from ¹³C-labelled serine. **F**, IB115 cells treated or not 20 hours with SP141 (0.5μM) were cultured for 12 hours, in the presence of uniformly labeled [U-¹³C] glucose in - Ser/Gly medium. LC-MS was used to detect the relative intracellular levels of ¹³C-labeled (m+6 to m+9) isotopologues in purines that derive from ¹³C-labelled serine. **G-H** LC-MS was used to detect the ¹³C-enrichment in aspartate and pyrimidine upon incubation with [U-¹³C] glucose. histograms represent the percentage of ¹³C-labelled metabolite (+/- SD).

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

Figure 5:

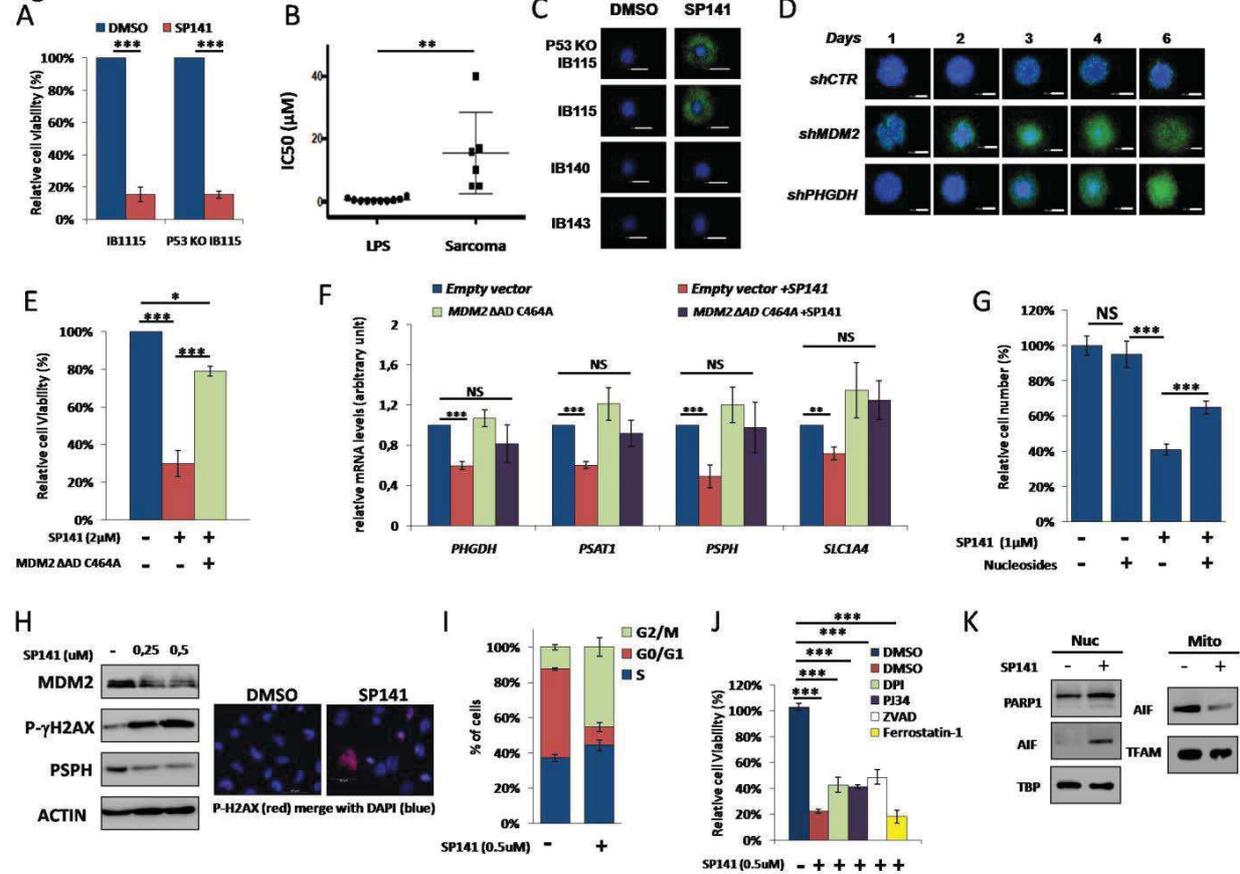


Figure 5: The MDM2 degrader SP141 induces cell death by parthenatos

A, Histograms represent the number of cells in parental or p53 KO IB115 DD-LPS cells cultured for 82 hours in presence of SP141 (1µM). Measurements were made using xCELLigence RTCA (mean +/- SD; n=7 independent experiments performed in quadruplicates). **B**, IC50 were measured in DD-LPS and 6 sarcoma cell lines of different subtypes. **C**, The impact of SP141 on cell viability was determined in 3D culture conditions. 20000 LPS cells or sarcoma cells of other subtypes were seeded into ultra-low attachment plates. 24 hours later, the resulting spheroids were treated or not with SP141 (2µM) and microphotographed after 6 days in culture (Scale bars: 500 µM). Live (blue) and dead (green) cells were detected using a fluorescent viability kit (ReadyProbes™ Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green R37609). **D**, p53 KO IB115 cells transduced with lentiviruses encoding control, PHGDH, or MDM2 shRNAs were cultured for 6 days as spheroids and live and dead cells were detected as in C. Microphotographs of representative spheroids at each day of culture are shown. (Scale bar: 500 µM). **E**, Cell viability of p53 KO IB115 LPS cells transduced with lentiviruses encoding empty vector or the MDM2 deltaAD-C464A mutant upon SP141 (2µM) treatment. Histograms represent the number of live cells after 48 hours of treatment in 2D cultures (mean +/- SD, n=5). **F**, Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PSPH*, *PSAT*, *PHGDH*, and *SLC1A4* in p53 KO IB115 cells transduced with lentiviruses encoding empty vector or the MDM2 deltaAD-C464A mutant, 24 hours after treatment with 1µM SP141. mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the corresponding control samples prepared from p53 KO IB115 cells treated with DMSO (mean +/- SD; n=4 independent experiments). **G**, p53 KO IB115 cells were cultured in the presence of nucleotides mix, and treated with SP141. Histograms represent the number of live cells after 24 hours of treatment with SP141 (1µM)(mean +/- SD, n=3 independent experiments performed in triplicates). **H**, Protein levels of MDM2, PSPH, Phospho-gamma-H2AX and ACTIN (loading control) were determined by quantitative immunoblotting of whole cell extracts prepared from p53 KO IB115 cells, after 24 hours after treatment with SP141 (0 ; 0.25 and 0.5µM). **I**, FACS analysis of the cell-cycle profile of IB115 p53 KO cells after 16 hours of 0.5µM SP141 treatment (mean ± SEM; n=4 independent experiments). **J**, Histogram represents the number of cells in control- or SP141-treated IB115 p53 KO cells, treated or not with different cell death inhibitors DPI (1µM), ZVAD (30µM), PJ34 (50µM) and Ferrostatin-1 (1µM) (mean ± SD; n=8 independent experiments). **K**, immunoblot analysis of endogenous nuclear (Nuc) or mitochondrial (Mito) PARP1 and AIF, TUB and TFAM (loading controls) proteins in p53 KO IB115 cells treated with 1µM SP141 for 24 hours.

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

Figure 6:

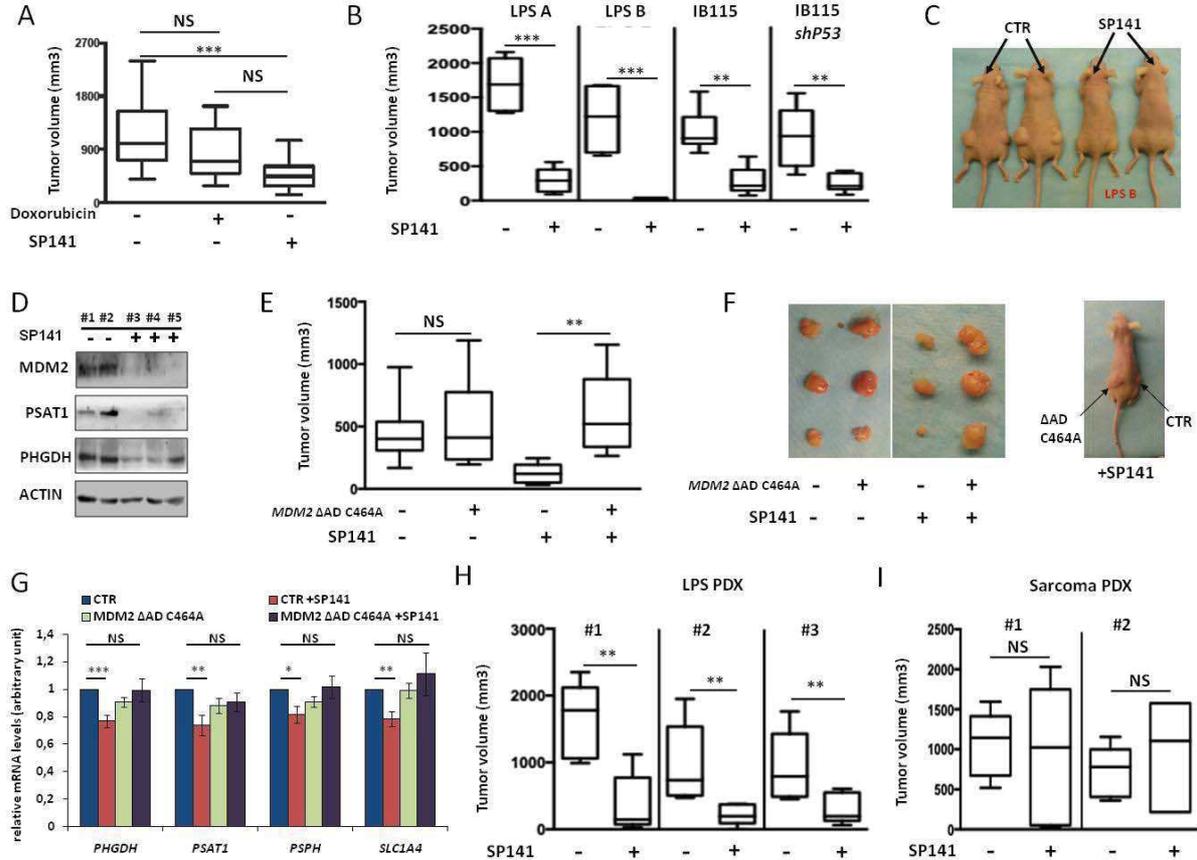


Figure 6: MDM2 metabolic function as a new therapeutic strategy for LPS

A, Nude mice were subcutaneously xenografted with IB115 cells. tumors were treated with SP141 (40 mg/kg, daily injections) or doxorubicin (2 mg/kg, twice a week) when they reached 150 mm³. Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=10 to 16 tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical end-point. **B**, Nude mice were subcutaneously xenografted with different LPS cell line (LPS A, LPS B, IB115 and IB115 shp53 cells). When the tumor reached 150mm³, tumors were treated with SP141 (40 mg/kg, daily injections). Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=6 to 12 tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical end-point. **C**, representative microphotographs of control versus treated mice. **D**, Protein levels of MDM2, PHGDH, PSAT and ACTIN (loading control) were determined by quantitative immunoblotting of extracts prepared from IB115 DD-LPS derived tumors. **E**, Nude mice were subcutaneously xenografted with IB115 cells expressing the MDM2ΔAD-C464A mutant or empty vector. When the tumor reached 150mm³, tumors were treated with SP141 (40 mg/kg, daily injections). Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=9 tumors per group) in each experimental group measured. **F**, microphotographs of representative control or SP141-treated tumors. **G**, Relative mRNA levels of the MDM2-target genes *PSPH*, *PSAT*, *PHGDH*, and *SLC1A4* in tumors expressing empty vector or MDM2ΔAD-C464A mutant, after treatment with SP141. mRNA levels were determined by RT-qPCR and normalized to the corresponding control samples (mean +/- SD; n=10 tumors per group). **H,I**, Impact of SP141 on PDX tumor growth. Nude mice were subcutaneously xenografted with tumor issue from patients with LPS or one leiomyosarcoma and one undifferentiated sarcoma. Animals were treated with SP141 (40 mg/kg, daily injections) when Tumors reached 150 mm³. Box and whisker plots represent the tumor volume (mean +/- SD, n=5 tumors per group) in each experimental group measured when the first animal reached the ethical end-point. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001 indicate the statistical significance of the observed differences.

Figure 1:

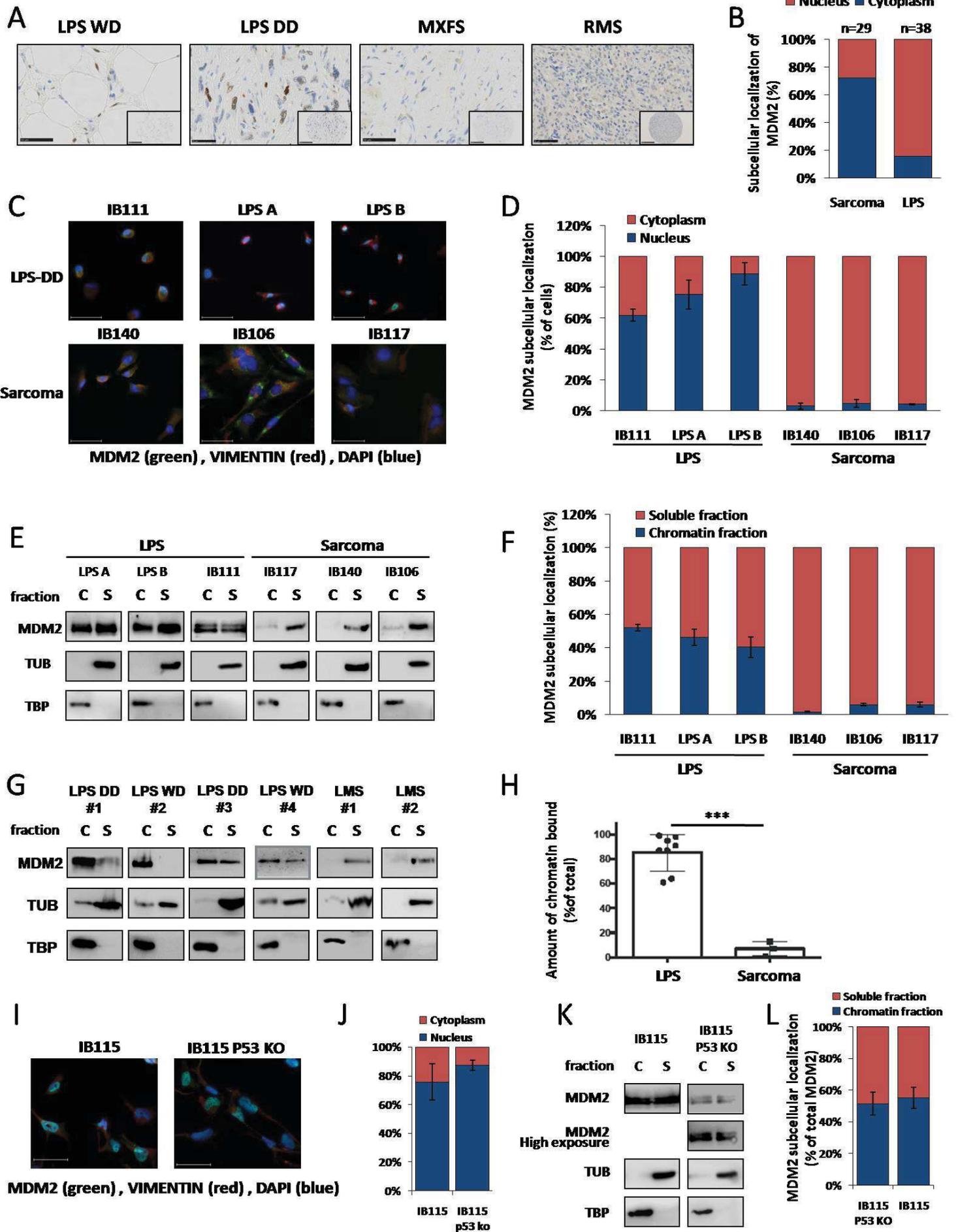


Figure 2:

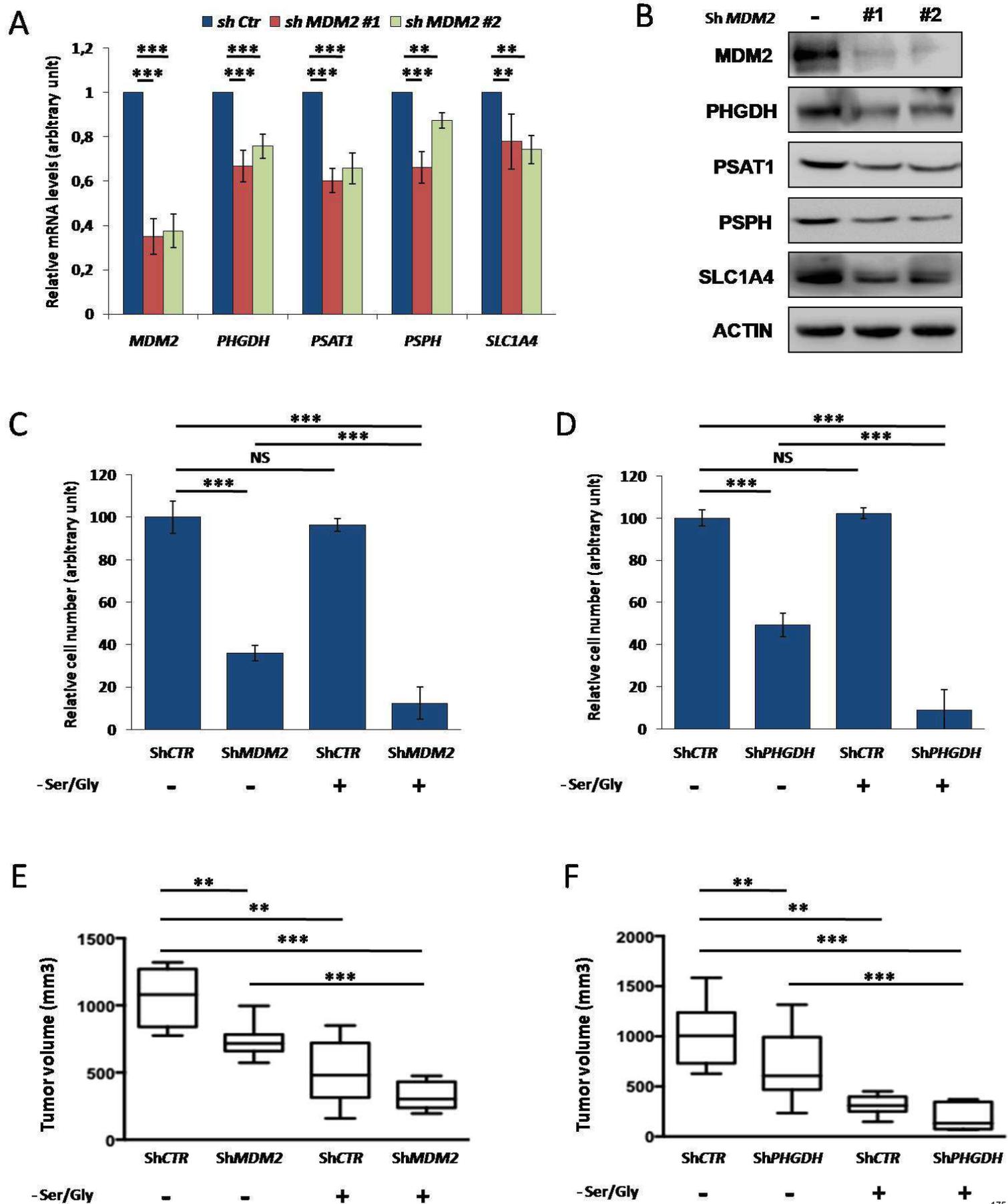


Figure 3:

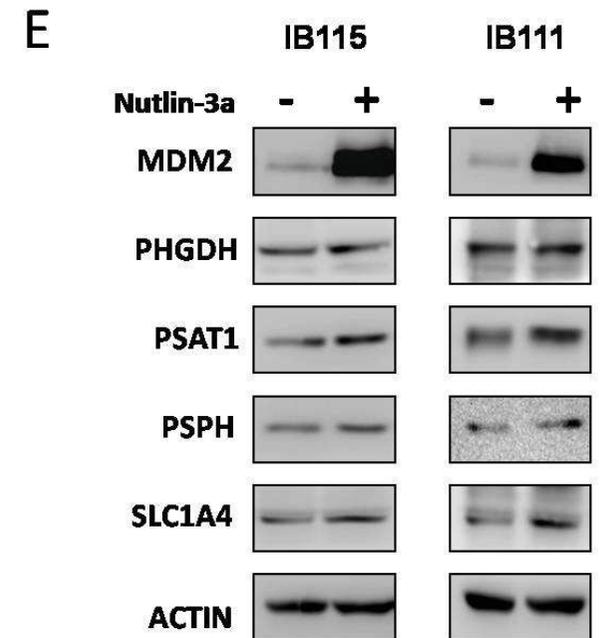
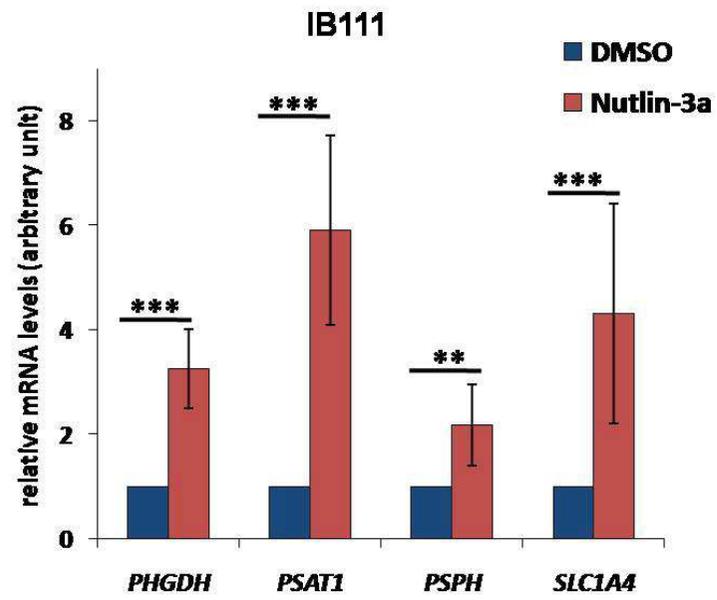
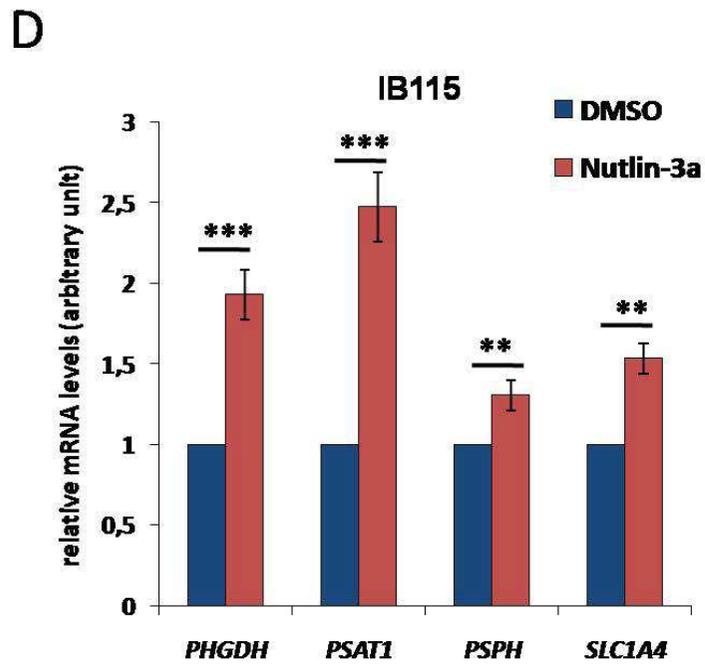
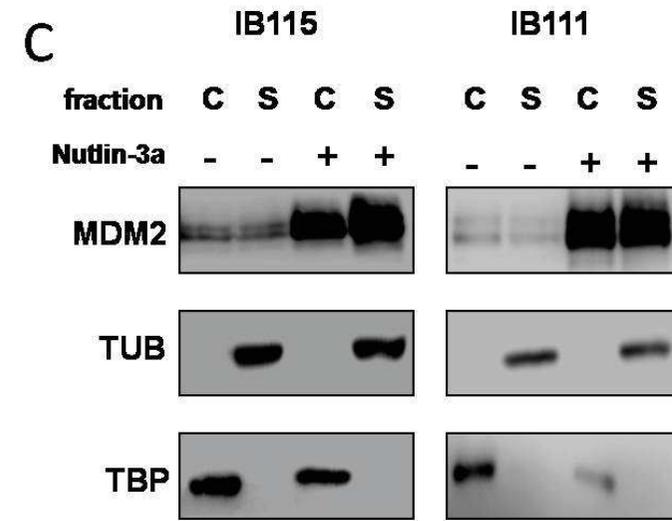
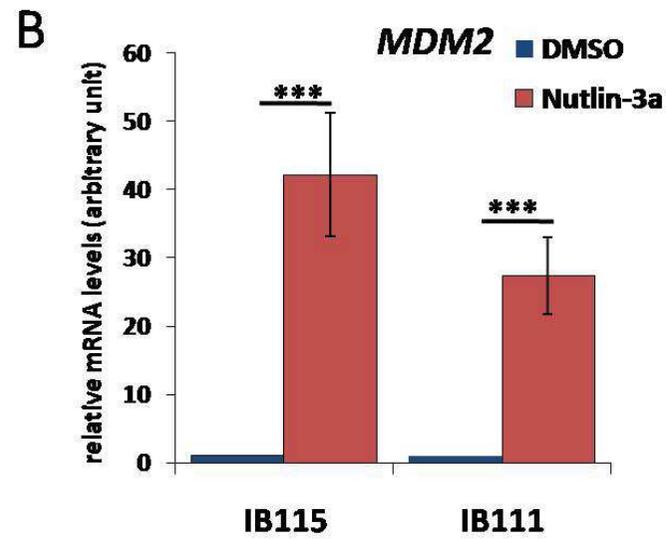
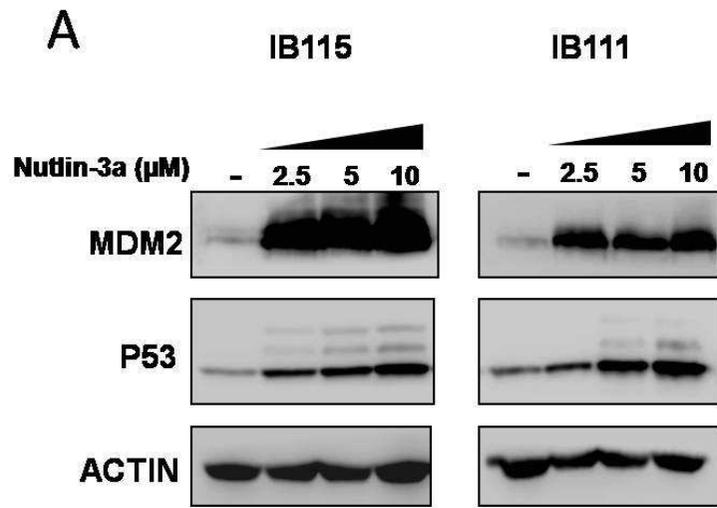
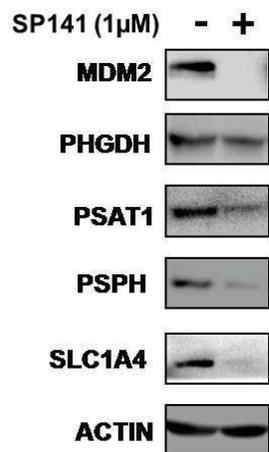
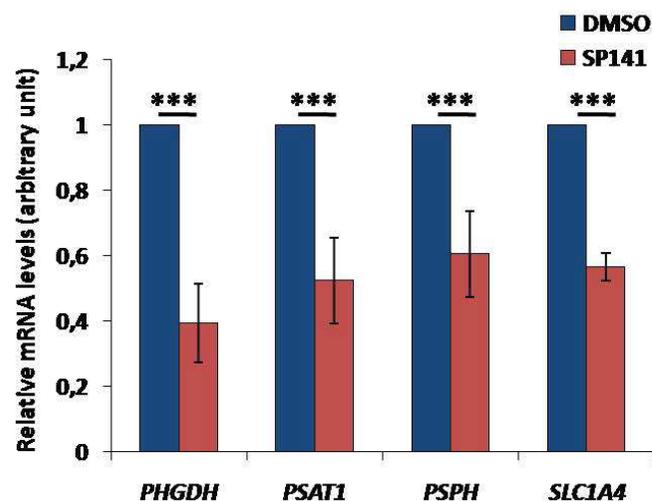


Figure 4:

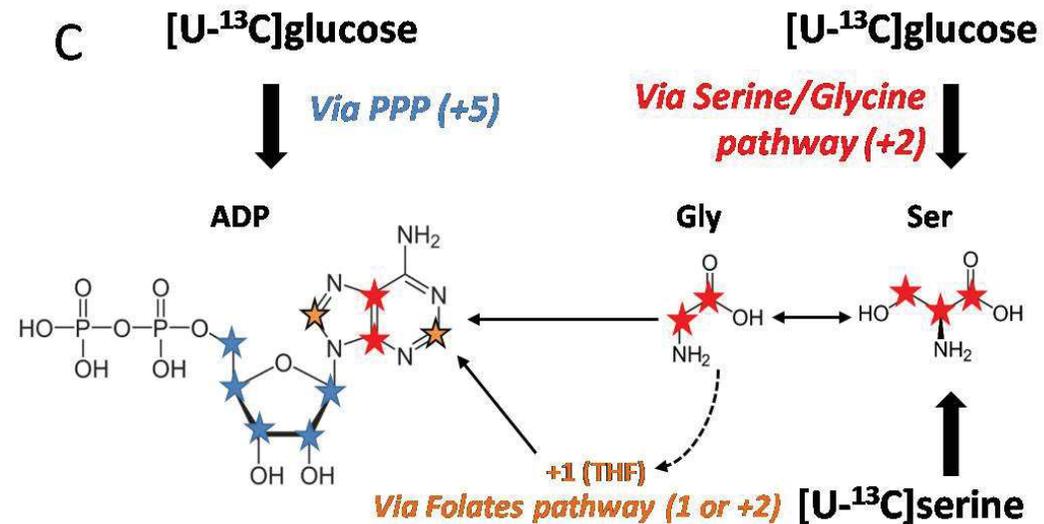
A



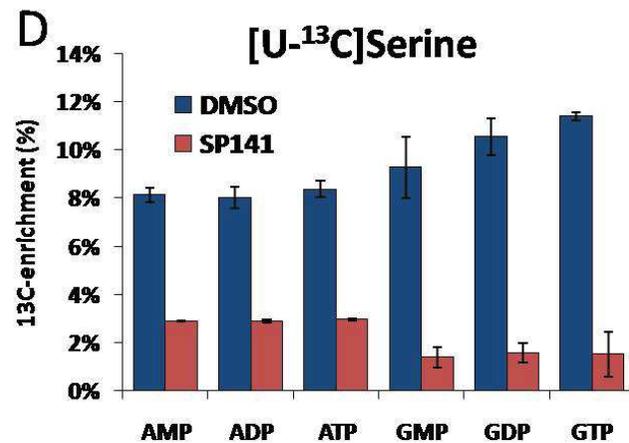
B



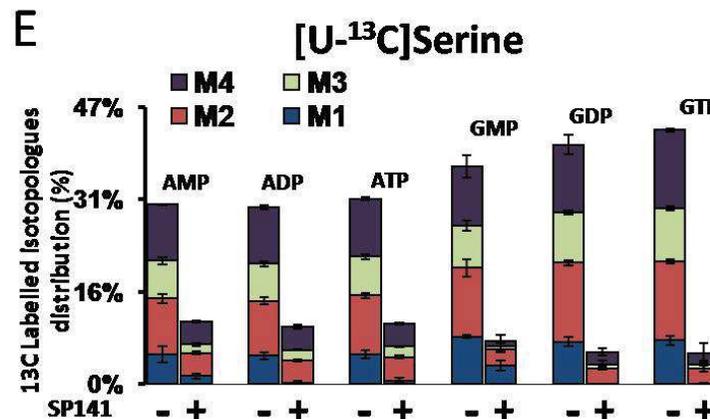
C



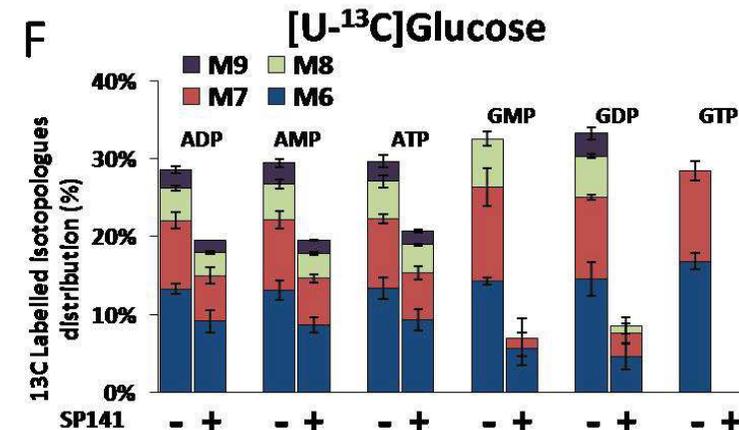
D



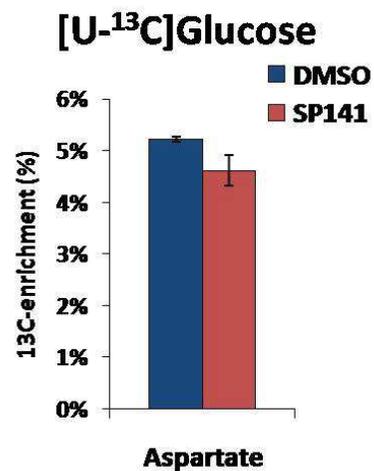
E



F



G



H

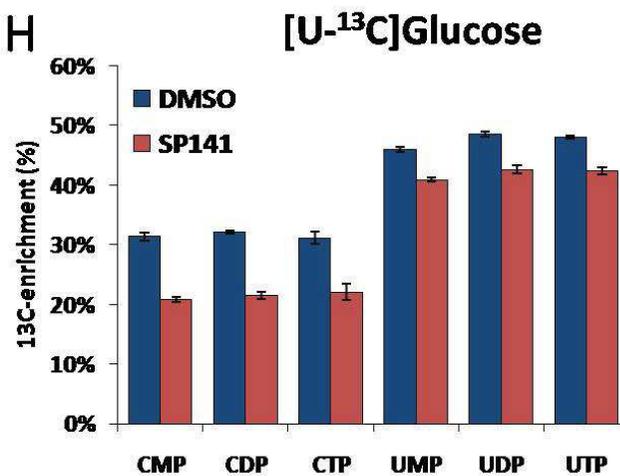


Figure 5:

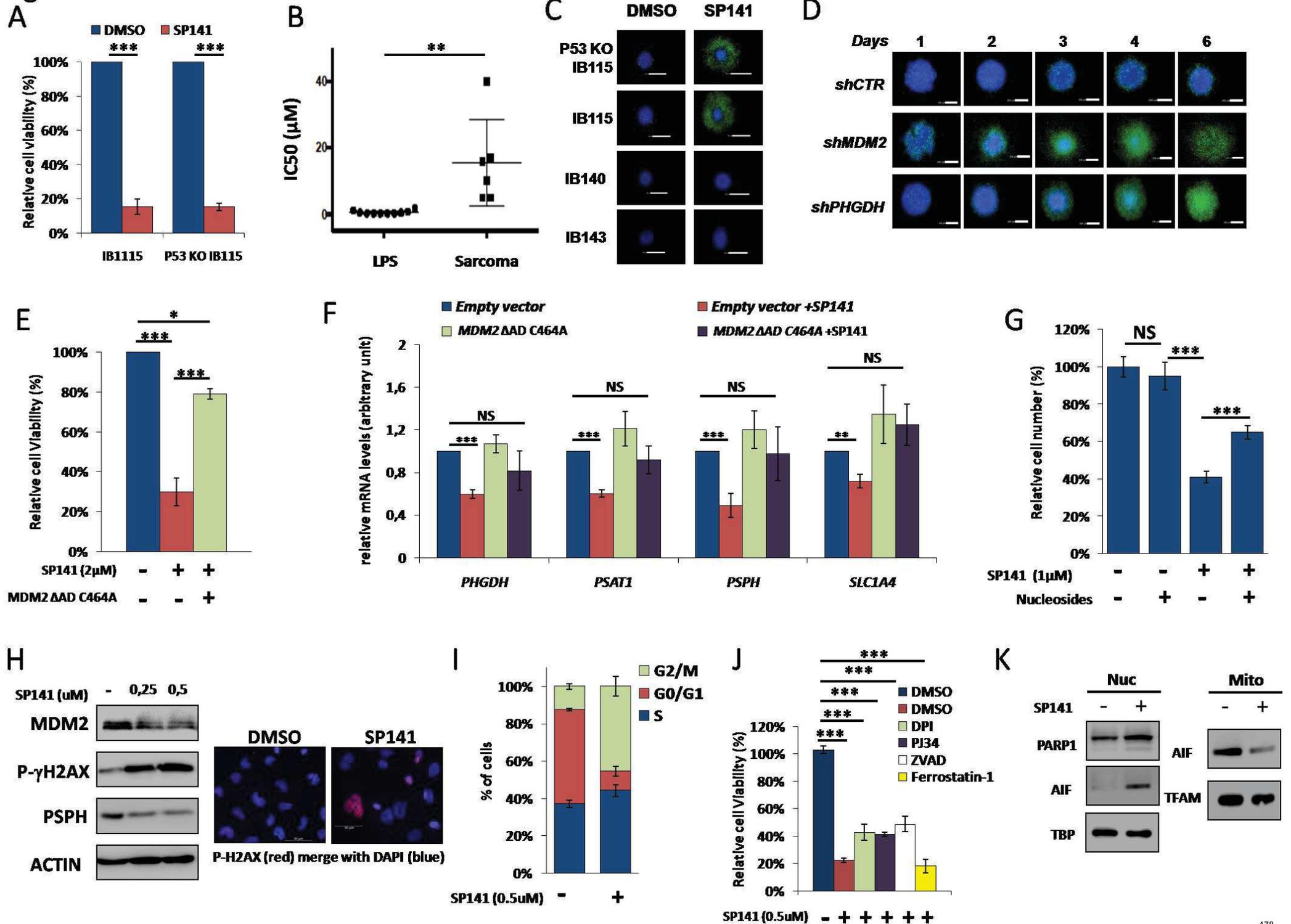
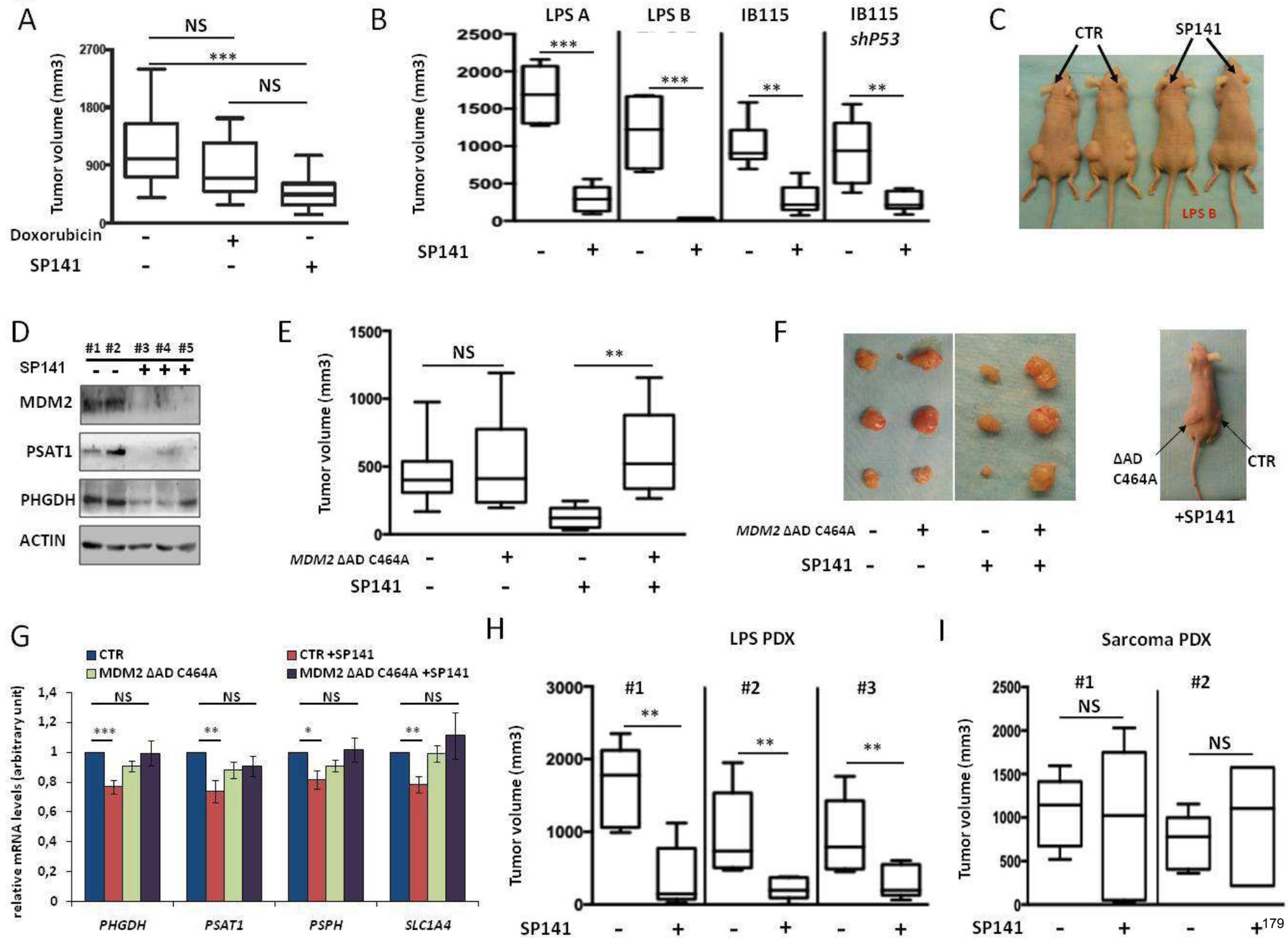
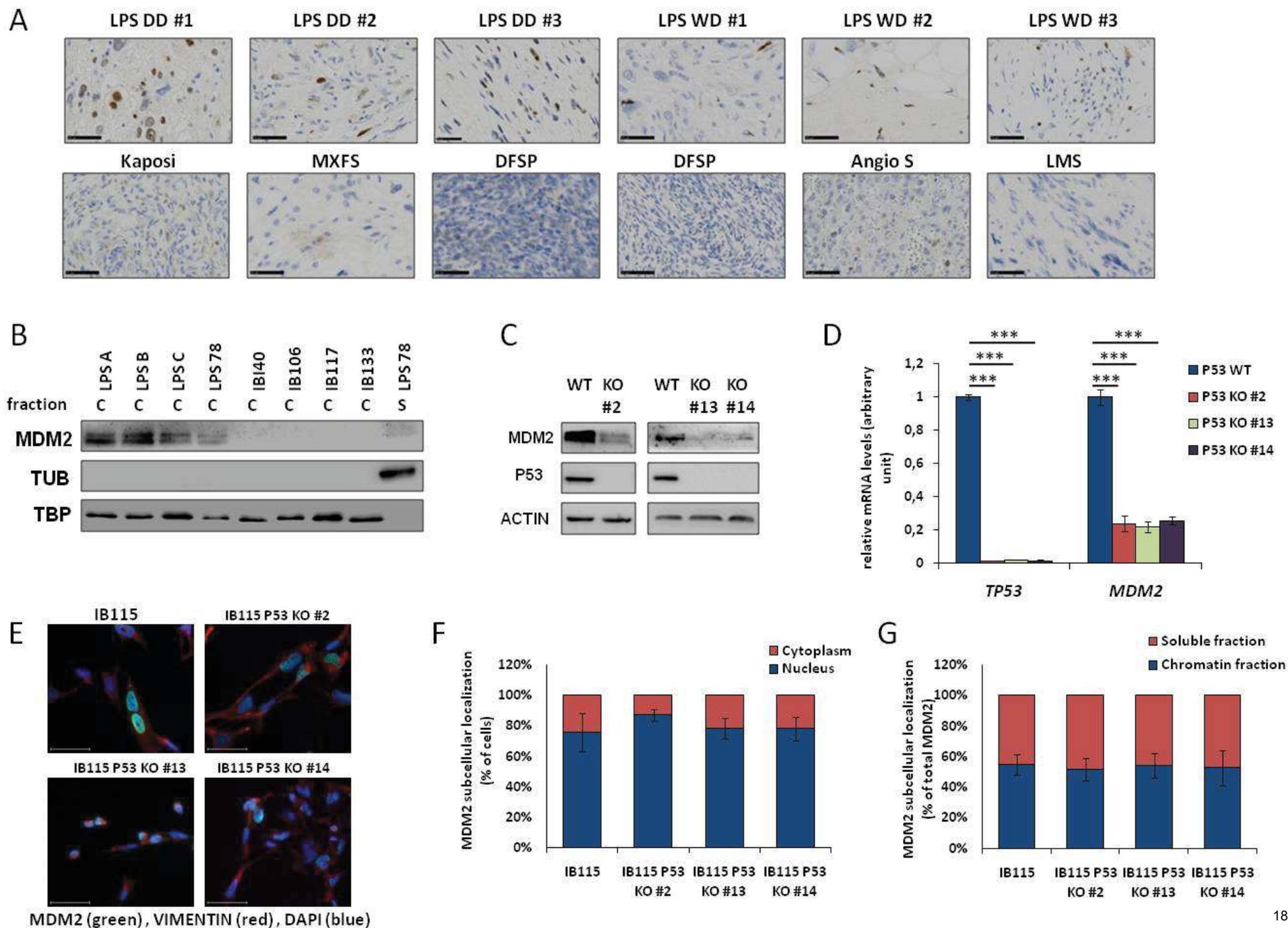


Figure 6:

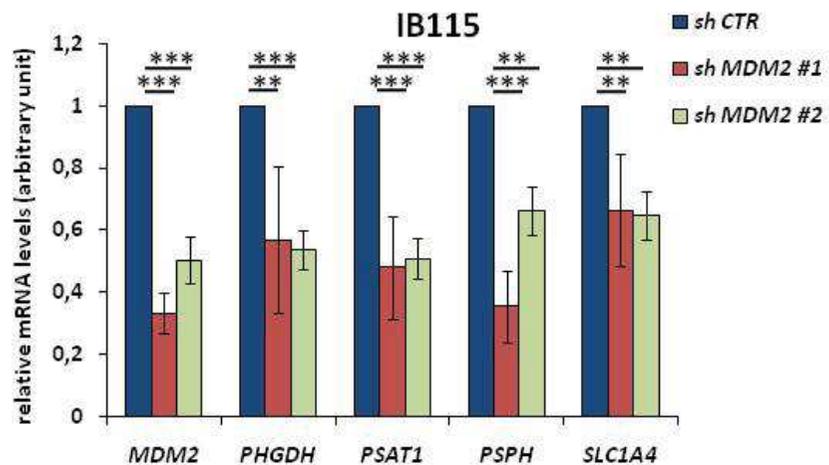


Supplementary Figure 1:

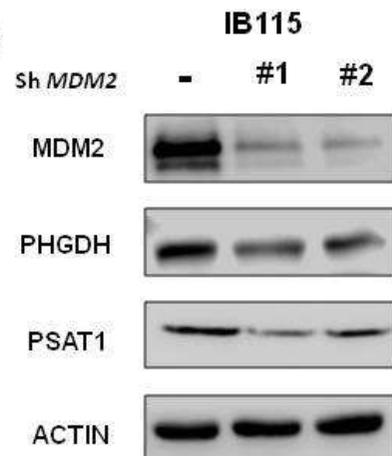


Supplementary Figure 2:

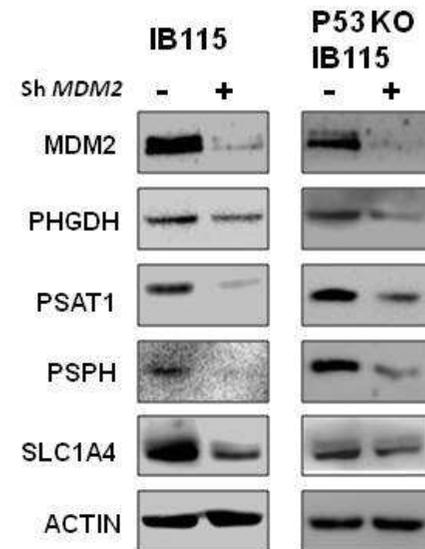
A



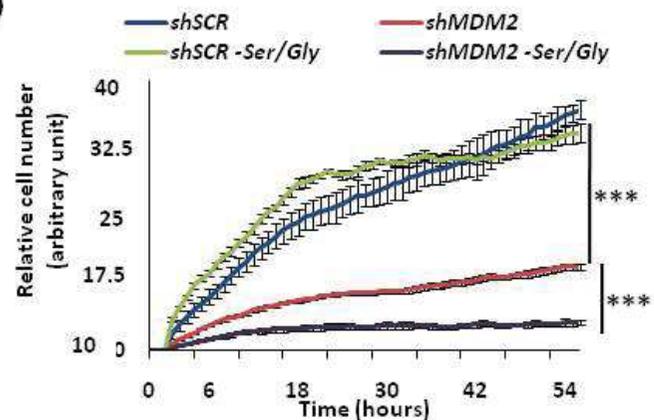
B



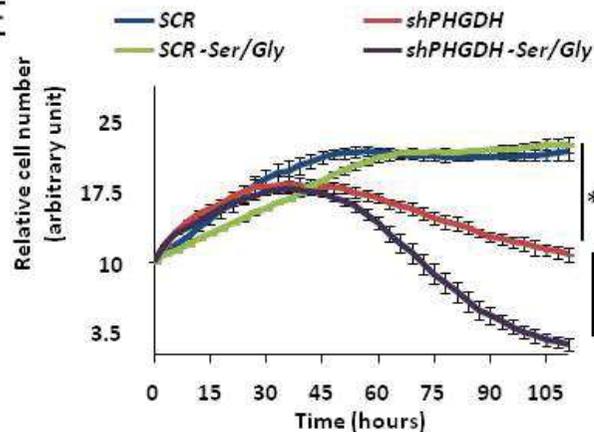
C



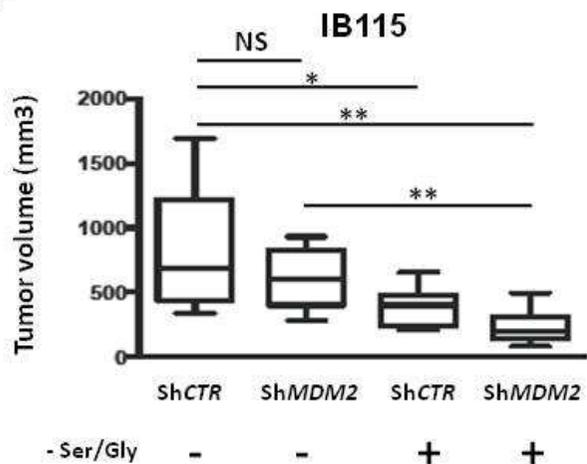
D



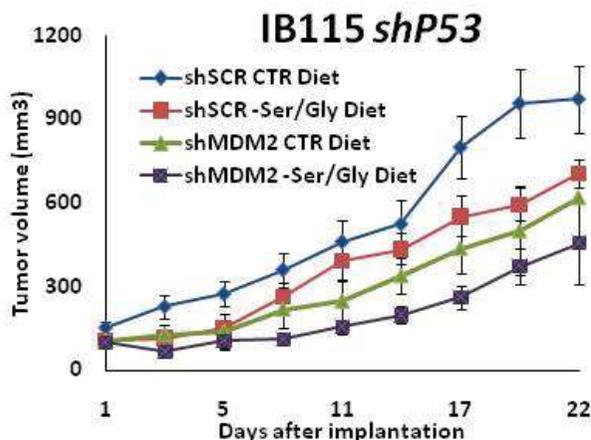
E



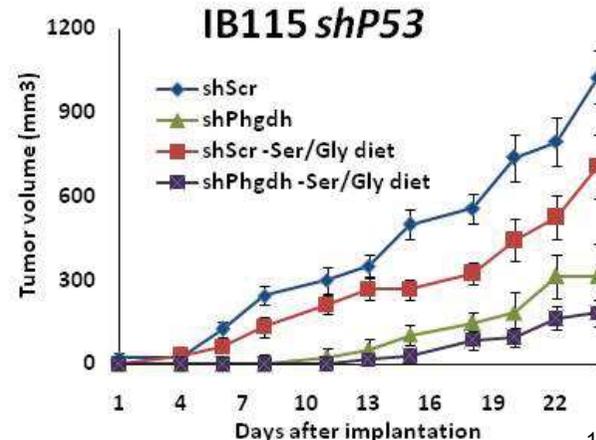
F



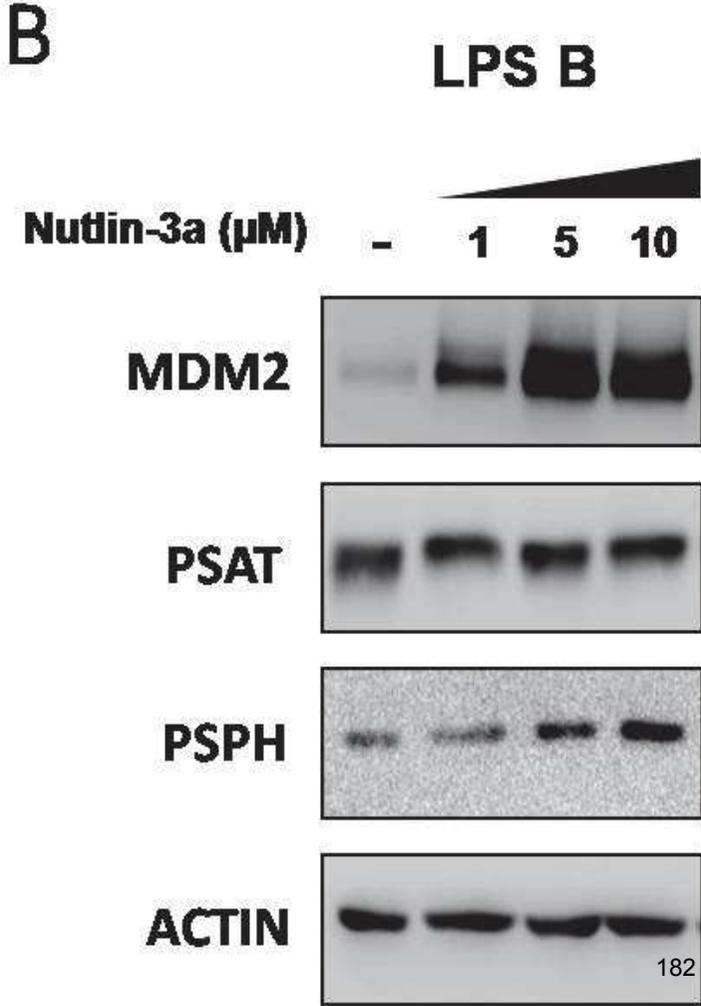
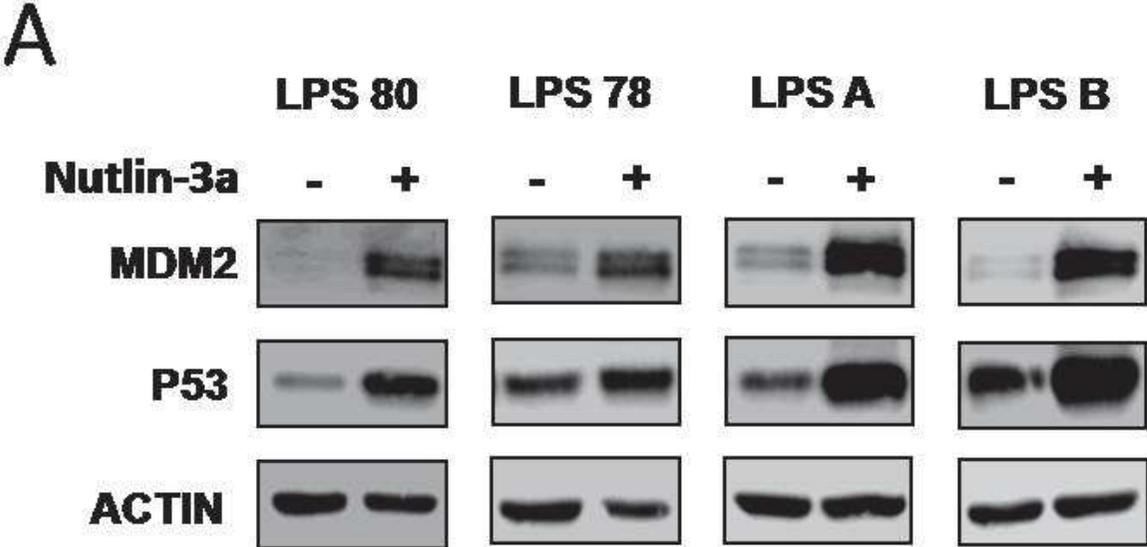
G



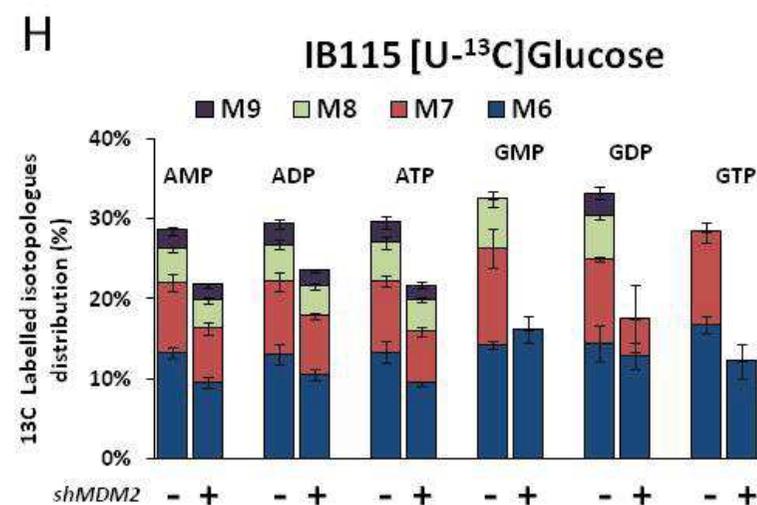
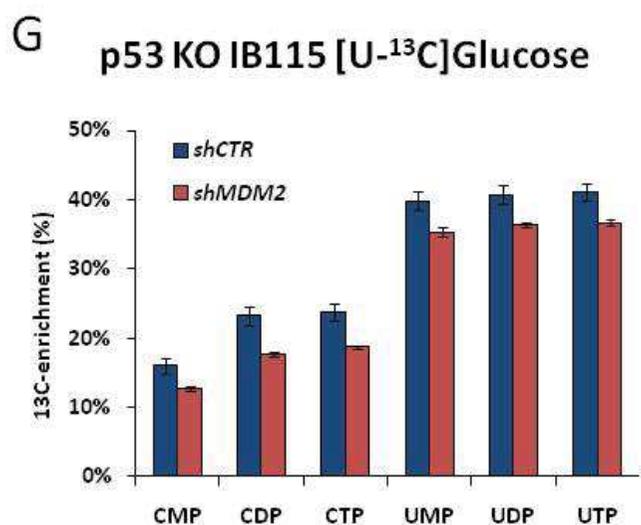
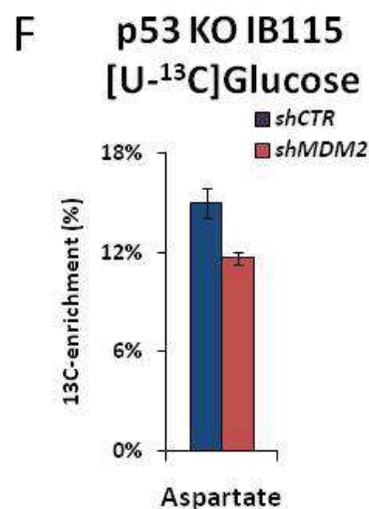
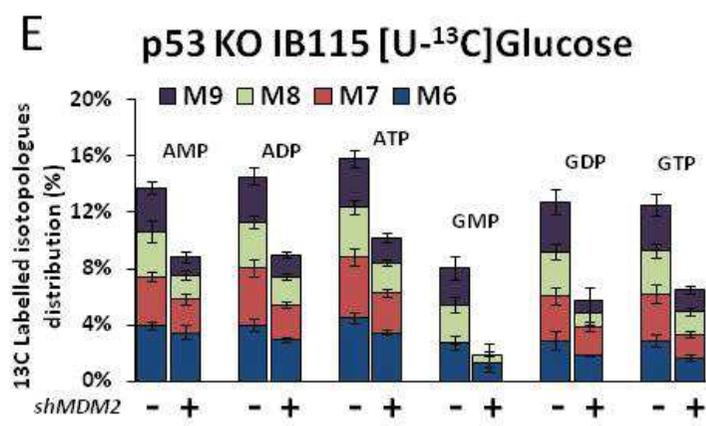
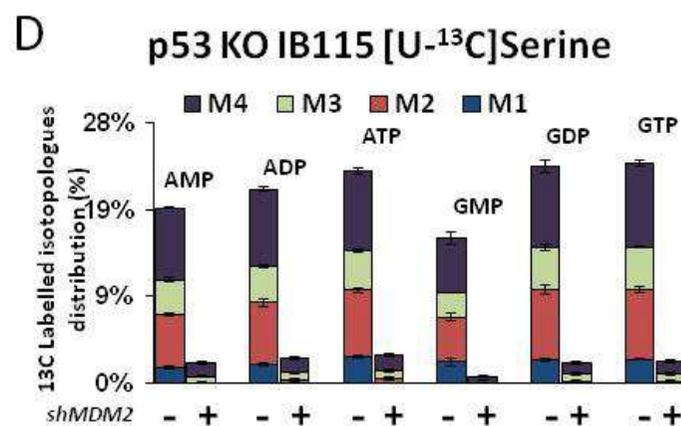
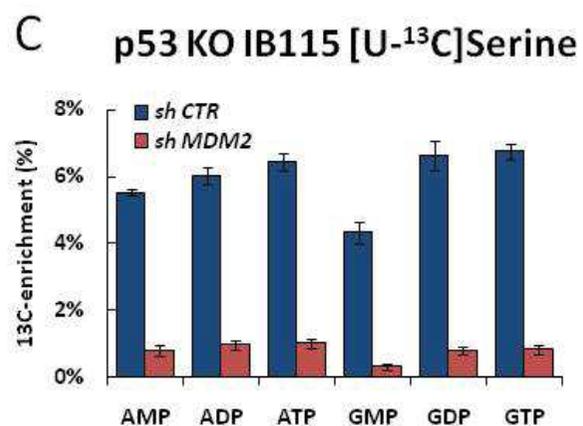
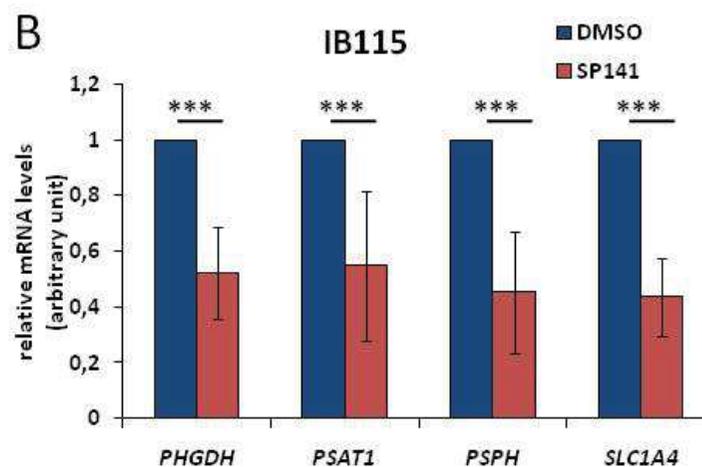
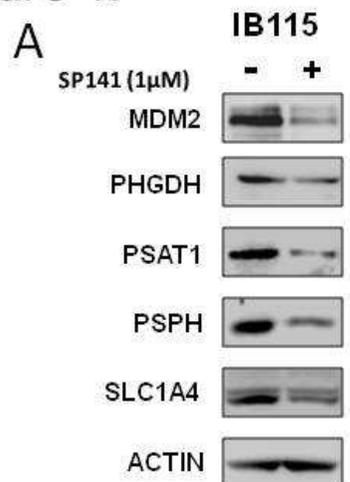
H



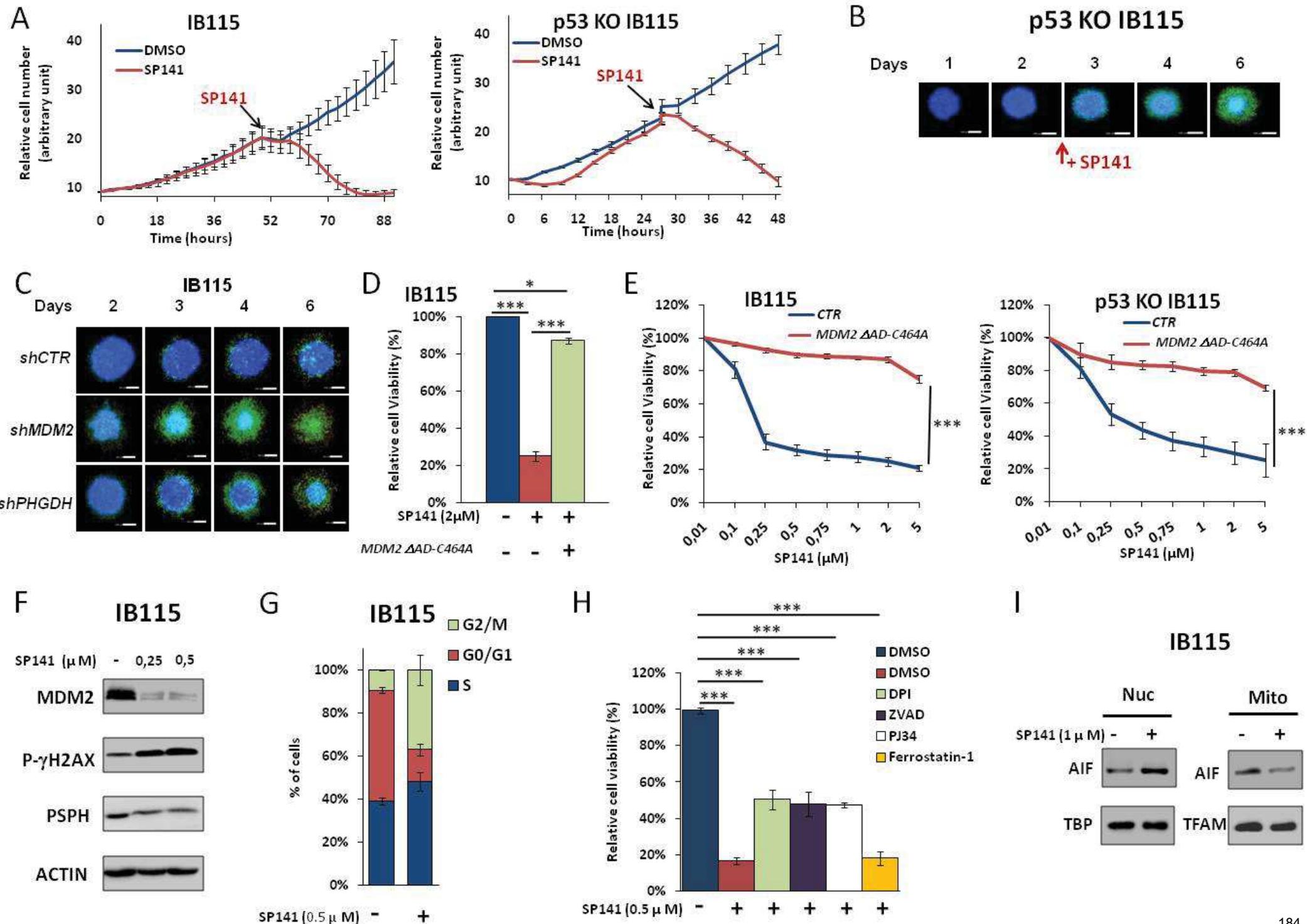
Supplementary Figure 3:



Supplementary Figure 4:

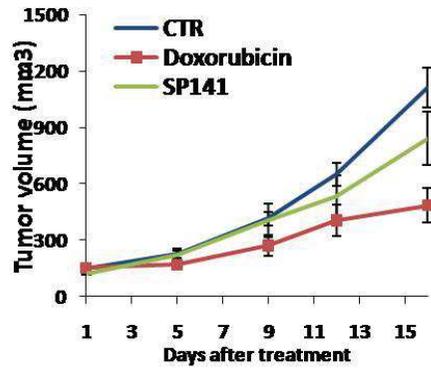


Supplementary Figure 5:

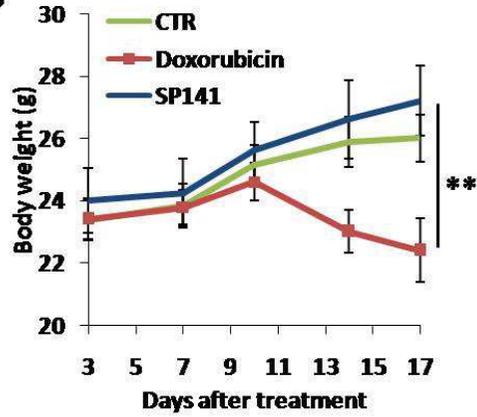


Supplementary Figure 6:

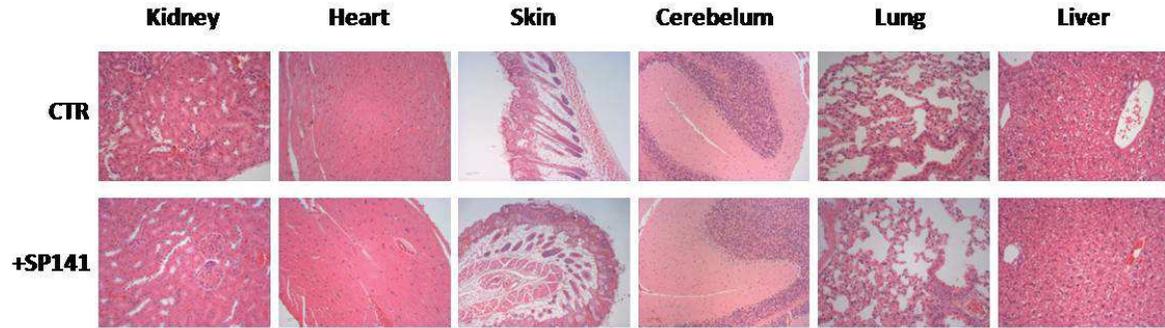
A



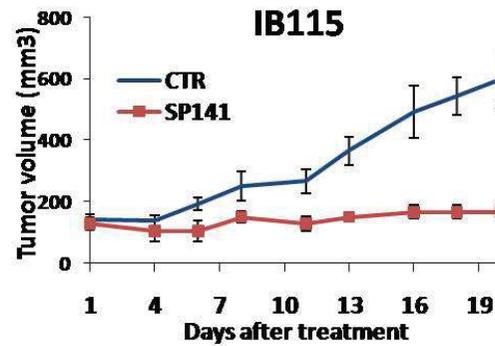
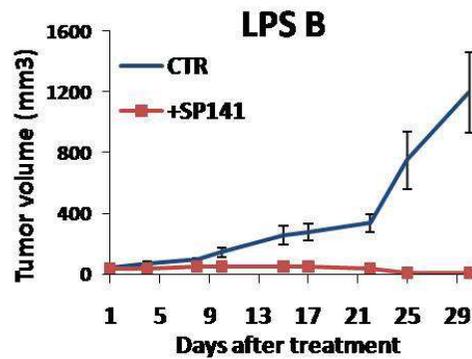
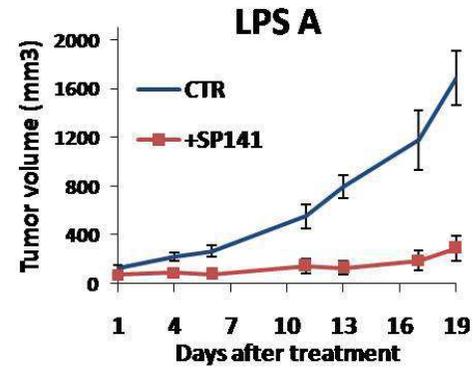
B



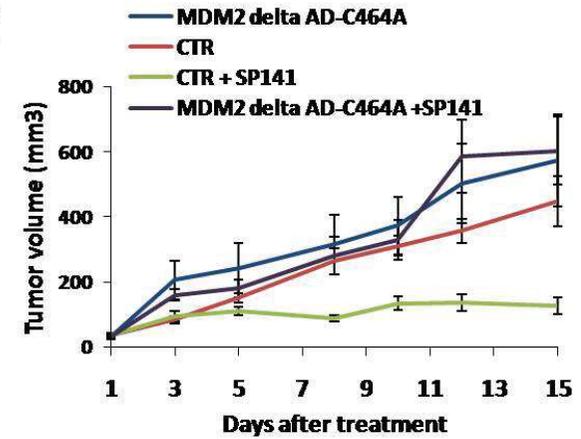
C



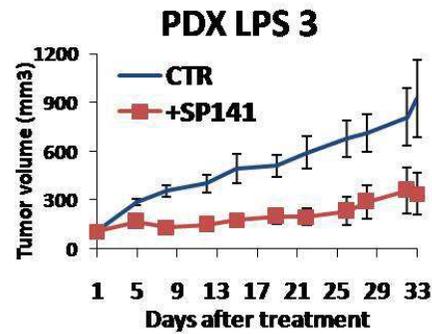
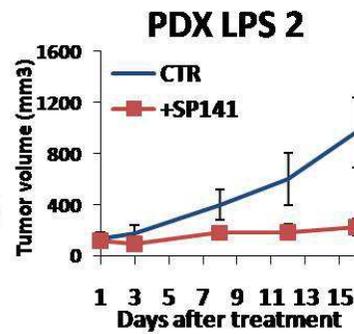
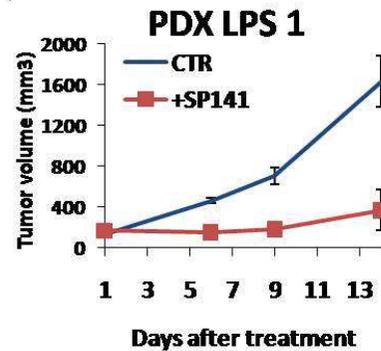
D



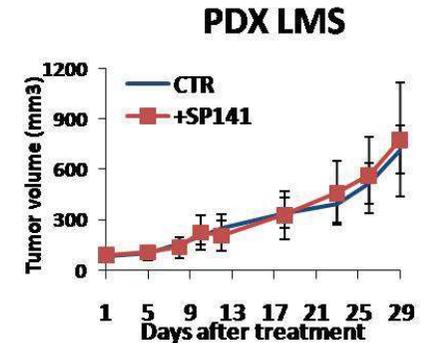
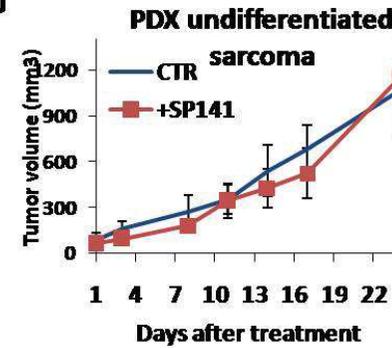
E



F



G



Brevet :

Mes travaux de thèses et les données nouvelles qui en découlent, concernant le rôle de MDM2 dans le contrôle du métabolisme du liposarcome, nous ont amenés à déposer un brevet d'application à l'office européen des brevets.

L'invention englobe plusieurs aspects pour la prise en charge des patients atteints de LPS. Elle concerne des méthodes de diagnostic de sujets atteints de LPS présentant un recrutement de MDM2 à la chromatine ou étant résistantes aux inhibiteurs de l'interaction de p53 et de MDM2, ainsi que des méthodes de traitement des LPS.

Nous avons montré que les fonctions métaboliques contrôlées par MDM2 sont exacerbées dans les LPS et que la pression sélective pour l'amplification de MDM2 dans ces tumeurs reflète probablement leur dépendance au métabolisme de la sérine. En utilisant une collection de lignées cellulaires dérivées de patients et de modèles murins de xénogreffe (PDX), nous avons montré que le ciblage génétique ou pharmacologique de MDM2 lié à la chromatine, ou du métabolisme de la sérine, tel que le ciblage de PHGDH, PSAT, PSPH, SLC1A4, fournit une stratégie thérapeutique efficace pour le LPS. Nous pensons que la faible réponse thérapeutique à la nutline des patients atteints de LPS démontre que le développement des LPS dépend du recrutement de MDM2 à la chromatine indépendamment de p53 et dépend entre autres du métabolisme de la sérine. Ainsi, nous souhaitons définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les LPS basées sur une nouvelle classe d'inhibiteurs de MDM2 ciblant le métabolisme de la sérine, ou le recrutement de MDM2 à la chromatine. Ainsi, l'invention concerne une méthode de diagnostic des sujets souffrant de liposarcome présentant un recrutement de MDM2 à la chromatine ou étant résistant aux inhibiteurs de l'interaction de p53 et MDM2. Par ailleurs, elle porte également sur l'intérêt de développer un inhibiteur du recrutement de MDM2 à la chromatine ou à un inhibiteur du contrôle du métabolisme de la sérine par MDM2, en vue d'une utilisation dans le traitement des LPS, ou tous types de cancer présentant un recrutement de MDM2 à la chromatine ou des types de cancer présentant un métabolisme exacerbé de la sérine et de la glycine.

METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF LIPOSARCOMA

FIELD OF THE INVENTION:

5 The present invention relates to methods for the diagnosis of subjects suffering from liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction. The present invention also relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of liposarcoma.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

10 Sarcomas are malignant tumors of mesenchymal origin which develop from soft or bone tissues. Among the 100 different histological subtypes of sarcomas, the liposarcoma (LPS) is the second most frequent subtype after GIST (Gastrointestinal stromal tumors), accounting for 15-20% of all sarcomas. LPS prognosis is very heterogeneous and depends on the tumor location, histological subtype, grade and size, as well as on the quality of the surgery which
15 remains the most efficient therapeutic strategy so far. The risk of recurrence and metastatic dissemination of advanced LPS varies between 20 to 40% in case of localized tumors, mostly depending on the quality of surgery. In case of metastatic or non-resectable LPS, no cure is currently available and the median survival is around 15 months. Indeed, apart from surgery and radiotherapy, only few therapeutics have proven their effectiveness and are validated in the
20 management of sarcomas. Most of these therapies are chemotherapies, such as Doxorubicin, which show very low objective response rates, around 12%. A new targeted therapy, the tyrosine kinase inhibitor Pazopanib, has demonstrated its efficacy in patients with sarcomas. Unfortunately, it is not effective in LPS contrary to other sarcomas. Hence, finding new therapeutic strategies for LPS remains an urgent clinical challenge.

25 The most common subtypes of LPS are the well-differentiated LPS (WD-LPS) and the dedifferentiated (DD-LPS), that are characterized by the quasi-systematic amplification of the q13-15 region of chromosome 12 containing the *MDM2* gene which encodes a well-characterized negative regulator of the p53 tumor suppressor. The frequency of *MDM2* amplification is such (almost 100%) that it is currently used for routine diagnosis to distinguish
30 WD/DD-LPS from other sarcoma subtypes that more commonly harbor p53 mutations. This very peculiar genetic profile of WD/DD-LPS raises important questions regarding the strong selective pressure that leads to the systematic gene amplification of *MDM2* in LPS. The molecular mechanisms underlying this strong selective pressure for *MDM2* overexpression in LPS remains completely unknown. Although its oncogenic functions have been mainly

attributed to its role as a negative regulator of the p53 tumor suppressor, growing evidence indicates that MDM2 activities extend beyond p53.

At the molecular level, the pro-oncogenic properties of the MDM2 protein have been mainly attributed so far to its well-characterized E3 ubiquitin ligase activity targeting p53 for proteasomal degradation. This MDM2 function has been the rationale for the development of targeted therapies for tumors harboring wild-type p53 that aimed at blocking the interaction between p53 and MDM2 and reactivating p53 tumor suppressor functions. Although this class of inhibitors, which includes Nutlin3a (Nutlin) and its derivatives, efficiently stabilizes p53 in vitro, most clinical trials have shown that they provide a poor, if any, therapeutic benefit for LPS patients. Data from the inventors suggest that the low clinical efficiency of Nutlin in LPS reflects the strong stabilization of MDM2 that occurs upon Nutlin treatment, which potentiates p53-independent functions of MDM2 in metabolism the inventors. Briefly, the inventors showed that MDM2 is recruited to chromatin independently of p53 to regulate a transcriptional program involved in amino acids metabolism and more particularly in that of serine and glycine (Riscal et al., Mol Cell. 2016). Moreover, the inventors found that in contrast to other types of sarcomas, most, if not all, LPS display enhanced recruitment of MDM2 to chromatin and are highly dependent on serine and glycine metabolism. Finally, using a unique collection of LPS cell lines and patient-derived xenograft (PDX) mouse models, the inventors demonstrate that genetic or pharmacological targeting of chromatin-bound MDM2, or of the 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) enzyme that catalyzes the first limiting step of de novo serine synthesis, represent very efficient therapeutic strategies for LPS. Collectively, these data support the notion that the control of serine metabolism by chromatin-bound MDM2 is a key driving event of liposarcoma development. The inventors provide molecular evidences explaining the poor therapeutic response of LPS patients to Nutlin and define new therapeutic strategies for LPS based on a new class of MDM2 inhibitors.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The invention is defined by the claims.

The present invention relates to methods for the diagnosis of subjects suffering from liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction. The present invention also relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of liposarcoma.

The present invention also relates to methods and pharmaceutical compositions for the treatment of cancer types exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin and cancer types exhibiting exacerbated serine and glycine metabolism.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Data from the inventors indicate that MDM2 functions in serine metabolism are exacerbated in liposarcomas and support the notion that the selective pressure for *MDM2* amplification in LPS reflects their addiction to serine metabolism. Moreover, the inventors found that most, if not all, LPS cell lines, as well as fresh LPS patient samples, display increased levels of chromatin-bound MDM2 in comparison to other types of sarcomas. Moreover, the inventors demonstrate that DD-LPS cells lines are highly dependent on serine metabolism in vitro. Finally, using a unique collection of LPS cell lines and LPS patient-derived xenograft (PDX) mouse models, the inventors demonstrate that genetic or pharmacological inhibition of chromatin-bound MDM2, as well as targeting of key genes involved in serine metabolism or transport including *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH*, *SLC1A4* and strategies limiting serine availability or intake, represent very efficient therapeutic strategies for LPS. The inventors also provide molecular evidences explaining the poor therapeutic response of LPS patients to Nutlin, and demonstrate that chromatin-bound MDM2 and serine metabolism are critical for LPS development. The inventors also define new therapeutic strategies for LPS, cancer types exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin and cancer types exhibiting exacerbated serine and glycine metabolism based on a new class of MDM2 inhibitors that block chromatin-bound MDM2 activities and its effects on serine metabolism.

Accordingly, the present invention relates to an inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of cancer exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin.

In a further aspect, the present invention relates to an inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of cancer exhibiting exacerbated serine and glycine metabolism.

In a further aspect, the present invention relates to a MDM2 inhibitor for use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

In some embodiments, the present invention relates to an inhibitor of MDM2 recruitment to chromatin for use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

In some embodiments, the present invention relates to an inhibitor of MDM2 recruitment to chromatin by inducing its degradation for use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

In some embodiments, the present invention relates to an inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

As used herein, the term “subject” denotes a mammal. Typically, a subject according to the invention refers to any subject (preferably human) afflicted with or susceptible to be afflicted with liposarcoma. Typically, a subject according to the invention refers to any subject (preferably human) afflicted with or susceptible to be afflicted with liposarcoma exhibiting increased levels of chromatin-bound MDM2. In some embodiments, the term “subject” refers to any subject (preferably human) afflicted with or susceptible to be afflicted with liposarcoma resistant to inhibitors of targeting p53 and MDM2 interaction. In some embodiments, the term “subject” refers to any subject afflicted with or susceptible to be afflicted with liposarcoma receiving a serine and glycine deprived diet. In some embodiments, the term “subject” refers to any subject afflicted with or susceptible to be afflicted with cancer types exhibiting increased recruitment of MDM2 to chromatin, including liposarcoma, ovarian cancers, glioblastoma, breast cancers, melanoma, colorectal cancers, kidney cancers and lung cancer or cancer exhibiting exacerbated serine and glycine metabolism, including advanced melanoma and lung cancer.

The term “liposarcoma” or “LPS” has its general meaning in the art and refers to soft tissue sarcomas of mesenchymal origin such as revised in the World Health Organisation Classification ICD10 C49.9. The term “liposarcoma” also refers to well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma (WD- and DD-LPS). The term “liposarcoma” also relates to Malignant mesenchymal neoplasms, a type of soft tissue sarcoma, a group of lipomatous tumors of varying severity ranging from slow-growing to aggressive and metastatic. Liposarcomas are most often located in the lower extremities or retroperitoneum, but they can also occur in the upper extremities, neck, peritoneal cavity, spermatic cord, breast, vulva and axilla. The term “liposarcoma” also relates to Dedifferentiated liposarcoma and Well-differentiated liposarcoma. In some embodiments, the term “liposarcoma” refers to liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin and MDM2-mediated control of serine metabolism independently of p53. In some embodiments, the term “liposarcoma” refers to liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 protein interaction.

As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of subjects at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as subjects who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or

recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a subject during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a subject during treatment of an illness, e.g., to keep the subject in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

The term "MDM2" has its general meaning in the art and refers to mouse double minute 2. The term "MDM2" refers also refers to oncoprotein, E3 ubiquitin-protein ligase having the UniProtKB accession number Q00987.

The term "MDM2 inhibitor" has its general meaning in the art and refers to compounds that selectively blocks or inactivates MDM2. As used herein, the term "MDM2 inhibitor" according to the invention refers to compounds inhibiting the MDM2 recruitment to chromatin. The term "MDM2 inhibitor" also refers to inhibitors targeting MDM2-mediated control of serine metabolism. The term "MDM2 inhibitor" also refers to compounds inhibiting MDM2-mediated control of serine/glycine and glutathione metabolism. The term "MDM2 inhibitor" also refers to compounds inhibiting p53-independent functions of chromatin-bound MDM2 in serine metabolism. The term "MDM2 inhibitor" also refers to a compound that selectively blocks MDM2 translocation to chromatin. The term "MDM2 inhibitor" also refers to a compound that selectively induces MDM2 degradation. The term "MDM2 inhibitor" also refers to a compound that selectively blocks the MDM2 recruitment to chromatin, inhibits MDM2 and ATF3/4 (activating transcription factor 3 and 4) protein interaction and then inhibits the expression of genes involved in serine metabolism including phosphoglycerate dehydrogenase

(*PHGDH*), phosphoserine aminotransferase (*PSATI*), and phosphoserine phosphatase (*PSPH*) and solute carrier family 1 member 4 (*SLC1A4*). The term “MDM2 inhibitor” also refers to a compound that selectively blocks MDM2-mediated control of serine metabolism independently of p53. Compounds inhibiting MDM2-mediated control of serine metabolism or serine metabolism inhibitors refer to PHGDH inhibitors, PSAT inhibitors, PSPH inhibitors, and SLC1A4 inhibitors. As used herein, the term “selectively blocks or inactivates” refers to a compound that preferentially binds to and blocks or inactivates MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH, and SLC1A4 with a greater affinity and potency, respectively, than other ubiquitin-protein ligases, or related enzymes or related transporters. Compounds that block or inactivate MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH, and SLC1A4, but that may also block or inactivate other ubiquitin-protein ligases, enzymes related to PHGDH, PSAT, PSPH, or other members of the SLC1 family of proteins, as partial or full inhibitors, are contemplated. The term “MDM2 inhibitor” also refers to a compound that inhibits MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH, and SLC1A4 expression. Typically, a MDM2 inhibitor is a small organic molecule, a polypeptide, an aptamer, an antibody, an intra-antibody, an oligonucleotide or a ribozyme.

Tests and assays for determining whether a compound is a MDM2 inhibitor are well known by the skilled person in the art such as described in (Qin et al., 2016; US8329723).

The MDM2 inhibitors are well-known in the art as illustrated by (Qin et al., 2016; US8329723).

In one embodiment of the invention, the MDM2 inhibitor is selected from the group consisting of SP141, 6-Methoxy-1-naphthalen-2-yl-9H- β -carboline; SP141 nanoparticles (SP141NP); SP141-loaded IgG Fc-conjugated maleimidyl-poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) (Mal-PEG-PCL) nanoparticles (SP141FcNP); 6-Methoxy-1-quinolin-4-yl-9H- β -carboline; 6-Methoxy-1-naphthalen-1-yl-9H- β -carboline; 6-Methoxy-1-phenanthren-9-yl-9H- β -carboline; 7-Methoxy-1-phenanthren-9-yl-9H- β -carboline; miR-509-5p; shRNA and compounds described in Qin et al., 2016 ; US8329723.

In some embodiment, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention in combination with ATF3 inhibitor and/or ATF4 inhibitor for use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

In some embodiments, the MDM2 inhibitor of the invention is a PHGDH inhibitor.

The term “PHGDH” has its general meaning in the art and refers to phosphoglycerate dehydrogenase having the UniProtKB accession number O43175, Catalyzes the oxidation of 3-phosphoglycerate (3PG) to 3-phosphohydroxypyruvate (3P-Pyr), the first step of the serine biosynthesis pathway.

Tests and assays for determining whether a compound is a PHGDH inhibitor are well known by the skilled person in the art such as described in (Hamanak et al., 2017; Wang et al., 2017; Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016).

5 The PHGDH inhibitors are well-known in the art as illustrated by (Hamanak et al., 2017; Wang et al., 2017; Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016).

In one embodiment of the invention, the PHGDH inhibitor is selected from the group consisting of CBR-5884; CBR-5807 (Disulfiram); CBR-6936; CBR-9480; Piperazine-1-carbothioamide PHGDH inhibitors such as NCT-503 and NCT-502; PKUMDL-WQ-2101; PKUMDL-WQ-2201; PKUMDL-WQ-2202; PKUMDL-WQ-2203; shRNA (Hamanak et al., 10 2017; Wang et al., 2017; Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016).

In some embodiments, the MDM2 inhibitor of the invention is a PSAT inhibitor.

The term “PSAT” has its general meaning in the art and refers to phosphoserine aminotransferase having the UniProtKB accession number Q9Y617, catalyzes the conversion of 3-phosphohydroxypyruvate (3P-Pyr) to 3-phosphoserine (3P-Ser).

15 Tests and assays for determining whether a compound is a PSAT inhibitor are well known by the skilled person in the art such as described in (Ye et al., 2012).

The PSAT inhibitors are well-known in the art as illustrated by (Ye et al., 2012).

In one embodiment of the invention, the PSAT inhibitor is selected from the group consisting of siRNA described in (Ye et al., 2012) and shRNA.

20 In some embodiments, the MDM2 inhibitor of the invention is a PSPH inhibitor.

The term “PSPH” has its general meaning in the art and refers to phosphoserine phosphatase having the UniProtKB accession number P78330, catalyzes the last step in the biosynthesis of serine, the conversion of 3-phosphoserine (3P-Ser) to serine.

25 Tests and assays for determining whether a compound is a PSPH inhibitor are well known by the skilled person in the art such as described in (US 20140087970).

The PSPH inhibitors are well-known in the art as illustrated by (US 20140087970).

In one embodiment of the invention, the PSPH inhibitor is selected from the group consisting of AP3; shRNA and compounds described in (US 20140087970).

In some embodiments, the MDM2 inhibitor of the invention is a SLC1A4 inhibitor.

30 The term “SLC1A4” has its general meaning in the art and refers to Solute Carrier Family 1 Member 4, the neutral amino acid transporter of serine having the UniProtKB accession number P43007. The term “SLC1A4” also refers to ASCT1, the Alanine/Serine/Cysteine/Threonine Transporter 1.

Tests and assays for determining whether a compound is a SLC1A4 inhibitor are well known by the skilled person in the art such as described in (Foster et al., 2017).

The SLC1A4 inhibitors are well-known in the art as illustrated by (Foster et al., 2017).

In one embodiment of the invention, the SLC1A4 inhibitor is selected from the group consisting of Phenylglycine analogs such as L-4CIPG; shRNA and compounds described in (Foster et al., 2017).

In another embodiment, the MDM2 inhibitor and serine metabolism inhibitor of the invention is an aptamer. Aptamers are a class of molecule that represents an alternative to antibodies in term of molecular recognition. Aptamers are oligonucleotide sequences with the capacity to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity. Such ligands may be isolated through Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) of a random sequence library, as described in Tuerk C. and Gold L., 1990. The random sequence library is obtainable by combinatorial chemical synthesis of DNA. In this library, each member is a linear oligomer, eventually chemically modified, of a unique sequence. Possible modifications, uses and advantages of this class of molecules have been reviewed in Jayasena S.D., 1999. Peptide aptamers consists of a conformationally constrained antibody variable region displayed by a platform protein, such as E. coli Thioredoxin A that are selected from combinatorial libraries by two hybrid methods (Colas et al., 1996). Then after raising aptamers directed against MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 of the invention as above described, the skilled man in the art can easily select those inhibiting MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4.

In another embodiment, the MDM2 inhibitor and serine metabolism inhibitor of the invention is an antibody (the term including “antibody portion”) directed against MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4.

In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the antibody is a monoclonal antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the antibody is a polyclonal antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the antibody is a humanized antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the antibody is a chimeric antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a light chain of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a heavy chain of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a Fab portion of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions

thereof described herein, the portion of the antibody comprises a F(ab')₂ portion of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a Fc portion of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a Fv portion of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises a variable domain of the antibody. In one embodiment of the antibodies or portions thereof described herein, the portion of the antibody comprises one or more CDR domains of the antibody.

As used herein, "antibody" includes both naturally occurring and non-naturally occurring antibodies. Specifically, "antibody" includes polyclonal and monoclonal antibodies, and monovalent and divalent fragments thereof. Furthermore, "antibody" includes chimeric antibodies, wholly synthetic antibodies, single chain antibodies, and fragments thereof. The antibody may be a human or nonhuman antibody. A nonhuman antibody may be humanized by recombinant methods to reduce its immunogenicity in man.

Antibodies are prepared according to conventional methodology. Monoclonal antibodies may be generated using the method of Kohler and Milstein (Nature, 256:495, 1975). To prepare monoclonal antibodies useful in the invention, a mouse or other appropriate host animal is immunized at suitable intervals (e.g., twice-weekly, weekly, twice-monthly or monthly) with antigenic forms of MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4. The animal may be administered a final "boost" of antigen within one week of sacrifice. It is often desirable to use an immunologic adjuvant during immunization. Suitable immunologic adjuvants include Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, alum, Ribi adjuvant, Hunter's Titermax, saponin adjuvants such as QS21 or Quil A, or CpG-containing immunostimulatory oligonucleotides. Other suitable adjuvants are well-known in the field. The animals may be immunized by subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, intranasal administration or other routes. A given animal may be immunized with multiple forms of the antigen by multiple routes.

Briefly, the antigen may be provided as synthetic peptides corresponding to antigenic regions of interest in MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4. Following the immunization regimen, lymphocytes are isolated from the spleen, lymph node or other organ of the animal and fused with a suitable myeloma cell line using an agent such as polyethylene glycol to form a hybridoma. Following fusion, cells are placed in media permissive for growth of hybridomas but not the fusion partners using standard methods, as described (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal

Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996). Following culture of the hybridomas, cell supernatants are analyzed for the presence of antibodies of the desired specificity, i.e., that selectively bind the antigen. Suitable analytical techniques include ELISA, flow cytometry, immunoprecipitation, and western blotting. Other screening techniques are well-known in the field. Preferred techniques are those that confirm binding of antibodies to conformationally intact, natively folded antigen, such as non-denaturing ELISA, flow cytometry, and immunoprecipitation.

Significantly, as is well-known in the art, only a small portion of an antibody molecule, the paratope, is involved in the binding of the antibody to its epitope (see, in general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). The Fc' and Fc regions, for example, are effectors of the complement cascade but are not involved in antigen binding. An antibody from which the pFc' region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the pFc' region, designated an F(ab')₂ fragment, retains both of the antigen binding sites of an intact antibody. Similarly, an antibody from which the Fc region has been enzymatically cleaved, or which has been produced without the Fc region, designated an Fab fragment, retains one of the antigen binding sites of an intact antibody molecule. Proceeding further, Fab fragments consist of a covalently bound antibody light chain and a portion of the antibody heavy chain denoted Fd. The Fd fragments are the major determinant of antibody specificity (a single Fd fragment may be associated with up to ten different light chains without altering antibody specificity) and Fd fragments retain epitope-binding ability in isolation.

Within the antigen-binding portion of an antibody, as is well-known in the art, there are complementarity determining regions (CDRs), which directly interact with the epitope of the antigen, and framework regions (FRs), which maintain the tertiary structure of the paratope (see, in general, Clark, 1986; Roitt, 1991). In both the heavy chain Fd fragment and the light chain of IgG immunoglobulins, there are four framework regions (FR1 through FR4) separated respectively by three complementarity determining regions (CDR1 through CDR3). The CDRs, and in particular the CDR3 regions, and more particularly the heavy chain CDR3, are largely responsible for antibody specificity.

It is now well-established in the art that the non CDR regions of a mammalian antibody may be replaced with similar regions of conspecific or heterospecific antibodies while retaining the epitopic specificity of the original antibody. This is most clearly manifested in the

development and use of "humanized" antibodies in which non-human CDRs are covalently joined to human FR and/or Fc/pFc' regions to produce a functional antibody.

This invention provides in certain embodiments compositions and methods that include humanized forms of antibodies. As used herein, "humanized" describes antibodies wherein
5 some, most or all of the amino acids outside the CDR regions are replaced with corresponding amino acids derived from human immunoglobulin molecules. Methods of humanization include, but are not limited to, those described in U.S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 and 5,859,205, which are hereby incorporated by reference. The above U.S. Pat. Nos. 5,585,089 and 5,693,761, and WO 90/07861 also propose four
10 possible criteria which may use in designing the humanized antibodies. The first proposal was that for an acceptor, use a framework from a particular human immunoglobulin that is unusually homologous to the donor immunoglobulin to be humanized, or use a consensus framework from many human antibodies. The second proposal was that if an amino acid in the framework of the human immunoglobulin is unusual and the donor amino acid at that position is typical for
15 human sequences, then the donor amino acid rather than the acceptor may be selected. The third proposal was that in the positions immediately adjacent to the 3 CDRs in the humanized immunoglobulin chain, the donor amino acid rather than the acceptor amino acid may be selected. The fourth proposal was to use the donor amino acid residue at the framework positions at which the amino acid is predicted to have a side chain atom within 3Å of the CDRs in a three
20 dimensional model of the antibody and is predicted to be capable of interacting with the CDRs. The above methods are merely illustrative of some of the methods that one skilled in the art could employ to make humanized antibodies. One of ordinary skill in the art will be familiar with other methods for antibody humanization.

In one embodiment of the humanized forms of the antibodies, some, most or all of the
25 amino acids outside the CDR regions have been replaced with amino acids from human immunoglobulin molecules but where some, most or all amino acids within one or more CDR regions are unchanged. Small additions, deletions, insertions, substitutions or modifications of amino acids are permissible as long as they would not abrogate the ability of the antibody to bind a given antigen. Suitable human immunoglobulin molecules would include IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA and IgM molecules. A "humanized" antibody retains a similar antigenic
30 specificity as the original antibody. However, using certain methods of humanization, the affinity and/or specificity of binding of the antibody may be increased using methods of "directed evolution", as described by Wu et al., /. Mol. Biol. 294:151, 1999, the contents of which are incorporated herein by reference.

Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,591,669, 5,598,369, 5,545,806, 5,545,807, 6,150,584, and references cited therein, the contents of which are incorporated herein by reference. These animals have been genetically modified such that there is a functional deletion in the production of endogenous (e.g., murine) antibodies. The animals are further modified to contain all or a portion of the human germ-line immunoglobulin gene locus such that immunization of these animals will result in the production of fully human antibodies to the antigen of interest. Following immunization of these mice (e.g., XenoMouse (Abgenix), HuMAb mice (Medarex/GenPharm)), monoclonal antibodies can be prepared according to standard hybridoma technology. These monoclonal antibodies will have human immunoglobulin amino acid sequences and therefore will not provoke human anti-mouse antibody (KAMA) responses when administered to humans.

In vitro methods also exist for producing human antibodies. These include phage display technology (U.S. Pat. Nos. 5,565,332 and 5,573,905) and in vitro stimulation of human B cells (U.S. Pat. Nos. 5,229,275 and 5,567,610). The contents of these patents are incorporated herein by reference.

Thus, as will be apparent to one of ordinary skill in the art, the present invention also provides for F(ab')₂ Fab, Fv and Fd fragments; chimeric antibodies in which the Fc and/or FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric F(ab')₂ fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; chimeric Fab fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 and/or light chain CDR3 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences; and chimeric Fd fragment antibodies in which the FR and/or CDR1 and/or CDR2 regions have been replaced by homologous human or non-human sequences. The present invention also includes so-called single chain antibodies.

The various antibody molecules and fragments may derive from any of the commonly known immunoglobulin classes, including but not limited to IgA, secretory IgA, IgE, IgG and IgM. IgG subclasses are also well known to those in the art and include but are not limited to human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. In a preferred embodiment, the MDM2 inhibitor and serine metabolism inhibitor of the invention is a Human IgG4.

In some embodiments, the invention provides a multispecific antibody comprising a first antigen binding site from an antibody of the present invention directed against MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH or SLC1A4 and at least one second antigen binding site.

In some embodiments, the second antigen-binding site binds to ATF3 or ATF4.

5 In some embodiments, the second antigen-binding site is used for recruiting a killing mechanism such as, for example, by binding an antigen on a human effector cell as a BiTE (Bispecific T-Cell engager) antibody which is a bispecific scFv2 directed against target antigen and CD3 on T cells described in US7235641, or by binding a cytotoxic agent or a second therapeutic agent. As used herein, the term "effector cell" refers to an immune cell which is
10 involved in the effector phase of an immune response, as opposed to the cognitive and activation phases of an immune response. Exemplary immune cells include a cell of a myeloid or lymphoid origin, for instance lymphocytes (such as B cells and T cells including cytolytic T cells (CTLs)), killer cells, natural killer cells, macrophages, monocytes, mast cells and granulocytes, such as neutrophils, eosinophils and basophils. Some effector cells express
15 specific Fc receptors (FcRs) and carry out specific immune functions. In some embodiments, an effector cell is capable of inducing ADCC, such as a natural killer cell. For example, monocytes, macrophages, which express FcRs, are involved in specific killing of target cells and presenting antigens to other components of the immune system. In some embodiments, an effector cell may phagocytose a target antigen or target cell. The expression of a particular FcR
20 on an effector cell may be regulated by humoral factors such as cytokines. An effector cell can phagocytose a target antigen or phagocytose or lyse a target cell. Suitable cytotoxic agents and second therapeutic agents are exemplified below, and include toxins (such as radiolabeled peptides), chemotherapeutic agents and prodrugs.

25 In some embodiments, the second antigen-binding site binds a tissue-specific antigen, promoting localization of the bispecific antibody to a specific tissue.

In some embodiments, the second antigen-binding site binds to an antigen located on the same type of cell as the [MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4]-expressing cell, typically a tumor-associated antigen (TAA), but has a binding specificity different from that of the first antigen-binding site. Such multi- or bispecific antibodies can enhance the specificity
30 of the tumor cell binding and/or engage multiple effector pathways. Alternatively, the second antigen-binding site binds to a different epitope of [MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH or SLC1A4]. The second antigen-binding site may alternatively bind an angiogenic factor or other cancer-associated growth factor, such as a vascular endothelial growth factor, a fibroblast

growth factor, epidermal growth factor, angiogenin or a receptor of any of these, particularly receptors associated with cancer progression.

In some embodiments, the second antigen-binding site is from a second antibody or ADC of the invention, such as the antibody of the present invention.

5 Exemplary formats for the multispecific antibody molecules of the invention include, but are not limited to (i) two antibodies cross-linked by chemical heteroconjugation, one with a specificity to [MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH or SLC1A4] and another with a specificity to a second antigen; (ii) a single antibody that comprises two different antigen-binding regions; (iii) a single-chain antibody that comprises two different antigen-binding regions, e.g., two
10 scFvs linked in tandem by an extra peptide linker; (iv) a dual-variable-domain antibody (DVD-Ig), where each light chain and heavy chain contains two variable domains in tandem through a short peptide linkage (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In : Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) a chemically-linked bispecific (Fab')₂ fragment; (vi) a Tandab, which
15 is a fusion of two single chain diabodies resulting in a tetravalent bispecific antibody that has two binding sites for each of the target antigens; (vii) a flexibody, which is a combination of scFvs with a diabody resulting in a multivalent molecule; (viii) a so called "dock and lock" molecule, based on the "dimerization and docking domain", which, when applied to Fabs, can yield a trivalent bispecific binding protein consisting of two identical Fab fragments linked to
20 a different Fab fragment; (ix) a so-called Scorpion molecule, comprising, e.g., two scFvs fused to both termini of a human Fab-arm; and (x) a diabody. Another exemplary format for bispecific antibodies is IgG-like molecules with complementary CH₃ domains to force heterodimerization. Such molecules can be prepared using known technologies, such as, e.g., those known as Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole
25 (Genentech), CrossMAb (Roche) and electrostatically-matched (Amgen), LUZ-Y (Genentech), Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody)(EMD Serono), Biclonic (Merus) and DuoBody (Genmab A/S) technologies.

In some embodiments, the bispecific antibody is obtained or obtainable via a controlled Fab-arm exchange, typically using DuoBody technology. In vitro methods for producing
30 bispecific antibodies by controlled Fab-arm exchange have been described in WO2008119353 and WO 2011131746 (both by Genmab A/S). In one exemplary method, described in WO 2008119353, a bispecific antibody is formed by "Fab-arm" or "half- molecule" exchange (swapping of a heavy chain and attached light chain) between two monospecific antibodies, both comprising IgG4-like CH₃ regions, upon incubation under reducing conditions. The

resulting product is a bispecific antibody having two Fab arms which may comprise different sequences. In another exemplary method, described in WO 2011131746, bispecific antibodies of the present invention are prepared by a method comprising the following steps, wherein at least one of the first and second antibodies is the antibody of the present invention : a) providing
5 a first antibody comprising an Fc region of an immunoglobulin, said Fc region comprising a first CH3 region; b) providing a second antibody comprising an Fc region of an immunoglobulin, said Fc region comprising a second CH3 region; wherein the sequences of said first and second CH3 regions are different and are such that the heterodimeric interaction between said first and second CH3 regions is stronger than each of the homodimeric interactions
10 of said first and second CH3 regions; c) incubating said first antibody together with said second antibody under reducing conditions; and d) obtaining said bispecific antibody, wherein the first antibody is the antibody of the present invention and the second antibody has a different binding specificity, or vice versa. The reducing conditions may, for example, be provided by adding a reducing agent, e.g. selected from 2-mercaptoethylamine, dithiothreitol and tris(2-
15 carboxyethyl)phosphine. Step d) may further comprise restoring the conditions to become non-reducing or less reducing, for example by removal of a reducing agent, e.g. by desalting. Preferably, the sequences of the first and second CH3 regions are different, comprising only a few, fairly conservative, asymmetrical mutations, such that the heterodimeric interaction between said first and second CH3 regions is stronger than each of the homodimeric interactions
20 of said first and second CH3 regions. More details on these interactions and how they can be achieved are provided in WO 2011131746, which is hereby incorporated by reference in its entirety. The following are exemplary embodiments of combinations of such asymmetrical mutations, optionally wherein one or both Fc-regions are of the IgG1 isotype.

In another embodiment, the antibody according to the invention is a single domain
25 antibody. The term "single domain antibody" (sdAb) or "VHH" refers to the single heavy chain variable domain of antibodies of the type that can be found in Camelid mammals which are naturally devoid of light chains. Such VHH are also called "nanobody®". According to the invention, sdAb can particularly be llama sdAb. The term "VHH" refers to the single heavy chain having 3 complementarity determining regions (CDRs): CDR1, CDR2 and CDR3. The
30 term "complementarity determining region" or "CDR" refers to the hypervariable amino acid sequences which define the binding affinity and specificity of the VHH.

The VHH according to the invention can readily be prepared by an ordinarily skilled artisan using routine experimentation. The VHH variants and modified form thereof may be produced under any known technique in the art such as in-vitro maturation.

VHHs or sdAbs are usually generated by PCR cloning of the V-domain repertoire from blood, lymph node, or spleen cDNA obtained from immunized animals into a phage display vector, such as pHEN2. Antigen-specific VHHs are commonly selected by panning phage libraries on immobilized antigen, e.g., antigen coated onto the plastic surface of a test tube, 5 biotinylated antigens immobilized on streptavidin beads, or membrane proteins expressed on the surface of cells. However, such VHHs often show lower affinities for their antigen than VHHs derived from animals that have received several immunizations. The high affinity of VHHs from immune libraries is attributed to the natural selection of variant VHHs during clonal expansion of B-cells in the lymphoid organs of immunized animals. The affinity of VHHs from 10 non-immune libraries can often be improved by mimicking this strategy in vitro, i.e., by site directed mutagenesis of the CDR regions and further rounds of panning on immobilized antigen under conditions of increased stringency (higher temperature, high or low salt concentration, high or low pH, and low antigen concentrations). VHHs derived from camelid are readily expressed in and purified from the *E. coli* periplasm at much higher levels than the 15 corresponding domains of conventional antibodies. VHHs generally display high solubility and stability and can also be readily produced in yeast, plant, and mammalian cells. For example, the “Hamers patents” describe methods and techniques for generating VHH against any desired target (see for example US 5,800,988; US 5,874, 541 and US 6,015,695). The “Hamers patents” more particularly describe production of VHHs in bacterial hosts such as *E. coli* (see for 20 example US 6,765,087) and in lower eukaryotic hosts such as moulds (for example *Aspergillus* or *Trichoderma*) or in yeast (for example *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* or *Pichia*) (see for example US 6,838,254).

In one embodiment, the MDM2 inhibitor and serine metabolism inhibitor of the invention is an MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4 expression inhibitor.

25 The term “expression” when used in the context of expression of a gene or nucleic acid refers to the conversion of the information, contained in a gene, into a gene product. A gene product can be the direct transcriptional product of a gene (e.g., mRNA, tRNA, rRNA, antisense RNA, ribozyme, structural RNA or any other type of RNA) or a protein produced by translation of a mRNA. Gene products also include messenger RNAs, which are modified, by processes 30 such as capping, polyadenylation, methylation, and editing, and proteins (e.g., MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4) modified by, for example, methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, SUMOylation, ADP-ribosylation, myristilation, and glycosylation.

An “inhibitor of expression” refers to a natural or synthetic compound that has a biological effect to inhibit the expression of a gene.

Expression inhibitors for use in the present invention may be based on antisense oligonucleotide constructs. Anti-sense oligonucleotides, including anti-sense RNA molecules and anti-sense DNA molecules, would act to directly block the translation of mRNA by binding thereto and thus preventing protein translation or increasing mRNA degradation, thus decreasing the level of proteins, and thus activity, in a cell. For example, antisense oligonucleotides of at least about 15 bases and complementary to unique regions of the mRNA transcript sequence encoding MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4 can be synthesized, e.g., by conventional phosphodiester techniques and administered by e.g., intravenous injection or infusion. Methods for using antisense techniques for specifically alleviating gene expression of genes whose sequence is known are well known in the art (e.g. see U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; and 5,981,732).

Small inhibitory RNAs (siRNAs) and short hairpin RNAs (shRNAs) can also function as expression inhibitors for use in the present invention. Gene expression can be reduced by contacting the subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a small double stranded RNA, such that *MDM2*, *PHGDH*, *PSAT*, *PSPH* and *SLC1A4* expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Methods for selecting an appropriate dsRNA or dsRNA-encoding vector are well known in the art for genes whose sequence is known (e.g. see Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); U.S. Pat. Nos. 6,573,099 and 6,506,559; and International Patent Publication Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, and WO 01/68836).

Ribozymes can also function as expression inhibitors for use in the present invention. Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Engineered hairpin or hammerhead motif ribozyme molecules that specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of mRNA sequences are thereby useful within the scope of the present invention. Specific ribozyme cleavage sites within any potential RNA target are initially identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites, which typically include the following sequences, GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between about 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target gene containing the cleavage site can be evaluated for predicted structural features, such as secondary

structure, that can render the oligonucleotide sequence unsuitable. The suitability of candidate targets can also be evaluated by testing their accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides, using, e.g., ribonuclease protection assays.

5 Both antisense oligonucleotides and ribozymes useful as inhibitors of expression can be prepared by known methods. These include techniques for chemical synthesis such as, e.g., by solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, anti-sense RNA molecules can be generated by in vitro or in vivo transcription of DNA sequences encoding the RNA molecule. Such DNA sequences can be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Various
10 modifications to the oligonucleotides of the invention can be introduced as a means of increasing intracellular stability and half-life. Possible modifications include but are not limited to the addition of flanking sequences of ribonucleotides or deoxyribonucleotides to the 5' and/or 3' ends of the molecule, or the use of phosphorothioate or 2'-O-methyl rather than phosphodiesterase linkages within the oligonucleotide backbone.

15 Antisense oligonucleotides siRNAs and ribozymes of the invention may be delivered in vivo alone or in association with a vector. In its broadest sense, a "vector" is any vehicle capable of facilitating the transfer of the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid to the cells and preferably cells expressing MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and SLC1A4. Preferably, the vector transports the nucleic acid to cells with reduced degradation relative to
20 the extent of degradation that would result in the absence of the vector. In general, the vectors useful in the invention include, but are not limited to, plasmids, phagemids, viruses, other vehicles derived from viral or bacterial sources that have been manipulated by the insertion or incorporation of the antisense oligonucleotide siRNA or ribozyme nucleic acid sequences. Viral vectors are a preferred type of vector and include, but are not limited to nucleic acid sequences
25 from the following viruses: retrovirus, such as moloney murine leukemia virus, harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rouse sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus; and RNA virus such as a retrovirus. One can readily employ other vectors not named but known to the art.

30 Preferred viral vectors are based on non-cytopathic eukaryotic viruses in which non-essential genes have been replaced with the gene of interest. Non-cytopathic viruses include retroviruses (e.g., lentivirus), the life cycle of which involves reverse transcription of genomic viral RNA into DNA with subsequent proviral integration into host cellular DNA. Retroviruses have been approved for human gene therapy trials. Most useful are those retroviruses that are

replication-deficient (i.e., capable of directing synthesis of the desired proteins, but incapable of manufacturing an infectious particle). Such genetically altered retroviral expression vectors have general utility for the high-efficiency transduction of genes *in vivo*. Standard protocols for producing replication-deficient retroviruses (including the steps of incorporation of exogenous genetic material into a plasmid, transfection of a packaging cell lined with plasmid, production of recombinant retroviruses by the packaging cell line, collection of viral particles from tissue culture media, and infection of the target cells with viral particles) are provided in KRIEGLER (A Laboratory Manual," W.H. Freeman C.O., New York, 1990) and in MURRY ("Methods in Molecular Biology," vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

10 Preferred viruses for certain applications are the adeno-viruses and adeno-associated viruses, which are double-stranded DNA viruses that have already been approved for human use in gene therapy. The adeno-associated virus can be engineered to be replication deficient and is capable of infecting a wide range of cell types and species. It further has advantages such as, heat and lipid solvent stability; high transduction frequencies in cells of diverse lineages, including hematopoietic cells; and lack of superinfection inhibition thus allowing multiple series of transductions. Reportedly, the adeno-associated virus can integrate into human cellular DNA in a site-specific manner, thereby minimizing the possibility of insertional mutagenesis and variability of inserted gene expression characteristic of retroviral infection. In addition, wild-type adeno-associated virus infections have been followed in tissue culture for greater than 20 100 passages in the absence of selective pressure, implying that the adeno-associated virus genomic integration is a relatively stable event. The adeno-associated virus can also function in an extrachromosomal fashion.

Other vectors include plasmid vectors. Plasmid vectors have been extensively described in the art and are well known to those of skill in the art. See e.g., SANBROOK et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. In the last few years, plasmid vectors have been used as DNA vaccines for delivering antigen-encoding genes to cells *in vivo*. They are particularly advantageous for this because they do not have the same safety concerns as with many of the viral vectors. These plasmids, however, having a promoter compatible with the host cell, can express a peptide from a gene operatively encoded within the plasmid. Some commonly used plasmids include pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, and pBlueScript. Other plasmids are well known to those of ordinary skill in the art. Additionally, plasmids may be custom designed using restriction enzymes and ligation reactions to remove and add specific fragments of DNA. Plasmids may be delivered by a variety of parenteral, mucosal and topical routes. For example, the DNA plasmid can be

injected by intramuscular, intradermal, subcutaneous, or other routes. It may also be administered by intranasal sprays or drops, rectal suppository and orally. It may also be administered into the epidermis or a mucosal surface using a gene-gun. The plasmids may be given in an aqueous solution, dried onto gold particles or in association with another DNA delivery system including but not limited to liposomes, dendrimers, cochleate and microencapsulation.

Typically the inhibitors according to the invention as described above are administered to the subject in a therapeutically effective amount.

By a "therapeutically effective amount" of the inhibitor of the present invention as above described is meant a sufficient amount of the inhibitor for treating cancer at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood, however, that the total daily usage of the inhibitors and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific inhibitor employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific inhibitor employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific inhibitor employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the inhibitor at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the inhibitor of the present invention for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the inhibitor of the present invention, preferably from 1 mg to about 100 mg of the inhibitor of the present invention. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

In a particular embodiment, the compound according to the invention may be used in a concentration between 0.01 μ M and 20 μ M, particularly, the compound of the invention may be used in a concentration of 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μ M.

According to the invention, the compound of the present invention is administered to the subject in the form of a pharmaceutical composition. Typically, the compound of the present invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form therapeutic compositions.

5 "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type.

10 In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel
15 capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms.

Typically, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are
20 pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions. The
25 pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against
30 the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the

growth of microorganisms. The compound of the present invention can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized agent of the present inventions into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the typical methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the compound of the present invention plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The preparation of more, or highly concentrated solutions for direct injection is also contemplated, where the use of DMSO as solvent is envisioned to result in extremely rapid penetration, delivering high concentrations of the active agents to a small tumor area. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic

with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

In some embodiment, the MDM2 inhibitor of the invention is administered in combination with an ATF3 inhibitor and/or an ATF4 inhibitor.

In some embodiments, the compound of the present invention is used as neo-adjuvant in the treatment of liposarcoma.

In some embodiments, the compound of the present invention is used in combination with strategies aiming at limiting serine and glycine availability, including specific diet such as serine and glycine deprived diet, in the treatment of liposarcoma.

In some embodiments, the compound of the present invention is administered sequentially or concomitantly with one or more therapeutic active agent such as chemotherapeutic or radiotherapeutic agents.

In some embodiments, the compound of the present invention is administered with a chemotherapeutic agent. The term "chemotherapeutic agent" refers to chemical compounds that are effective in inhibiting tumor growth. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; acetogenins (especially bullatacin and bullatacinone); a camptothecin (including the synthetic analogue topotecan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (including its adozelesin, carzelesin and bizelesin synthetic analogues); cryptophycins (particularly cryptophycin 1 and cryptophycin 8); dolastatin; duocarmycin (including the synthetic analogues, KW-2189 and CBI-TMI); eleutherobin; pancratiastatin; a sarcodictyin; spongistatin; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as the enediyne antibiotics (e.g. calicheamicin, especially calicheamicin 11 and calicheamicin 211, see, e.g., Agnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); dynemicin, including dynemicin A; an esperamicin; as well as

neocarzinostatin chromophore and related chromoprotein enediyne antiobiotic chromomophores), aclacinomysins, actinomycin, aithramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, carabycin, canninomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin (including morpholino-doxorubicin, cyanomorpholino-doxorubicin, 2-pyrrolino-doxorubicin and deoxydoxorubicin), 5
epirubicin, esorubicin, idanrbicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalarnycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptomgrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, 10
methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiothane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; 15
aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; an epothilone; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; maytansinoids such as maytansine and ansamitocins; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK®; 20
razoxane; rhizoxin; sizofiran; spirogennanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2',2"-trichlorotriethylamine; trichothecenes (especially T-2 toxin, verracurin A, roridinA and anguidine); urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobromtol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, e.g. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 25
chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-1 1 ; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; 30
capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are antihormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide,

bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

5 In some embodiments, the compound of the present invention is administered with a targeted cancer therapy. Targeted cancer therapies are drugs or other substances that block the growth and spread of cancer by interfering with specific molecules ("molecular targets") that are involved in the growth, progression, and spread of cancer. Targeted cancer therapies are sometimes called "molecularly targeted drugs", "molecularly targeted therapies", "precision medicines", or similar names. In some embodiments, the targeted therapy consists of administering the subject with a tyrosine kinase inhibitor as defined above.

10 In some embodiments, compound of the present invention is administered with an immunotherapeutic agent. The term "immunotherapeutic agent," as used herein, refers to a compound, composition or treatment that indirectly or directly enhances, stimulates or increases the body's immune response against cancer cells and/or that decreases the side effects of other anticancer therapies. Immunotherapy is thus a therapy that directly or indirectly stimulates or
15 enhances the immune system's responses to cancer cells and/or lessens the side effects that may have been caused by other anti-cancer agents. Immunotherapy is also referred to in the art as immunologic therapy, biological therapy biological response modifier therapy and biotherapy. Examples of common immunotherapeutic agents known in the art include, but are not limited to, cytokines, cancer vaccines, monoclonal antibodies and non-cytokine adjuvants.
20 Alternatively the immunotherapeutic treatment may consist of administering the subject with an amount of immune cells (T cells, NK, cells, dendritic cells, B cells...). Immunotherapeutic agents can be non-specific, i.e. boost the immune system generally so that the human body becomes more effective in fighting the growth and/or spread of cancer cells, or they can be specific, i.e. targeted to the cancer cells themselves immunotherapy regimens may combine the
25 use of non-specific and specific immunotherapeutic agents. Non-specific immunotherapeutic agents are substances that stimulate or indirectly improve the immune system. Non-specific immunotherapeutic agents have been used alone as a main therapy for the treatment of cancer, as well as in addition to a main therapy, in which case the non-specific immunotherapeutic agent functions as an adjuvant to enhance the effectiveness of other therapies (e.g. cancer
30 vaccines). Non-specific immunotherapeutic agents can also function in this latter context to reduce the side effects of other therapies, for example, bone marrow suppression induced by certain chemotherapeutic agents. Non-specific immunotherapeutic agents can act on key immune system cells and cause secondary responses, such as increased production of cytokines and immunoglobulins. Alternatively, the agents can themselves comprise cytokines. Non-

specific immunotherapeutic agents are generally classified as cytokines or non-cytokine adjuvants. A number of cytokines have found application in the treatment of cancer either as general non-specific immunotherapies designed to boost the immune system, or as adjuvants provided with other therapies. Suitable cytokines include, but are not limited to, interferons, interleukins and colony-stimulating factors. Interferons (IFNs) contemplated by the present invention include the common types of IFNs, IFN-alpha (IFN- α), IFN-beta (IFN- β) and IFN-gamma (IFN- γ). IFNs can act directly on cancer cells, for example, by slowing their growth, promoting their development into cells with more normal behaviour and/or increasing their production of antigens thus making the cancer cells easier for the immune system to recognise and destroy. IFNs can also act indirectly on cancer cells, for example, by slowing down angiogenesis, boosting the immune system and/or stimulating natural killer (NK) cells, T cells and macrophages. Recombinant IFN-alpha is available commercially as Roferon (Roche Pharmaceuticals) and Intron A (Schering Corporation). Interleukins contemplated by the present invention include IL-2, IL-4, IL-11 and IL-12. Examples of commercially available recombinant interleukins include Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) and Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Zymogenetics, Inc. (Seattle, Wash.) is currently testing a recombinant form of IL-21, which is also contemplated for use in the combinations of the present invention. Colony-stimulating factors (CSFs) contemplated by the present invention include granulocyte colony stimulating factor (G-CSF or filgrastim), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF or sargramostim) and erythropoietin (epoetin alfa, darbepoietin). Treatment with one or more growth factors can help to stimulate the generation of new blood cells in subjects undergoing traditional chemotherapy. Accordingly, treatment with CSFs can be helpful in decreasing the side effects associated with chemotherapy and can allow for higher doses of chemotherapeutic agents to be used. Various-recombinant colony stimulating factors are available commercially, for example, Neupogen® (G-CSF; Amgen), Neulasta (pelfilgrastim; Amgen), Leukine (GM-CSF; Berlex), Procrit (erythropoietin; Ortho Biotech), Epogen (erythropoietin; Amgen), Arnesp (erythropoietin). In addition to having specific or non-specific targets, immunotherapeutic agents can be active, i.e. stimulate the body's own immune response, or they can be passive, i.e. comprise immune system components that were generated external to the body. Passive specific immunotherapy typically involves the use of one or more monoclonal antibodies that are specific for a particular antigen found on the surface of a cancer cell or that are specific for a particular cell growth factor. Monoclonal antibodies may be used in the treatment of cancer in a number of ways, for example, to enhance a subject's immune response to a specific type of cancer, to interfere with the growth of cancer

cells by targeting specific cell growth factors, such as those involved in angiogenesis, or by enhancing the delivery of other anticancer agents to cancer cells when linked or conjugated to agents such as chemotherapeutic agents, radioactive particles or toxins. Monoclonal antibodies currently used as cancer immunotherapeutic agents that are suitable for inclusion in the combinations of the present invention include, but are not limited to, rituximab (Rituxan®), 5 trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), and BL22. Other examples include anti-CTLA4 antibodies (e.g. Ipilimumab), anti-PD1 antibodies, anti-PDL1 antibodies, anti-TIMP3 10 antibodies, anti-LAG3 antibodies, anti-B7H3 antibodies, anti-B7H4 antibodies or anti-B7H6 antibodies. In some embodiments, antibodies include B cell depleting antibodies. Typical B cell depleting antibodies include but are not limited to anti-CD20 monoclonal antibodies [e.g. Rituximab (Roche), Ibritumomab tiuxetan (Bayer Schering), Tositumomab (GlaxoSmithKline), AME-133v (Applied Molecular Evolution), Ocrelizumab (Roche), 15 Ofatumumab (HuMax-CD20, Gemnab), TRU-015 (Trubion) and IMMU-106 (Immunomedics)], an anti-CD22 antibody [e.g. Epratuzumab, Leonard et al., Clinical Cancer Research (Z004) 10: 53Z7-5334], anti-CD79a antibodies, anti-CD27 antibodies, or anti-CD19 antibodies (e.g. U.S. Pat. No. 7,109,304), anti-BAFF-R antibodies (e.g. Belimumab, GlaxoSmithKline), anti-APRIL antibodies (e.g. anti-human APRIL antibody, ProSci inc.), and 20 anti-IL-6 antibodies [e.g. previously described by De Benedetti et al., J Immunol (2001) 166: 4334-4340 and by Suzuki et al., Europ J of Immunol (1992) 22 (8) 1989-1993, fully incorporated herein by reference]. The immunotherapeutic treatment may consist of allografting, in particular, allograft with hematopoietic stem cell HSC. The immunotherapeutic treatment may also consist in an adoptive immunotherapy as described by Nicholas P. Restifo, 25 Mark E. Dudley and Steven A. Rosenberg "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, Nature Reviews Immunology, Volume 12, April 2012). In adoptive immunotherapy, the subject's circulating lymphocytes, NK cells, are isolated amplified in vitro and readministered to the subject. The activated lymphocytes or NK cells are most preferably be the subject's own cells that were earlier isolated from a blood or tumor sample and activated 30 (or "expanded") in vitro.

In some embodiments, the compound of the present invention is administered with a radiotherapeutic agent. The term "radiotherapeutic agent" as used herein, is intended to refer to any radiotherapeutic agent known to one of skill in the art to be effective to treat or ameliorate cancer, without limitation. For instance, the radiotherapeutic agent can be an agent such as those

administered in brachytherapy or radionuclide therapy. Such methods can optionally further comprise the administration of one or more additional cancer therapies, such as, but not limited to, chemotherapies, and/or another radiotherapy.

5 In one embodiment, said additional active compounds may be contained in the same composition or administrated separately.

In another embodiment, the pharmaceutical composition of the invention relates to combined preparation for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof.

10 The invention also provides kits comprising the compound of the invention. Kits containing the compound of the invention find use in therapeutic methods.

In a further aspect, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of serine and/or glycine in a biological sample obtained from said subject.

15 In a further aspect, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject.

20 In some embodiments, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of serine and/or glycine and chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject.

25 In some embodiments, the present invention further comprises the steps of comparing the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject with a predetermined reference value and concluding that the subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 is lower than the
30 predetermined reference value.

Accordingly, the present invention also relates to a method for diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising the steps of: i) determining the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject, ii) comparing the level determined at step i) with a

predetermined reference value and iii) concluding that the subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level determined at step i) is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.

In a further aspect, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of serine and/or glycine in a biological sample obtained from said subject.

In a further aspect, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject.

In some embodiments, the present invention relates to a method for diagnosing liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising the step of determining the level of serine/glycine and/or glycine and chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject.

In some embodiments, the present invention further comprises the steps of comparing the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 with a predetermined reference value and concluding that the subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction when the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction when the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 is lower than the predetermined reference value.

Accordingly, the present invention also relates to a method for diagnosing liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising the steps of: i) determining the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject, ii) comparing the level determined at step i) with a predetermined reference value and iii) concluding that the subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction when the level determined at step i) is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction when the level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.

The term “biological sample” refers to any biological sample derived from the subject such as liposarcoma sample, biopsy sample, biopsy sample obtained during surgery, blood sample, plasma sample, or serum sample. Said biological sample is obtained for the purpose of the in vitro evaluation.

5 The term “inhibitor of p53 and MDM2 interaction” has its general meaning in the art and refers to compounds inhibiting the MDM2-p53 protein-protein interaction and the action of MDM2 toward p53, compounds targeting the MDM2-p53 interaction, and compounds targeting the p53 pathway. The inhibitors of p53 and MDM2 interaction are well-known in the art as illustrated by (Khoo et al., 2014; Li and Lozano, 2013; Saiki et al., 2015; Rew and Sunk,
10 2014).

 In one embodiment of the invention, the inhibitors of p53 and MDM2 interaction is selected from the group consisting of nutlin and nutlin analogs; Nutlin 3a; RG7112 (also known as RO5045337); RG7388; Ro-2443; RO5503781; MI-773; MI-219, MI-713, MI-888; DS-3032b; Benzodiazepinediones (including TDP521252); Sulphonamides (including
15 NSC279287); Chromenotriazolopyrimidine compounds; morpholinone and piperidinones (AM 8553 and AMG 232); piperidines; Terphenyls; Chalcones ; Pyrazoles; imidazoles; Imidazole-indoles ; Isoindolinone ; Pyrrolidinone (including PXN822) ; Piperidines; spirooxindoles; Naturally derived prenylated xanthenes; SAH-8; sMTide-02, sMTide-02a; ATSP-7041; Spiroligomer; PK083, PK5174, PK5196, PK7088, benzothiazoles; Stictic acid; NSC319726;
20 PRIMA-1^{MET} (also known as APR-246); and compounds described in (Khoo et al., 2014; Li and Lozano, 2013; Saiki et al., 2015; Rew and Sunk, 2014).

 As used herein, the “reference value” refers to a threshold value or a cut-off value. The setting of a single “reference value” thus allows discrimination between a liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin and liposarcoma not exhibiting recruitment of
25 MDM2 to chromatin or a liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction and liposarcoma which is not resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction with respect to the cancer relapse and overall survival (OS) for a subject. Typically, a "threshold value" or "cut-off value" can be determined experimentally, empirically, or theoretically. A threshold value can also be arbitrarily selected based upon the existing experimental and/or clinical conditions,
30 as would be recognized by a person of ordinary skilled in the art. The threshold value has to be determined in order to obtain the optimal sensitivity and specificity according to the function of the test and the benefit/risk balance (clinical consequences of false positive and false negative). Typically, the optimal sensitivity and specificity (and so the threshold value) can be

determined using a Receiver Operating Characteristic (ROC) curve based on experimental data. Preferably, the person skilled in the art may compare the level (obtained according to the method of the invention) with a defined threshold value. In one embodiment of the present invention, the threshold value is derived from the level (or ratio, or score) determined in a biological sample derived from one or more subjects having liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction. Furthermore, retrospective measurement of the level (or ratio, or scores) in properly banked historical subject samples may be used in establishing these threshold values.

Predetermined reference values used for comparison may comprise “cut-off” or “threshold” values that may be determined as described herein. Each reference (“cut-off”) value for the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2 of interest may be predetermined by carrying out a method comprising the steps of

a) providing a collection of samples from subjects suffering of liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction;

b) determining the levels of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 for each sample contained in the collection provided at step a);

c) ranking the tumor tissue samples according to said level;

d) classifying said samples in pairs of subsets of increasing, respectively decreasing, number of members ranked according to their level,

e) providing, for each sample provided at step a), information relating to the liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction or the actual clinical outcome for the corresponding cancer subject (i.e. the duration of the event-free survival (EFS), metastasis-free survival (MFS) or the overall survival (OS) or both);

f) for each pair of subsets of samples, obtaining a Kaplan Meier percentage of survival curve;

g) for each pair of subsets of samples calculating the statistical significance (p value) between both subsets;

h) selecting as reference value for the level of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2, the value of level for which the p value is the smallest.

For example the levels of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 have been assessed for 100 cancer samples of 100 subjects. The 100 samples are ranked according to their level. Sample 1 has the best level and sample 100 has the worst level. A first grouping provides

two subsets: on one side sample Nr 1 and on the other side the 99 other samples. The next grouping provides on one side samples 1 and 2 and on the other side the 98 remaining samples etc., until the last grouping: on one side samples 1 to 99 and on the other side sample Nr 100. According to the information relating to the actual clinical outcome for the corresponding cancer subject, Kaplan Meier curves are prepared for each of the 99 groups of two subsets. Also for each of the 99 groups, the p value between both subsets was calculated.

The reference value is selected such as the discrimination based on the criterion of the minimum p value is the strongest. In other terms, the level corresponding to the boundary between both subsets for which the p value is minimum is considered as the reference value. It should be noted that the reference value is not necessarily the median value of the levels of serine/glycine and/or chromatin-bound MDM2.

In routine work, the reference value (cut-off value) may be used in the present method to discriminate cancer samples and therefore the corresponding subjects.

Kaplan–Meier curves of percentage of survival as a function of time are commonly to measure the fraction of subjects living for a certain amount of time after treatment and are well known by the man skilled in the art.

The man skilled in the art also understands that the same technique of assessment of the levels of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 should of course be used for obtaining the reference value and thereafter for assessment of the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 of a subject subjected to the method of the invention.

In one embodiment, the reference value may correspond to the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 determined in a sample associated with liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction. Accordingly, a higher or equal level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 than the reference value is indicative of a subject having liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction, and lower level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 than the reference value is indicative of a subject having liposarcoma not exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma not resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

In another embodiment, the reference value may correspond to the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 determined in a sample associated with liposarcoma not exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma not resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction. Accordingly, higher level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 than the reference value is indicative of a subject having liposarcoma

exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction, and a lower or equal level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 than the reference value is indicative of a subject having liposarcoma not exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma not resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

In another embodiment, a score which is a composite of the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 may also be determined and compared to a reference value wherein a difference between said score and said reference value is indicative of a subject having a liposarcoma exhibiting or not recruitment of MDM2 to chromatin or a liposarcoma resistant or not to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

In a particular embodiment, the score may be generated by a computer program.

Analyzing the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 may be assessed by any of a wide variety of well-known methods for detecting serine/glycine and/or MDM2 recruitment to chromatin.

In one embodiment, the level of serine and/or glycine is assessed by mass spectrometry (MS) chromatogram, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) such as described in Riscal et al., 2016.

In one embodiment, the level of chromatin-bound MDM2 is assessed by extracting liposarcoma cell, and measuring level of chromatin-associated MDM2 by immunoblot analyses, quantitative immunoblotting, western blot, immunoprecipitation assays, Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP) assays such as described in Riscal et al., 2016.

In some embodiments, the level of chromatin-bound MDM2 is assessed by measuring the level of MDM2 and ATF3/4 protein interaction. In some embodiment, the level of chromatin-bound MDM2 is assessed by Proximity Ligation Assay (PLA).

In some embodiments, analyzing the level of serine/glycine and/or of chromatin-bound MDM2 may also be assessed by assessing biomarkers of serine/glycine metabolism such as by measuring expression level of enzymes involved in serine/glycine metabolism such as PHGDH (phosphoglycerate dehydrogenase), PSAT (phosphoserine aminotransferase, PSAT1), PSPH (phosphoserine phosphatase) and SLC1A4 (Solute Carrier Family 1 Member 4 inhibitor).

Analyzing the biomarker expression level may be assessed by any of a wide variety of well-known methods for detecting expression of a transcribed nucleic acid or translated protein.

In one embodiment, the biomarker expression level is assessed by analyzing the expression of the protein translated from said gene. Said analysis can be assessed using an antibody (e.g., a radio-labeled, chromophore-labeled, fluorophore-labeled, or enzyme-labeled

antibody), an antibody derivative (e.g., an antibody conjugate with a substrate or with the protein or ligand of a protein of a protein/ligand pair (e.g., biotin-streptavidin)), or an antibody fragment (e.g., a single-chain antibody, an isolated antibody hypervariable domain, etc.) which binds specifically to the protein translated from the gene encoding for the biomarker.

5 Methods for measuring the expression level of a biomarker in a sample may be assessed by any of a wide variety of well-known methods from one of skill in the art for detecting expression of a protein including, but not limited to, direct methods like mass spectrometry-based quantification methods, protein microarray methods, enzyme immunoassay (EIA), radioimmunoassay (RIA), Immunohistochemistry (IHC), Western blot analysis, ELISA, 10 Luminex, ELISPOT and enzyme linked immunoabsorbant assay and indirect methods based on detecting expression of corresponding messenger ribonucleic acids (mRNAs). The mRNA expression profile may be determined by any technology known by a man skilled in the art. In particular, each mRNA expression level may be measured using any technology known by a man skilled in the art, including nucleic microarrays, quantitative Polymerase Chain Reaction 15 (qPCR), next generation sequencing and hybridization with a labelled probe.

Said direct analysis can be assessed by contacting the sample with a binding partner capable of selectively interacting with the biomarker present in the sample. The binding partner may be an antibody that may be polyclonal or monoclonal, preferably monoclonal (e.g., a isotope-label, element-label, radio-labeled, chromophore- labeled, fluorophore-labeled, or 20 enzyme-labeled antibody), an antibody derivative (e.g., an antibody conjugate with a substrate or with the protein or ligand of a protein of a protein/ligand pair (e.g., biotin-streptavidin)), or an antibody fragment (e.g., a single-chain antibody, an isolated antibody hypervariable domain, etc.) which binds specifically to the protein translated from the gene encoding for the biomarker of the invention. In another embodiment, the binding partner may be an aptamer.

25 The binding partners of the invention such as antibodies or aptamers, may be labelled with a detectable molecule or substance, such as an isotope, an element, a fluorescent molecule, a radioactive molecule or any others labels known in the art. Labels are known in the art that generally provide (either directly or indirectly) a signal.

As used herein, the term "labelled", with regard to the antibody, is intended to 30 encompass direct labelling of the antibody or aptamer by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance, such as an isotope, an element, a radioactive agent or a fluorophore (e.g. fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) or Indocyanine (Cy5)) to the antibody or aptamer, as well as indirect labelling of the probe or antibody by reactivity with a detectable substance. An antibody or aptamer of the invention may be produced with a specific isotope or

a radioactive molecule by any method known in the art. For example radioactive molecules include but are not limited to radioactive atom for scintigraphic studies such as I123, I124, In111, Re186, Re188, specific isotopes include but are not limited to ¹³C, ¹⁵N, ¹²⁶I, ⁷⁹Br, ⁸¹Br.

5 The afore mentioned assays generally involve the binding of the binding partner (ie. antibody or aptamer) to a solid support. Solid supports which can be used in the practice of the invention include substrates such as nitrocellulose (e. g., in membrane or microtiter well form); polyvinylchloride (e. g., sheets or microtiter wells); polystyrene latex (e.g., beads or microtiter plates); polyvinylidene fluoride; diazotized paper; nylon membranes; activated beads, 10 magnetically responsive beads, silicon wafers.

In a particular embodiment, an ELISA method can be used, wherein the wells of a microtiter plate are coated with a set of antibodies which recognize said biomarker. A sample containing or suspected of containing said biomarker is then added to the coated wells. After a period of incubation sufficient to allow the formation of antibody-antigen complexes, the 15 plate(s) can be washed to remove unbound moieties and a detectably labelled secondary binding molecule added. The secondary binding molecule is allowed to react with any captured sample marker protein, the plate washed and the presence of the secondary binding molecule detected using methods well known in the art such as Singulex, Quanterix, MSD, Bioscale, Cytof.

In one embodiment, an Enzyme-linked immunospot (ELISpot) method may be used. 20 Typically, the sample is transferred to a plate which has been coated with the desired anti-biomarker capture antibodies. Revelation is carried out with biotinylated secondary Abs and standard colorimetric or fluorimetric detection methods such as streptavidin-alkaline phosphatase and NBT-BCIP and the spots counted.

In one embodiment, when multi-biomarker expression measurement is required, use of 25 beads bearing binding partners of interest may be preferred. In a particular embodiment, the bead may be a cytometric bead for use in flow cytometry. Such beads may for example correspond to BD™ Cytometric Beads commercialized by BD Biosciences (San Jose, California). Typically cytometric beads may be suitable for preparing a multiplexed bead assay. A multiplexed bead assay, such as, for example, the BD(TM) Cytometric Bead Array, is a series 30 of spectrally discrete beads that can be used to capture and quantify soluble antigens. Typically, beads are labelled with one or more spectrally distinct fluorescent dyes, and detection is carried out using a multiplicity of photodetectors, one for each distinct dye to be detected. A number of methods of making and using sets of distinguishable beads have been described in the literature. These include beads distinguishable by size, wherein each size bead is coated with a

different target-specific antibody (see e.g. Fulwyler and McHugh, 1990, *Methods in Cell Biology* 33:613-629), beads with two or more fluorescent dyes at varying concentrations, wherein the beads are identified by the levels of fluorescence dyes (see e.g. European Patent No. 0 126,450), and beads distinguishably labelled with two different dyes, wherein the beads
5 are identified by separately measuring the fluorescence intensity of each of the dyes (see e.g. U.S. patent Nos. 4,499,052 and 4,717,655). Both one-dimensional and two-dimensional arrays for the simultaneous analysis of multiple antigens by flow cytometry are available commercially. Examples of one-dimensional arrays of singly dyed beads distinguishable by the level of fluorescence intensity include the BD(TM) Cytometric Bead Array (CBA) (BD
10 Biosciences, San Jose, Calif.) and Cyto-Plex(TM) Flow Cytometry microspheres (Duke Scientific, Palo Alto, Calif.). An example of a two-dimensional array of beads distinguishable by a combination of fluorescence intensity (five levels) and size (two sizes) is the QuantumPlex(TM) microspheres (Bangs Laboratories, Fisher, Ind.). An example of a two-dimensional array of doubly-dyed beads distinguishable by the levels of fluorescence of each
15 of the two dyes is described in Fulton et al. (1997, *Clinical Chemistry* 43(9):1749-1756). The beads may be labelled with any fluorescent compound known in the art such as e.g. FITC (FL1), PE (FL2), fluorophores for use in the blue laser (e.g. PerCP, PE-Cy7, PE-Cy5, FL3 and APC or Cy5, FL4), fluorophores for use in the red, violet or UV laser (e.g. Pacific blue, pacific orange). In another particular embodiment, bead is a magnetic bead for use in magnetic
20 separation. Magnetic beads are known to those of skill in the art. Typically, the magnetic bead is preferably made of a magnetic material selected from the group consisting of metals (e.g. ferrum, cobalt and nickel), an alloy thereof and an oxide thereof. In another particular embodiment, bead is bead that is dyed and magnetized.

In one embodiment, protein microarray methods may be used. Typically, at least one
25 antibody or aptamer directed against the biomarker is immobilized or grafted to an array(s), a solid or semi-solid surface(s). A sample containing or suspected of containing the biomarker is then labelled with at least one isotope or one element or one fluorophore or one colorimetric tag that are not naturally contained in the tested sample. After a period of incubation of said sample with the array sufficient to allow the formation of antibody-antigen complexes, the array
30 is then washed and dried. After all, quantifying said biomarker may be achieved using any appropriate microarray scanner like fluorescence scanner, colorimetric scanner, SIMS (secondary ions mass spectrometry) scanner, maldi scanner, electromagnetic scanner or any technique allowing to quantify said labels.

In another embodiment, the antibody or aptamer grafted on the array is labelled.

In another embodiment, reverse phase arrays may be used. Typically, at least one sample is immobilized or grafted to an array(s), a solid or semi-solid surface(s). An antibody or aptamer against the suspected biomarker is then labelled with at least one isotope or one element or one fluorophore or one colorimetric tag that are not naturally contained in the tested sample. After a period of incubation of said antibody or aptamer with the array sufficient to allow the formation of antibody-antigen complexes, the array is then washed and dried. After all, detecting quantifying and counting by D-SIMS said biomarker containing said isotope or group of isotopes, and a reference natural element, and then calculating the isotopic ratio between the biomarker and the reference natural element may be achieved using any appropriate microarray scanner like fluorescence scanner, colorimetric scanner, SIMS (secondary ions mass spectrometry) scanner, maldi scanner, electromagnetic scanner or any technique allowing to quantify said labels.

In one embodiment, said direct analysis can also be assessed by mass Spectrometry. Mass spectrometry-based quantification methods may be performed using either labelled or unlabelled approaches (DeSouza and Siu, 2012). Mass spectrometry-based quantification methods may be performed using chemical labeling, metabolic labeling or proteolytic labeling. Mass spectrometry-based quantification methods may be performed using mass spectrometry label free quantification, LTQ Orbitrap Velos, LTQ-MS/MS, a quantification based on extracted ion chromatogram EIC (progenesis LC-MS, Liquid chromatography-mass spectrometry) and then profile alignment to determine differential expression of the biomarker.

In another embodiment, the biomarker expression level is assessed by analyzing the expression of mRNA transcript or mRNA precursors, such as nascent RNA, of biomarker gene. Said analysis can be assessed by preparing mRNA/cDNA from cells in a sample from a subject, and hybridizing the mRNA/cDNA with a reference polynucleotide. The prepared mRNA/cDNA can be used in hybridization or amplification assays that include, but are not limited to, Southern or Northern analyses, polymerase chain reaction analyses, such as quantitative PCR (TaqMan), and probes arrays such as GeneChip(TM) DNA Arrays (AFFYMETRIX).

Advantageously, the analysis of the expression level of mRNA transcribed from the gene encoding for biomarkers involves the process of nucleic acid amplification, e. g., by RT-PCR (the experimental embodiment set forth in U. S. Patent No. 4,683, 202), ligase chain reaction (Barany, 1991), self sustained sequence replication (Guatelli et al., 1990), transcriptional amplification system (Kwoh et al., 1989), Q-Beta Replicase (Lizardi et al., 1988), rolling circle replication (U. S. Patent No. 5,854, 033) or any other nucleic acid

amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers. As used herein, amplification primers are defined as being a pair of nucleic acid molecules that can
5 anneal to 5' or 3' regions of a gene (plus and minus strands, respectively, or vice-versa) and contain a short region in between. In general, amplification primers are from about 10 to 30 nucleotides in length and flank a region from about 50 to 200 nucleotides in length. Under appropriate conditions and with appropriate reagents, such primers permit the amplification of a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence flanked by the primers.

10 In a further aspect, the present invention relates to MDM2 inhibitor of the invention for use in the treatment of liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, wherein the subject was being classified as having liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin by performing the method according to the invention.

15 In a further aspect, the present invention relates to MDM2 inhibitor of the invention for use in the treatment of liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, wherein the subject was being classified as having liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method according to the invention.

20 The method of the invention allows to define a subgroup of subjects who will be responder or non responder to MDM2 inhibitor of the invention.

In a further aspect, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention for use in the treatment of liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof.

25 A further aspect of the invention relates to a method for treating liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof comprising the steps of:

a) determining whether a subject afflicted with liposarcoma will be a responder or a non-responder to the MDM2 inhibitor of the invention by performing the method according to the invention, and

30 b) administering the MDM2 inhibitor of the invention, if said subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin.

The method of the invention allows to define a subgroup of subjects who will be responder or non responder to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

In a further aspect, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention for use in the treatment of liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof.

5 In some embodiment, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention for use in the treatment of liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, wherein said MDM2 inhibitor is SP141.

A further aspect of the invention relates to a method for treating liposarcoma in a subject in need thereof comprising the steps of:

10 a) determining whether a subject afflicted with liposarcoma will be a responder or a non-responder to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method according to the invention,

b) administering the inhibitor of p53 and MDM2 interaction, if said subject don't have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction, or

15 c) administering the MDM2 inhibitor of the invention, if said subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

A further aspect of the invention relates to a method for treating liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof comprising the steps of:

20 a) determining whether a subject afflicted with liposarcoma will be a responder or a non-responder to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method according to the invention, and

b) administering the MDM2 inhibitor of the invention, if said subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

25 In a further aspect, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention for use in preventing liposarcoma resistance to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof.

In a further aspect, the present invention relates to the MDM2 inhibitor of the invention for use in enhancing the potency of inhibitors of p53 and MDM2 interaction administered to a subject afflicted with liposarcoma in need thereof.

30 A further aspect of the invention relates to a method of treating a liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the MDM2 inhibitor of the invention.

A further aspect of the invention relates to a method of treating a liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising

administering to the subject a therapeutically effective amount of the MDM2 inhibitor of the invention.

5 A further aspect of the present invention relates to a method of preventing resistance to an inhibitor of p53 and MDM2 interaction in a subject afflicted with liposarcoma comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of the MDM2 inhibitor of the invention.

10 A further aspect of the present invention relates to a method for enhancing the potency of inhibitors of p53 and MDM2 interaction administered to a subject afflicted with liposarcoma, the method comprising administering to the subject a pharmaceutically effective amount of the MDM2 inhibitor of the invention.

A further aspect of the invention relates to a method of treating a subject afflicted with liposarcoma and providing a diagnosis of liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction, comprising the steps of:

- 15
- a) treating the subject with the inhibitor of p53 and MDM2 interaction,
 - b) diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method of the invention, and
 - c) administering the MDM2 inhibitor of the invention, if said subject have
- 20 liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

In a further aspect, the present invention relates to a method of screening a candidate compound for use as a drug for the treatment of liposarcoma in a subject in need thereof, wherein the method comprises the steps of:

- 25
- providing a MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 expressing cell, providing a cell, tissue sample or organism expressing MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4, liposarcoma-derived cell lines, xenograft (liposarcoma-derived cell lines) mouse models and xenograft (PDX) mouse models,
 - providing a candidate compound such as a small organic molecule, an
- 30 oligonucleotide, a polypeptide, an aptamer, antibody or an intra-antibody,
- measuring the MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activity, and
 - selecting positively candidate compounds that inhibit MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activity.

Methods for measuring MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activity are well known in the art (Riscal et al., 2016; Qin et al., 2016; Wang et al., 2017; Hamanak et al., 2017; Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016; Ye et al., 2012; US 20140087970; Foster et al., 2017). For example, measuring MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activities involves determining the K_i of ~~the~~ MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 cloned and transfected in a stable manner into a CHO cell line or liposarcoma-derived cell lines, measuring the level of chromatin-bound MDM2, measuring the level of serine and/or glycine and measuring serine metabolism in the present or absence of the candidate compound.

Tests and assays for screening and determining whether a candidate compound is a MDM2 inhibitor, inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin, PHGDH inhibitor, PSAT inhibitor, PSPH inhibitor and/or SLC1A4 inhibitor are well known in the art (Riscal et al., 2016; Qin et al., 2016; Wang et al., 2017; Hamanak et al., 2017; Mullarky et al., 2016; Pacold et al., 2016; Ye et al., 2012; US 20140087970; Foster et al., 2017). In vitro and in vivo assays may be used to assess the potency and selectivity of the candidate compounds to inhibit MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activity.

Activities of the candidate compounds, their ability to bind MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 and their ability to inhibit MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 activity may be tested using isolated cancer cell or CHO cell line cloned and transfected in a stable manner with the human *MDM2*, *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and/or *SLC1A4* cDNAs.

Activities of the candidate compounds and their ability to bind to MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 proteins may be assessed by the determination of the K_i of ~~the~~ MDM2, PHGDH, PSAT, PSPH and/or SLC1A4 cloned and transfected in a stable manner into a CHO cell line or liposarcoma-derived cell lines, measuring the level of chromatin-bound MDM2, measuring the level of serine and/or glycine and measuring serine metabolism in the present or absence of the candidate compound.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1: Increased recruitment of MDM2 to chromatin upon Nutlin treatment explains its low clinical efficiency in LPS. A) Nutlin treatment results in stabilization of MDM2 and p53 protein levels in LPS cells, and in increased levels of chromatin-bound MDM2. Left panels: quantitative immunoblot analysis of MDM2, p53 and ACTIN (Act, loading

control) protein levels in whole cell extracts prepared from a LPS cell line upon Nutlin treatment. Right panels: quantitative immunoblot analysis of MDM2, p53 and Tata Binding Protein (TBP, loading control) in fractions enriched in cytosoluble and nucleosoluble proteins (Soluble), or in chromatin-associated proteins (Chromatin) prepared prepared from a LPS cell line upon Nutlin treatment. B) Increased levels of chromatin-bound MDM2 upon Nutlin treatment increases the mRNA levels of MDM2-target genes involved in serine metabolism. RT-qPCR analysis of *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and *SLC1A4* mRNA levels in DMSO or Nutlin-treated IB115 cells (liposarcoma cells). C) IC50 of Nutlin3A in different cell lines exhibiting high levels of chromatin-bound MDM2 or cytosoluble MDM2.

10 **Figure 2: A subset of Human liposarcomas display increased expression of genes involved in serine metabolism.** RT-qPCR analysis of *MDM2*, *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and *SLC1A4* mRNA levels in human samples of WD/DD-LPS and in leiomyosarcomas, or in normal abdominal adipose tissue.

15 **Figure 3: Alterations of serine metabolism impacts on liposarcomagenesis.** A) Populations of p53-depleted IB115 LPS cells expressing Ctr or *PHGDH* - shRNAs were counted every day for 3 days. Graphs represent cell index (fold change, mean+SD; n=3 independent experiments performed in triplicates). B) A p53 KO clone of IB115 generated by CRISPR/Cas9 technology was transduced with lentivirus expressing control- (CTRL) or *PHGDH* - shRNAs and then subcutaneously implanted in nude mice that were fed with chow 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. C) Quantitative immunoblot analysis of PHGDH and ACTIN (Act, loading control) protein levels in whole cell extracts prepared from the same tumor samples than in B).

20 **Figure 4: MDM2 influence serine metabolism in liposarcoma.** A) histobars represent the cell index(fold change, mean +/- SEM, n=3) in Ctr and MDM2-shRNA-treated IB115-shp53 cells (liposarcoma cells) cultured for 3 days in complete medium (+ Ser) or in the same medium lacking serine and glycine (-Serine). B) p53 null IB115 cells generated using the CRISPR/Cas9 technology were transduced with lentiviruses encoding control- (CTRL) or MDM2 - shRNAs and then subcutaneously implanted in nude mice that were fed with control chow or a serine/glycine deprived diet (-SG). Tumor volume was measured at the indicated time points. C) RT-qPCR analysis of *MDM2*, *PHGDH*, *PSAT1*, *PSPH* and *SLC1A4* mRNA levels in IB115-WTp53 or CRISPR-p53 KO cells expressing a control (Ctr) or *MDM2*-shRNAs.

Figure 5: Pharmacological inhibition of MDM2 influences liposarcomagenesis. A)

Histobars represent the cell index (Mean \pm -SD; n=3 independent experiments in triplicates) during a 3 day-culture of 2 liposarcoma cell lines and one control sarcoma cell line, in presence of DMSO or the MDM2 inhibitor (SP141). B) RT-qPCR analysis of *PHGDH*, *PSATI*, *PSPH* and *SLC1A4* mRNA levels in IB115- CRISPR-p53 KO cells treated with DMSO or the MDM2 inhibitor SP141. C) 2 different LPS cell lines (LPS1 and LPS2) were subcutaneously implanted in nude mice that were fed with normal control or a serine/glycine deprived diet (-SG) and injected daily with vehicle or SP141 (40 mg/Kg). Tumor volume was measured at the indicated time points. D) Mice implanted with liposarcoma and leiomyosarcoma PDX (patient derived tumor xenograft) were injected daily with vehicle or SP141 (40 mg/Kg). Tumor volume was measured at the indicated time points.

Figure 6: MDM2 inhibitor, a new therapy for Liposarcoma. A)

Half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of SP141 in liposarcomas or control sarcoma cell lines (mean \pm SEM). B) Number of viable cells, 48h after treatment with increasing doses of SP141 of p53-depleted IB115 cells transduced with a control empty lentivirus or a lentivirus encoding the MDM2 Delta AD mutant that is constitutively recruited to chromatin.

EXAMPLES:

EXAMPLE 1:

To gain insights into MDM2 oncogenic functions, in Riscal et al (2016), the inventors assessed MDM2 localization in a panel of cancer cell lines following biochemical fractionation. The inventors have shown that a fraction of MDM2 localizes to chromatin independently of p53, ranging from 20% to 80% of the total amount of MDM2 (Riscal et al., 2016).

Based on The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project published by the Sanger institute and the Massachusetts General Hospital (<http://www.cancerrxgene.org>), the inventors find that the cell lines that display high levels of chromatin-bound MDM2 are not sensitive to Nutlin.

Because MDM2 is amplified in liposarcoma, and because liposarcoma patients show a poor response to Nutlin treatment (Ray-Coquard et al., 2012), the inventors decided to address the mechanism of Nutlin resistance in Liposarcomas.

The inventors observed that Nutlin treatment not only results in p53 stabilization but also in MDM2 stabilization in LPS cells. Nutlin treatment also results in increased levels of chromatin-bound MDM2, leading to the transcriptional activation of MDM2-target genes involved in serine metabolism (Figure 1A-B).

By measuring the IC50 of Nutlin in different cell lines harboring high levels of chromatin-bound MDM2, the inventors observed that those cell lines are resistant to Nutlin (Figure 1C).

In conclusion, levels of chromatin-bound MDM2 can be used as a biomarker to predict the efficacy of drugs that modulate MDM2-p53 interaction.

The inventors hypothesize that agents that reduce the levels of chromatin-bound MDM2 represent new therapies for cancers that display high levels of MDM2, including liposarcomas.

EXAMPLE 2:

Material & Methods

Knockdown or genetic inactivation of Mdm2, p53 and PHGDH

The following constructs were used for knock-down experiments: pLKO.1_Puro shMDM2 (Sigma-Aldrich mission clone #3377), pMKO.1 puro shp53 (a gift from W. Hahn, Addgene clones #10671 and #10672), and pLKO.1 puro shPHGDH (Sigma-Aldrich mission clone #28532). Lentivirus allowing stable expression of shRNA targeting the firefly luciferase gene was used as a control shRNA. Lentiviral particles were produced as previously reported in packaging HEK293 cells (Hatchi et al., 2011). Transduced liposarcoma cells were selected with puromycin (2 µg/ml, invitrogen) or hygromycin (50µg/ml) during 48h.

Xenografts

Bilateral subcutaneous injections of $5 \cdot 10^6$ cells were performed on 8-week-old CD-1-Foxn1nu 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). SP141 was administered daily at 40mg/kg by intraperitoneal injections.

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. Sarcoma cells were maintained in DMEM Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Thermo Scientific). For amino acid starvation experiments, cells were cultured in DMEM lacking serine

and glycine (–SG medium, Biological Industries). SP141 was added in the culture medium at a final concentration of 1 μ M.

For proliferation assays, cells were transduced overnight with lentiviral particles encoding firefly luciferase (control) or shRNAs targeting *MDM2* or *PHGDH*, selected with puromycin (2 μ g/ml) for 72h and then seeded in triplicates in 6-well plates (3.10⁵ cells per well) in regular DMEM. 24 hrs later, cells were washed with PBS and then cultured in complete or –SG medium. Cell numbers were determined by manual counting after trypan-blue exclusion every 24h during 4 days or using a real time cell analysis system - xCELLigence (Roche). The Cell index is the quantitative measure of cell number.

10 **RNA extraction and quantitative RT-qPCR**

Total mRNAs were isolated from sarcoma cells or human samples using TriZol Reagent (Invitrogen). cDNAs were synthesized from 500ng of total RNA using SuperScriptTM 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 *β 2-microglobulin* transcripts.

IC50 measurement

20 Growth inhibition after SP141 treatment (IC₅₀) was determined using the sulforhodamine B (SRB) assay. Briefly, cells were seeded in 96-well plates (5,000 cells per well) in complete medium for assays in triplicates. 24 hrs later, serial dilutions of the indicated compounds were added to the cells. After 48 hours, cells were fixed by adding a trichloroacetic acid solution (10% final) and stained with a 0.4% sulforhodamine B solution in 1% acetic acid. 25 Fixed sulforhodamine B was dissolved in 10 mM Tris-HCl solution and absorbance at 560 nm was read using an MRX plate reader.

Results

Serine metabolism is deregulated in LPS

30 Serine and glycine are 2 nonessential amino acids involved in several essential anabolic pathways and in the control of the redox status of the cell. The intracellular levels of serine and glycine are controlled by two main pathways: de novo synthesis from the glycolytic intermediate 3-phosphoglycerate, and by uptake of extracellular serine and glycine from the external medium. The inventors found that chromatin-bound MDM2 directly controls at the transcriptional level 3 genes that encode key enzymes of de novo serine synthesis (PHGDH,

PSAT and PSPH) as well as neutral amino-acid transporters that can uptake serine and glycine (SLC1A4). Although hyperactivation of the de novo serine synthesis pathway (SSP) has been shown to drive oncogenesis in different tumor types, the molecular mechanisms that control the expression of genes involved in serine metabolism remain poorly characterized. The inventors have recently shown that chromatin-bound MDM2 is a key regulator of serine metabolism de novo serine synthesis and serine uptake in cancer cells (Riscal et al, 2016).

The massive and systematic gene amplification of the *MDM2* oncogene in WD- and DD- LPS, together with the presence of a wild-type (WT) *TP53* gene, have been the rationale for the use of pharmacological inhibitors of the interaction between p53 and MDM2 that aimed at reactivating WT-p53. However, these inhibitors have a paradoxical effect that leads to the massive stabilization of MDM2 and to the potentialization of its pro-oncogenic effects, including those mediated by chromatin-bound MDM2. Because most clinical trials based on such inhibitors have shown a poor, if any, therapeutic benefit for LPS patients, the inventors decided to evaluate whether the regulation of serine metabolism by chromatin-bound MDM2 contributes to the resistance of LPS to Nutlin. As shown in Figure 1B, the inventors demonstrate that Nutlin treatment increases the levels of MDM2-target genes involved in serine metabolism, including PHGDH, PSAT1, PSPH and SLC1A4.

The inventors also observed that in comparison to normal visceral adipose tissue or other sarcoma subtypes (as exemplified by leiomyosarcomas), LPS tumor samples display high levels of the 3 enzymes responsible for de novo serine synthesis (PHGDH, PSAT and PSPH) and also of the serine carrier SLC1A4 (Figure 2).

Serine metabolism is essential for LPS development

The inventors hypothesized that MDM2-mediated control of serine metabolism is a key driver of liposarcoma development. Consistent with this hypothesis, shRNA-mediated depletion of PHGDH impacted on the growth of LPS cell lines in vitro and in vivo in xenograft assays (Figure 3A). The inhibitory effect of PHGDH-depletion was further increased when xenografted mice were fed with a serine and glycine deprived diet (Figure 3B). Thus, these data support the notion that serine and glycine metabolism sustains LPS development.

MDM2 is a master regulator of Serine metabolism in LPS development

Consistent with MDM2 functions in serine metabolism, the inventors found that MDM2 inhibition by shRNA impacts on LPS cell growth, and this effect was potentialized when these cells were cultured in a serine/glycine-deprived medium (Figure 4A). The inventors also confirmed the importance of MDM2-mediated control of serine/glycine metabolism on LPS growth in vivo. LPS 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 calorific value and equal content in total amino acids. Strikingly, the lack of diet-derived serine and glycine impaired the tumorigenic potential of MDM2-depleted LPS cells (Figure 4B). Moreover, the inventors show that MDM2 depletion in p53-proficient and p53-deficient LPS cell lines (IB115-WT-p53 and IB115-p53 KO cells generated using the CRISPR-Cas9 technology), decreases the expression of genes involved in serine metabolism in a p53 independent manner (Figure 4C).

Pharmacological inhibition of MDM2 impacts on serine metabolism and LPS development

The above-mentioned results prompted the inventors to use the pharmacological inhibitor SP141, a drug that promotes MDM2 auto-ubiquitination and its proteasomal degradation. SP 141 induces cell cycle arrest and cell death selectively in LPS cancer cell lines in vitro and inhibits tumor growth in vivo, but has little or no effect on other sarcoma cells. Strikingly, decreased bioavailability of serine and glycine, obtained with a serine and glycine deprived diet, further decreased the tumorigenic potential of SP141-treated LPS cells (Figure 5A and C). Using patient-derived tumor xenograft (PDX) mouse models of LPS and of other sarcomas, the inventors show a specific effect of SP141 on LPS tumors (Figure 5D). Interestingly, the inventors observed by RT-qPCR that the mRNA levels of *PSAT1*, *PSPH*, *PHGDH* and *SLC1A4* are down regulated upon SP141 treatment only in LPS cell lines, demonstrating the importance of MDM2 in the regulation of serine metabolism in LPS cells (Figure 5B).

The inventors determined the IC₅₀ of SP141 on 12 LPS cell lines and 5 sarcomas cell lines and show that SP141 is selectively efficient in LPS, as compared to other sarcoma subtypes (Figure 6A).

Interestingly, the inventors show that the effect of SP141 is rescued upon overexpression of a MDM2 isoform that is preferentially localized to chromatin (MDM2-deltaAD), showing that the effect observed with the SP141 is due to MDM2 transcriptional activity on serine metabolism (Figure 6B).

Conclusion

The inventors assume that the very specific cytogenetic signature of LPS, characterized by the constant amplification of the *MDM2* gene, illustrates the importance of MDM2-associated metabolic functions in LPS pathogenesis. The inventors expect that these results will lead to new therapeutic strategies targeting MDM2 and/or serine metabolism in advanced LPS.

The inventors expect these new strategies to be more efficient than current chemotherapies based on doxorubicin.

REFERENCES:

5 Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

Riscal R., et al., (2016) Chromatin-bound MDM2 regulates serine metabolism and redox homeostasis independently of p53. *Mol. Cell.* Jun 16;62(6):890-902.

CLAIMS:

1. An inhibitor of MDM2 recruitment to chromatin or an inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of cancer exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof.
2. The inhibitor for use according to claim 1, wherein the cancer exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin is liposarcoma.
3. The inhibitor for use according to claim 2, wherein the liposarcoma is liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.
4. The inhibitor for use according to claims 1 to 3, wherein the inhibitor of the recruitment of MDM2 to chromatin is selected from the group consisting of SP141; 6-Methoxy-1-naphthalen-2-yl-9H- β -carboline; SP141 nanoparticles (SP141NP); SP141-loaded IgG Fc-conjugated maleimidyl-poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) (Mal-PEG-PCL) nanoparticles (SP141FcNP); 6-Methoxy-1-quinolin-4-yl-9H- β -carboline; 6-Methoxy-1-naphthalen-1-yl-9H- β -carboline; 6-Methoxy-1-phenanthren-9-yl-9H- β -carboline; and 7-Methoxy-1-phenanthren-9-yl-9H- β -carboline.
5. The inhibitor for use according to claims 1 to 3, wherein the inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism is selected from the group consisting of PHGDH inhibitor, PSAT inhibitor, PSPH inhibitor, and SLC1A4 inhibitor.
6. A method for diagnosing liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, comprising the steps of: i) determining the level of serine, glycine and/or chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject, ii) comparing the level determined at step i) with a predetermined reference value and iii) concluding that the subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level determined at step i) is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin when the level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.
7. A method for diagnosing liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, comprising the steps of: i) determining the level of serine, glycine and/or chromatin-bound MDM2 in a biological sample obtained from said subject, ii) comparing the level determined at step i) with a predetermined reference value and iii) concluding that the subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2

interaction when the level determined at step i) is higher than the predetermined reference value or concluding that the subject don't have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction when the level determined at step i) is lower than the predetermined reference value.

5 8. An inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof, wherein the subject was being classified as having liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin by performing the method according to claim 6.

10 9. An inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction in a subject in need thereof, wherein the subject was being classified as having liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method according to claim 7.

15 10. A method for treating liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin in a subject in need thereof comprising the steps of:

a) determining whether the subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin by performing the method of claim 6, and

20 b) administering the inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism, if said subject have liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin.

11. A method for treating liposarcoma in a subject in need thereof comprising the steps of:

a) determining whether the subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction by performing the method according to claim 7,

25 b) administering the inhibitor of p53 and MDM2 interaction, if said subject don't have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction , or

b) administering the inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism, if said subject have liposarcoma resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction.

ABSTRACT OF THE INVENTION

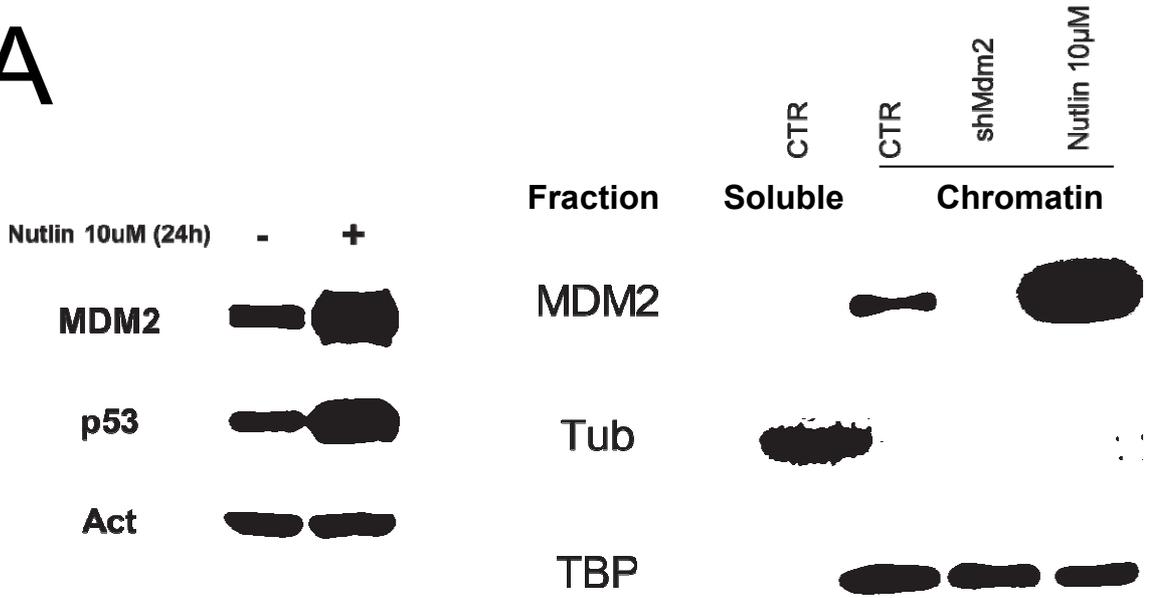
METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF LIPOSARCOMA

5

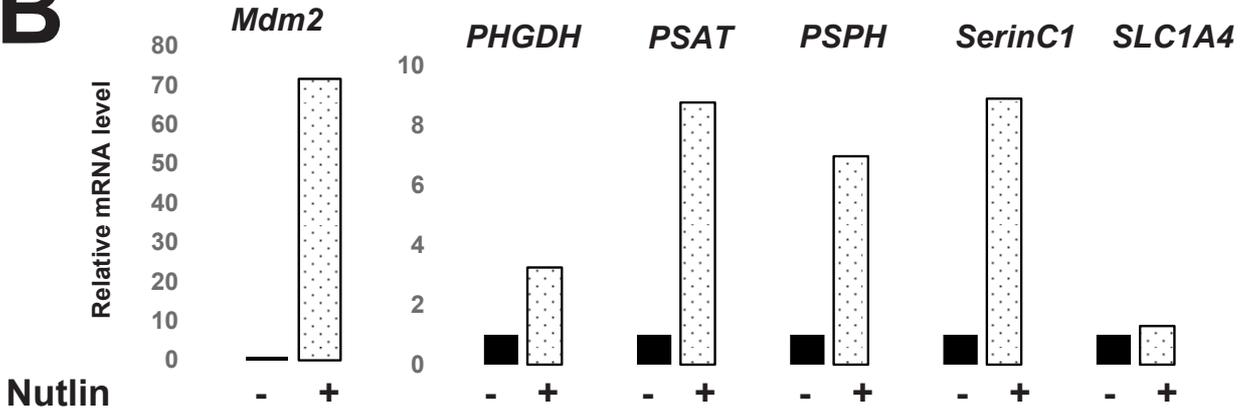
The invention relates to methods for the diagnosis of subjects suffering from liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction and methods for the treatment of liposarcoma. The inventors show that MDM2-controlled metabolic functions are exacerbated in liposarcoma and that the selective pressure for MDM2 amplification in LPS likely reflects their addiction to serine metabolism. Using a collection of LPS patient-derived cell lines and xenograft (PDX) mouse models, the inventors demonstrate that genetic or pharmacological targeting of chromatin-bound MDM2, or of serine metabolism such as targeting PHGDH, PSAT, PSPH, SLC1A4 and serine, provide an efficient therapeutic strategy for LPS. The inventors also provide molecular evidences explaining the poor therapeutic response of LPS patients to Nutlin demonstrating that LPS development is dependent of the recruitment of MDM2 to chromatin and serine metabolism independently of p53. Thus, the inventors define new therapeutic strategies for LPS based on a new class of MDM2 inhibitors targeting the MDM2 recruitment to chromatin and serine metabolism. Thus, the invention relates to a method for the diagnosis of subjects suffering from liposarcoma exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin or resistant to inhibitors of p53 and MDM2 interaction and to inhibitor of the MDM2 recruitment to chromatin or inhibitor of MDM2-mediated control of serine metabolism for use in the treatment of said liposarcoma, cancer types exhibiting recruitment of MDM2 to chromatin and cancer types exhibiting exacerbated serine and glycine metabolism.

25

A



B



C

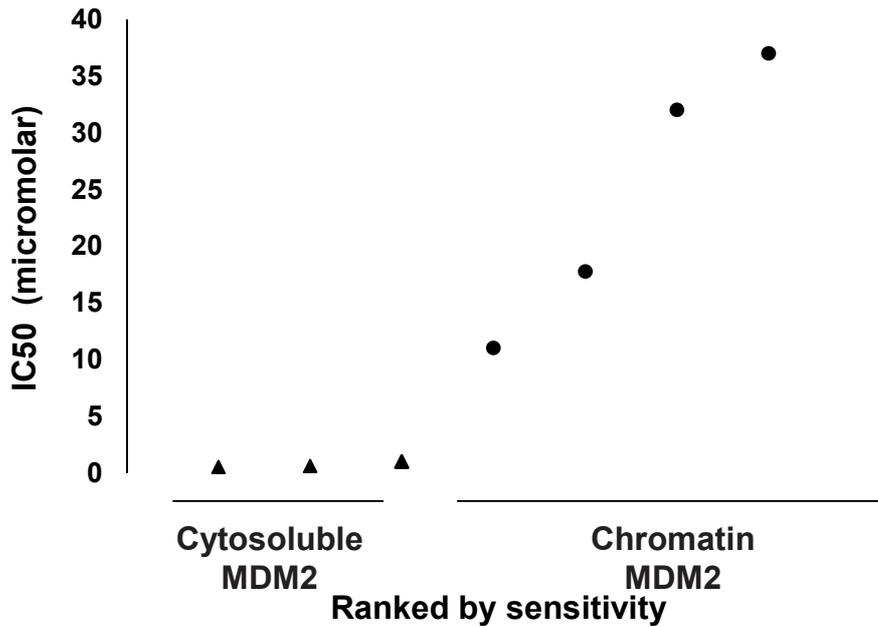


Figure 1 A, B and C

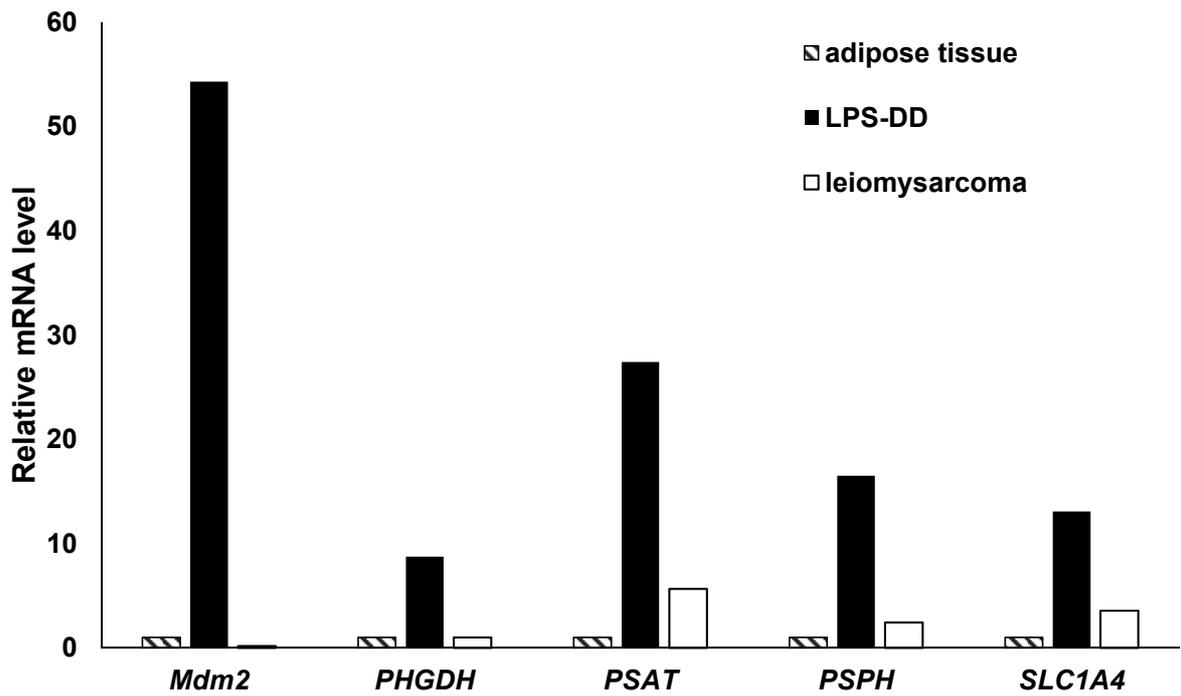


Figure 2

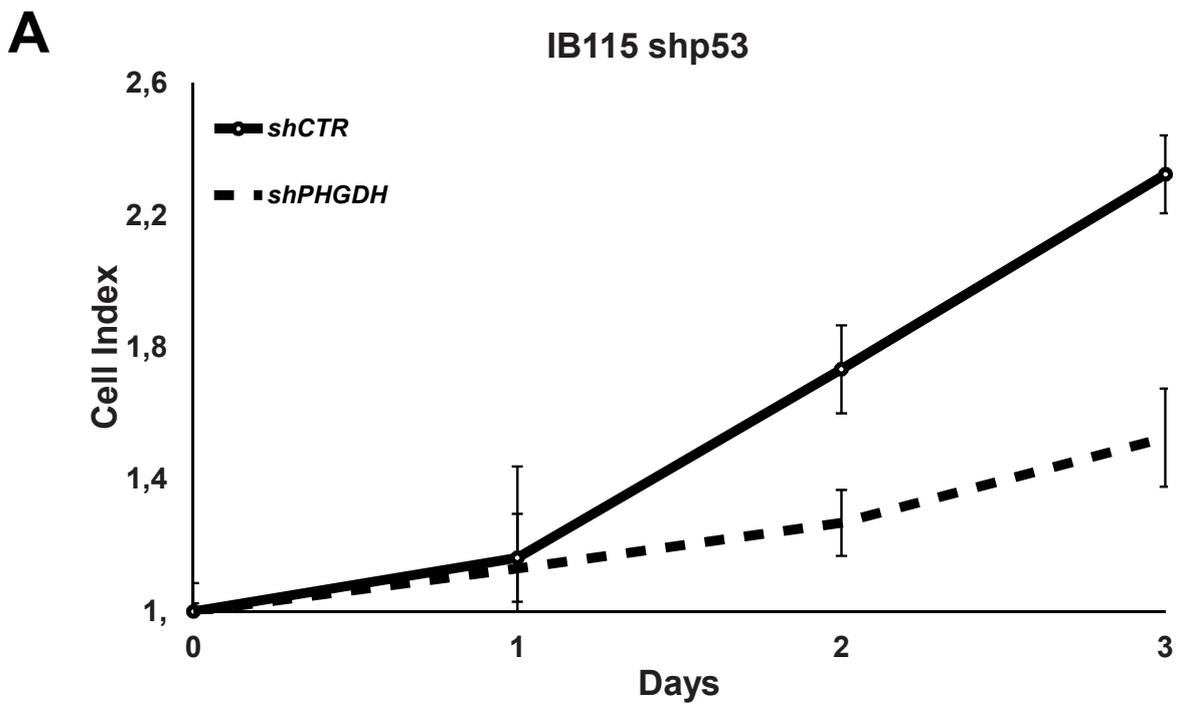


Figure 3A

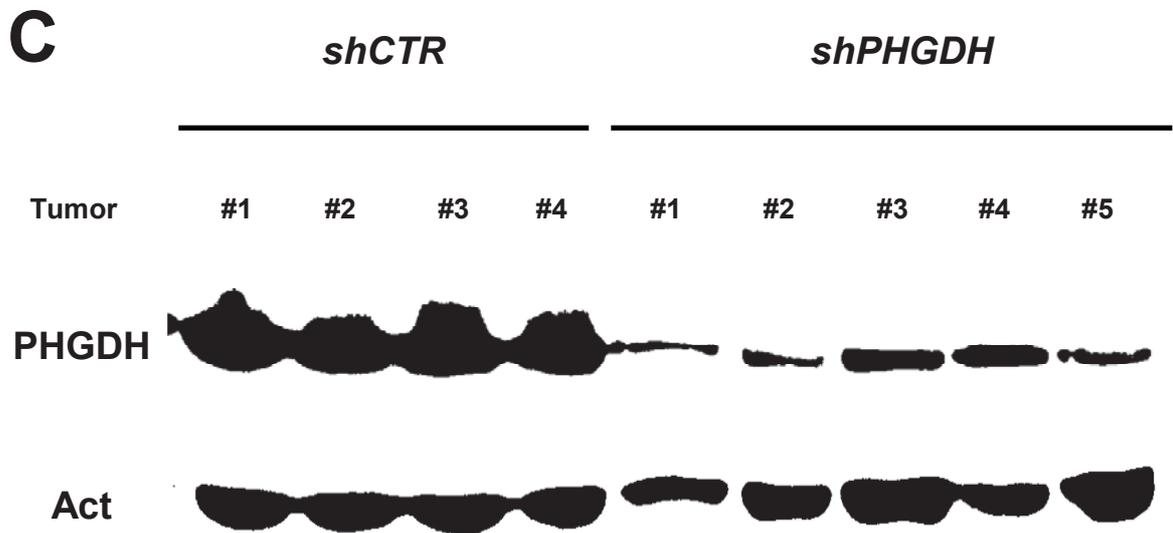
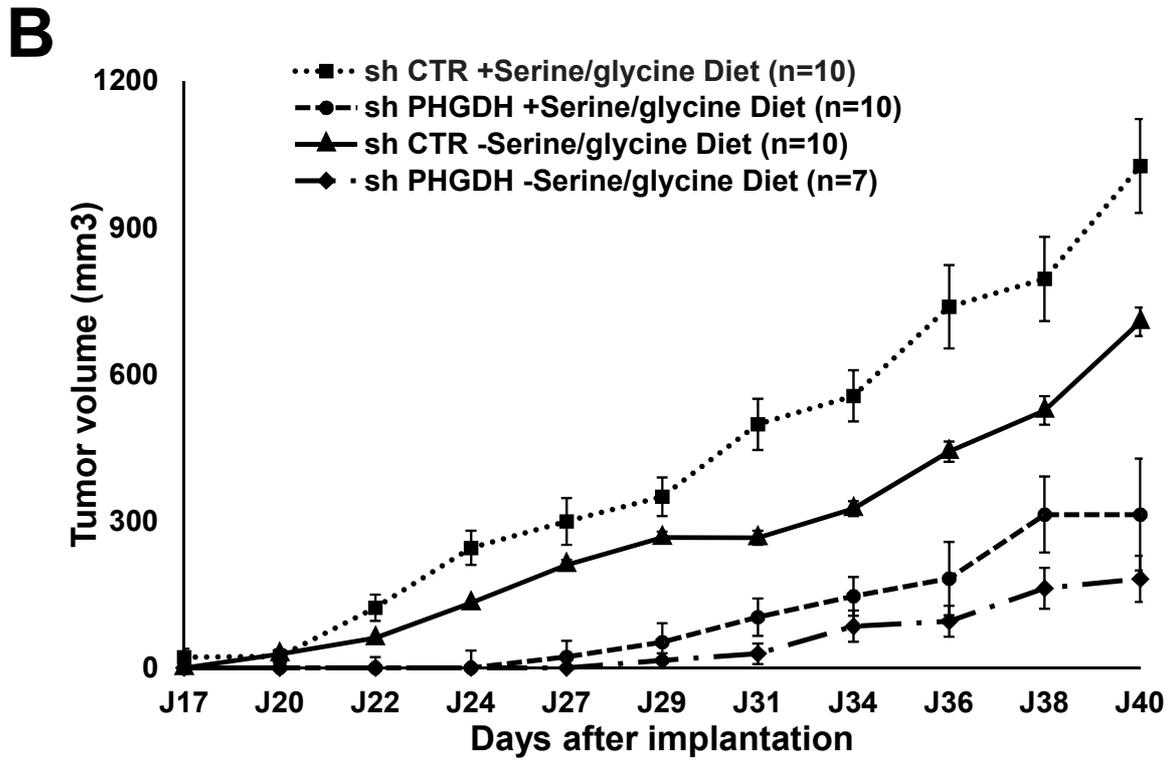


Figure 3 B and C

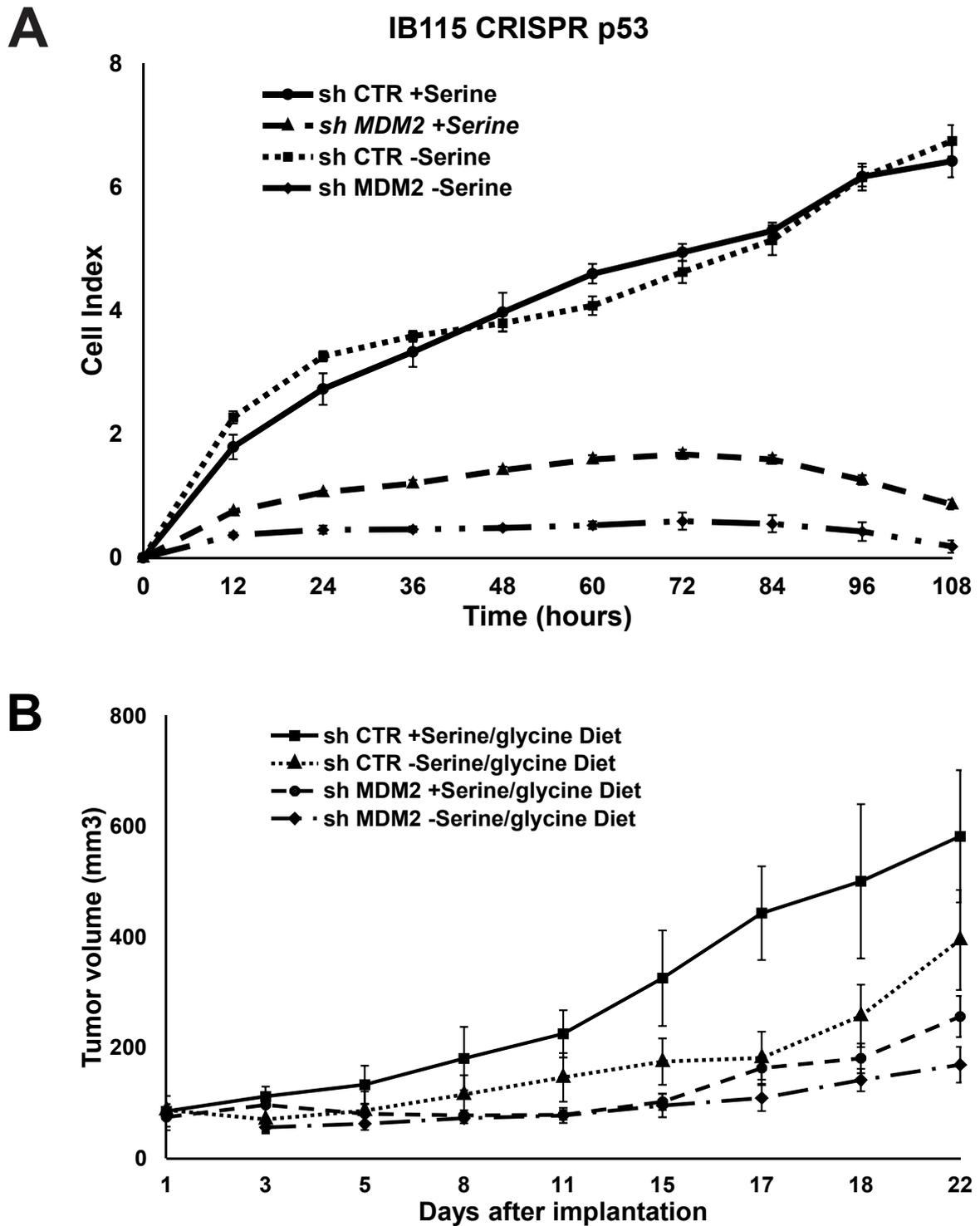


Figure 4 A and B

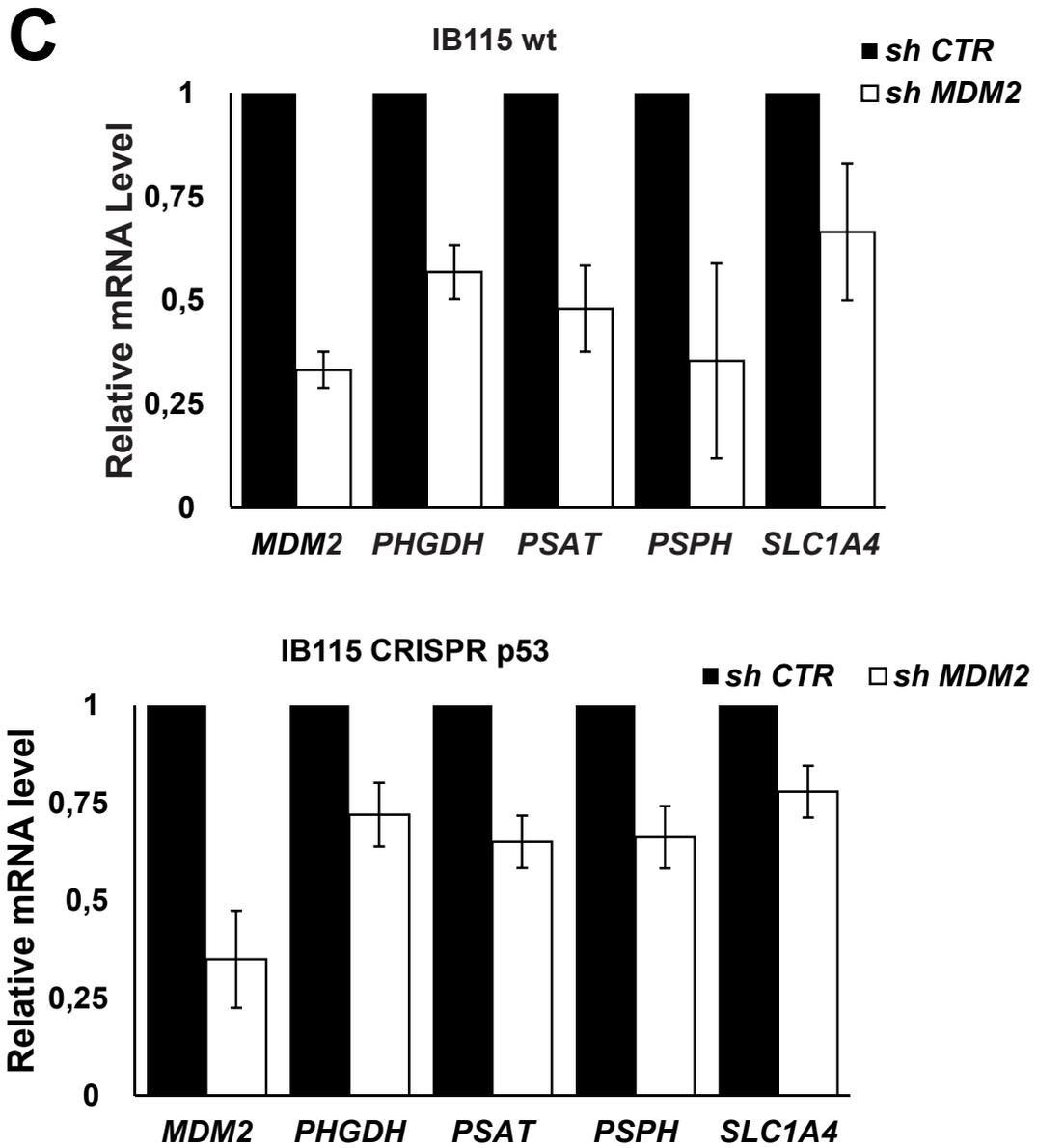
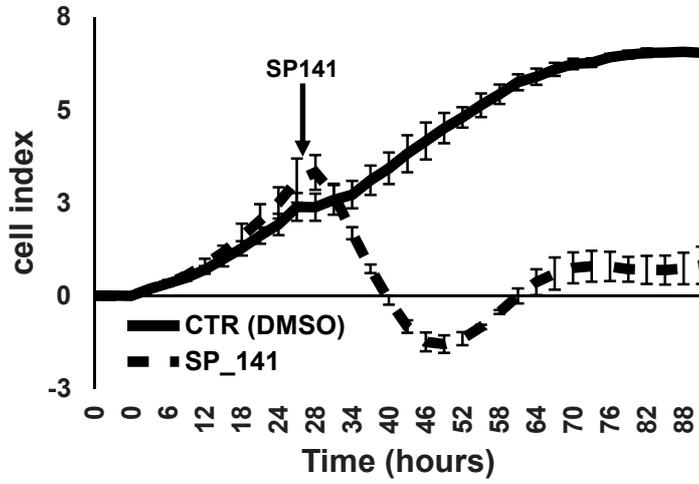


Figure 4C

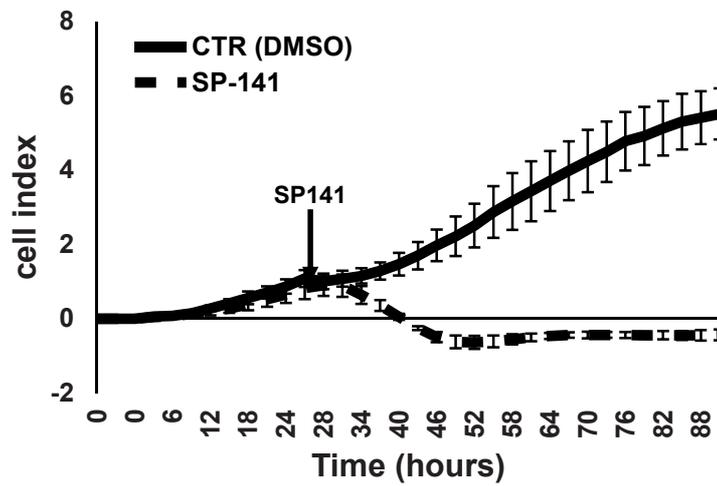
6/9

A

LPS 1



LPS 2



Sarcoma

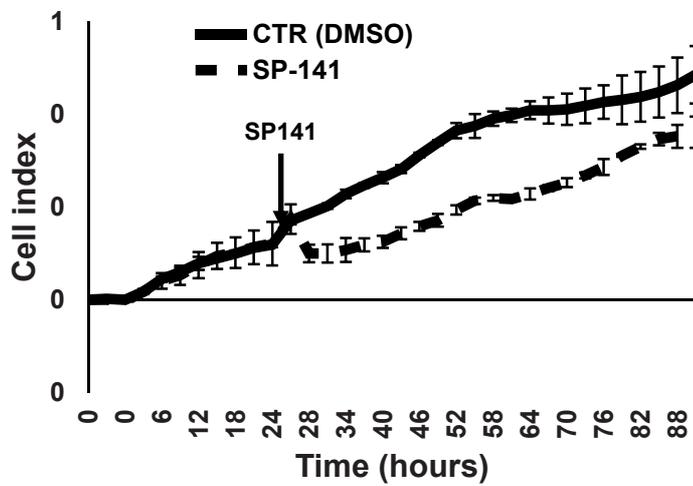
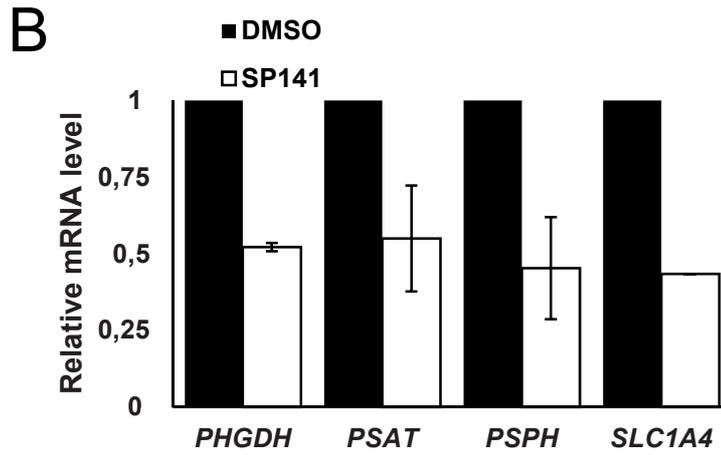


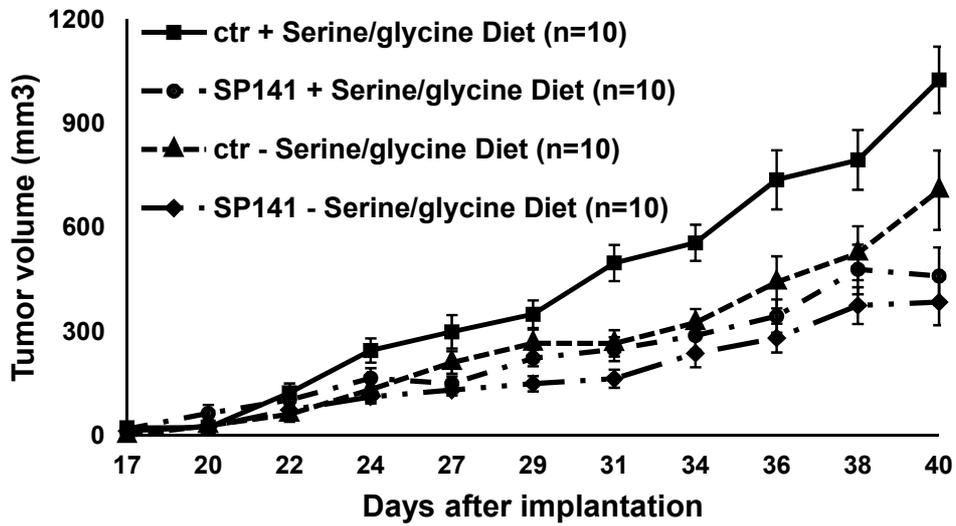
Figure 5A

7/9



C

LPS 1



LPS 2

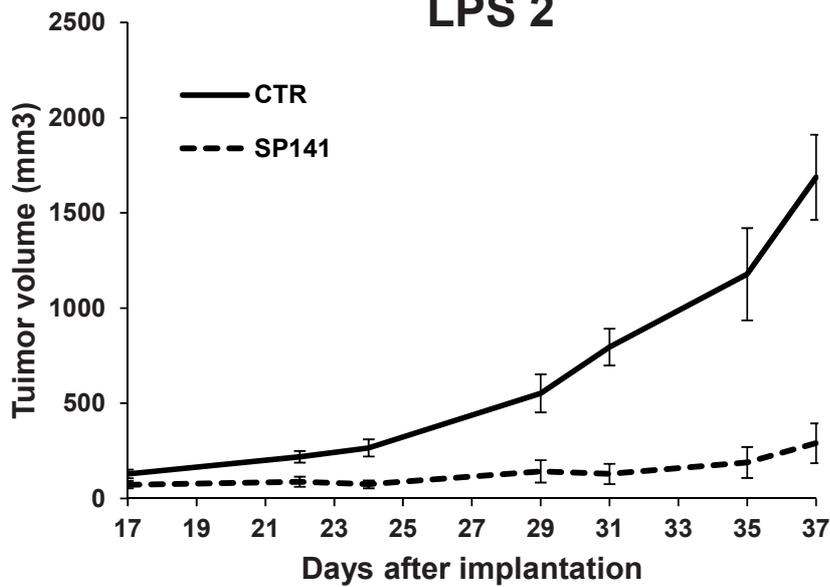


Figure 5 B and C

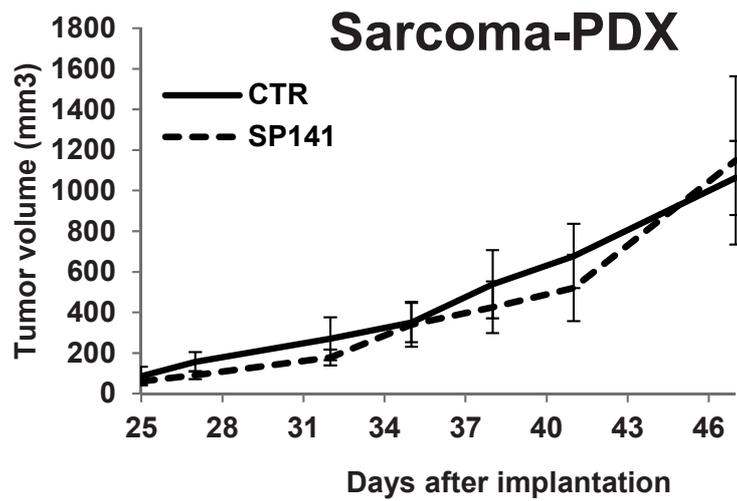
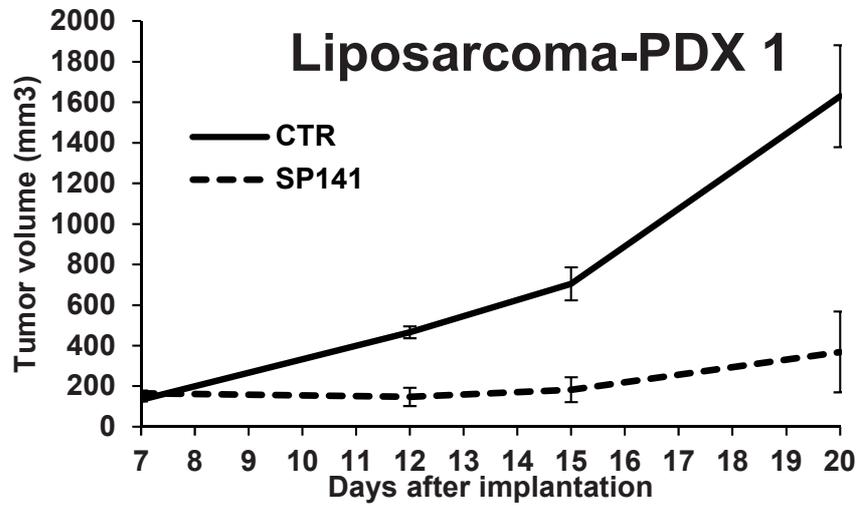
D

Figure 5D

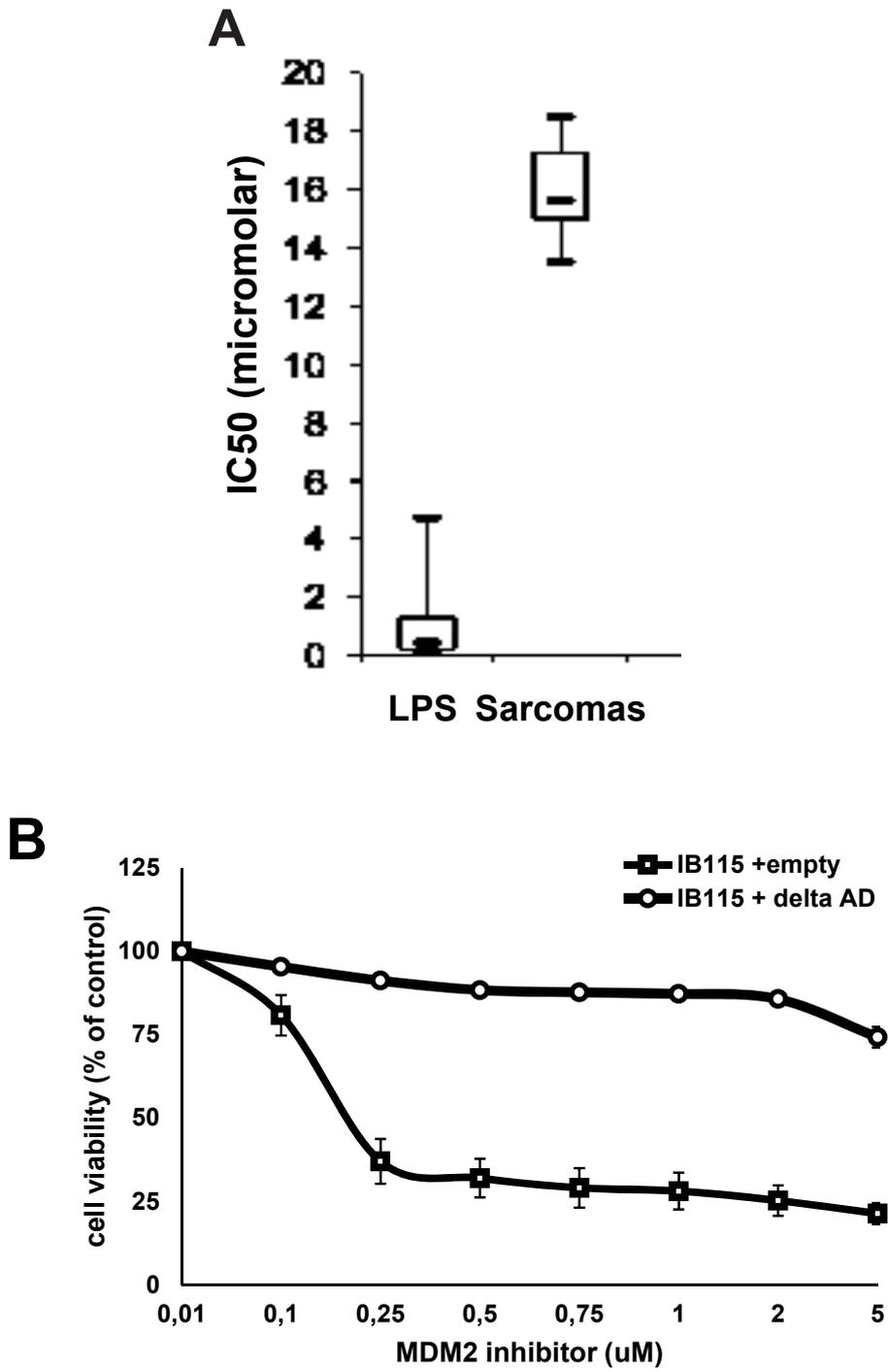


Figure 6 A and B

Collaborations :

L'expertise sur les sarcomes et le métabolisme que j'ai pu acquérir durant mes 4 années de thèse m'a ouvert la possibilité de collaborer et d'aider différentes équipes de recherches extérieures à l'institut.

- En 2018, mon expertise dans la manipulation de tissu tumorale humain ainsi que notre accès à une banque clinico-biologique de sarcomes m'a permis de collaborer avec l'équipe de Dominique Modrowski (Cancéropôle Ile de France) et d'obtenir mon nom en tant que co-auteur d'un JCI insight.

Article : C.Andrique, L.Morardet, L K.Linares, **M Y.Cissé**, C.Merle, F.Chibon, S.Provot, E.Hay, H-K.EA, M.Cohen-Solal and D.Modrowsky.

Calpain-6 controls the fate of sarcoma stem cells by promoting autophagy and preventing senescence. JCI Insight. Sep2018. 6;3(17): e121225

- Tout au long de ma thèse, l'étroite collaboration entre notre équipe et la plateforme Metatoul, m'a permis d'acquérir une expertise dans la réalisation d'expériences de profilage isotopique sur cellules cancéreuses adhérentes. Nous avons effectué tout un travail de mises au point du protocole pour obtenir des résultats robustes et reproductibles. Ce travail m'a amené à réaliser des expériences de marquages en étroite collaboration avec Floriant Bellevert et Maud Heuillet, pour un article de méthode en cours de publication. Cet article a pour but d'évaluer l'utilisation d'un standard interne de type C13N15 pour améliorer l'analyse et la quantification de métabolites lors d'expériences de profilage isotopique.

- J'ai aussi participé aux travaux de Lucille Stuani (post-doctorante dans l'équipe de Jean-Emanuel Sarry), grâce à l'expertise que j'ai acquis en biologie cellulaire et moléculaire. Ces travaux sont actuellement en cours de publication. Les travaux du Dr Stuani visent à étudier de manière poussée le métabolisme de cellules d'AML (acute myeloid leukemia) via la réalisation de carte de flux métabolique, et la mécanistique qui en découle.

Ce fut un honneur de participer à ces travaux, tant dans le but de partager mon savoir faire que d'ouvrir mes connaissances à d'autres projets montrant l'intérêt d'étudier le métabolisme des cellules cancéreuses.

VIII – Discussion et perspectives

Pendant ces 4 années de thèse, j'ai eu la chance de contribuer à l'amélioration de nos connaissances sur les fonctions de l'oncoprotéine MDM2. Mon projet de thèse a permis de montrer, que la fonction de MDM2 dans la régulation du métabolisme de la sérine, indépendamment de p53, était une fonction clé dans le développement d'un cancer rare : le liposarcome.

Au regard de la pression de sélection qui semble conduire à l'amplification de *MDM2* et sa localisation chromatinienne dans les LPS, mes travaux se sont concentrés sur cet aspect des fonctions métaboliques de MDM2. Cependant, beaucoup de questions restent ouvertes sur l'action de MDM2 dans le développement de ces tumeurs et le chemin à parcourir est encore long pour améliorer la condition des patients atteints de LPS, qui rappelons le, ne bénéficient aujourd'hui, d'aucunes thérapies ciblées efficace.

Dans cette partie, je commencerais par discuter des mécanismes moléculaires encore inconnus qui définissent les fonctions de MDM2 dans les LPS.

Dans un second temps, j'aborderais la nécessité d'améliorer nos connaissances sur le métabolisme de ce type de cancer, dans le but de développer de nouveaux outils et de nouvelles stratégies pour diagnostiquer et mieux comprendre la pathologie.

Enfin, la dernière partie de cette discussion se concentrera sur des aspects plus cliniques. Après avoir discuté la nécessité d'établir un nouveau modèle préclinique *in vivo*, j'imaginerais quelles pourraient être les stratégies thérapeutiques futures pour la prise en charge des patients atteints de LPS.

1) La localisation chromatinienne de MDM2 dans les LPS

Par quel mécanisme MDM2 se retrouve-t-il spontanément associé à la chromatine spécifiquement dans le liposarcome ? C'est certainement la question sans réponse à laquelle j'aurais le plus aimé pouvoir répondre durant ma thèse.

On peut toutefois tenter d'apporter un début de réponse à cette question et faire un état des lieux de ce que nous savons sur MDM2.

Initialement, mes travaux de thèse ont débuté dans un laboratoire travaillant déjà depuis plusieurs années sur les fonctions de MDM2 indépendantes de p53. L'équipe avait alors montré par des analyses structure/fonction que certains domaines de MDM2 influençaient sa localisation subcellulaire. En effet, l'absence du domaine acide de la protéine induit la relocalisation spontanée de MDM2 à la chromatine. Ce domaine central est indispensable à l'activation de l'activité E3 ligase de la protéine car pour que celui-ci soit actif, il faut que le domaine RING-finger soit replié sur le domaine acide [178]. Les travaux de Romain Riscal ont permis de proposer l'hypothèse qu'en conditions basales, lorsque MDM2 avait cette conformation dite « fermée », la protéine était accessible aux protéines modifiant MDM2 de façon post-traductionnelle et régulant ainsi son activité E3 ligase principalement cytoplasmique. Dans des conditions de stress tel qu'un stress oxydant, MDM2 adopte alors une conformation dite « ouverte ». Le domaine RING n'interagit plus avec le domaine acide, faisant ainsi apparaître un domaine de liaison reconnu par ATF4 (**Figure 44**).

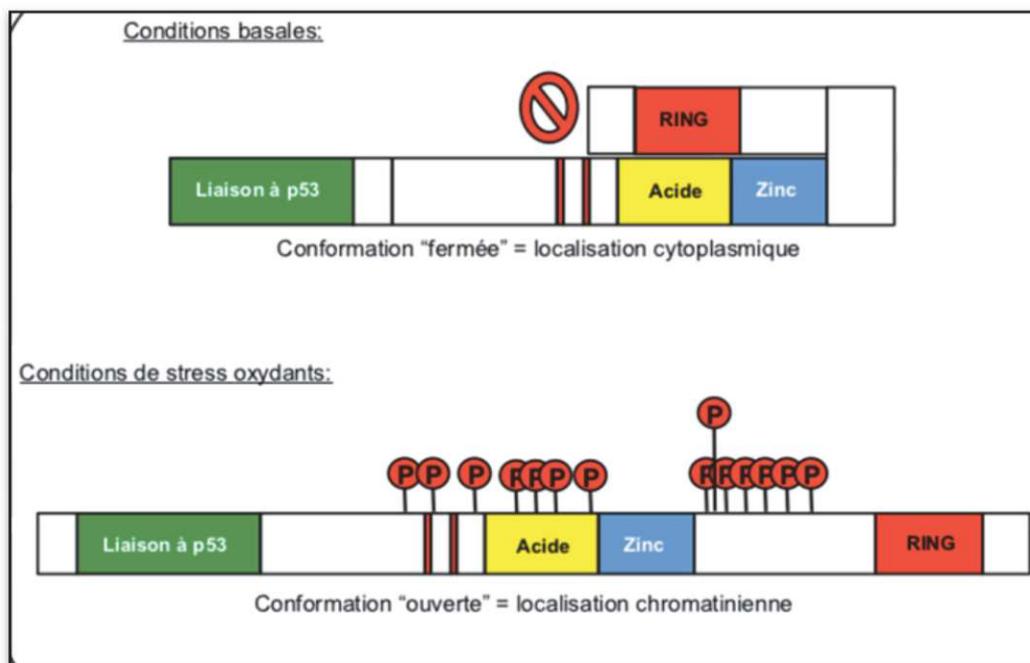


Figure 44 : Schéma du repliement de MDM2.

Il semblerait que le recrutement de MDM2 à la chromatine dans le liposarcome soit ATF4 dépendant. En effet, on peut voir qu'une déplétion par shRNA d'ATF4 dans une lignée cellulaire de LPS entraîne une diminution du recrutement de MDM2 à la chromatine ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire (**Figure 45**).

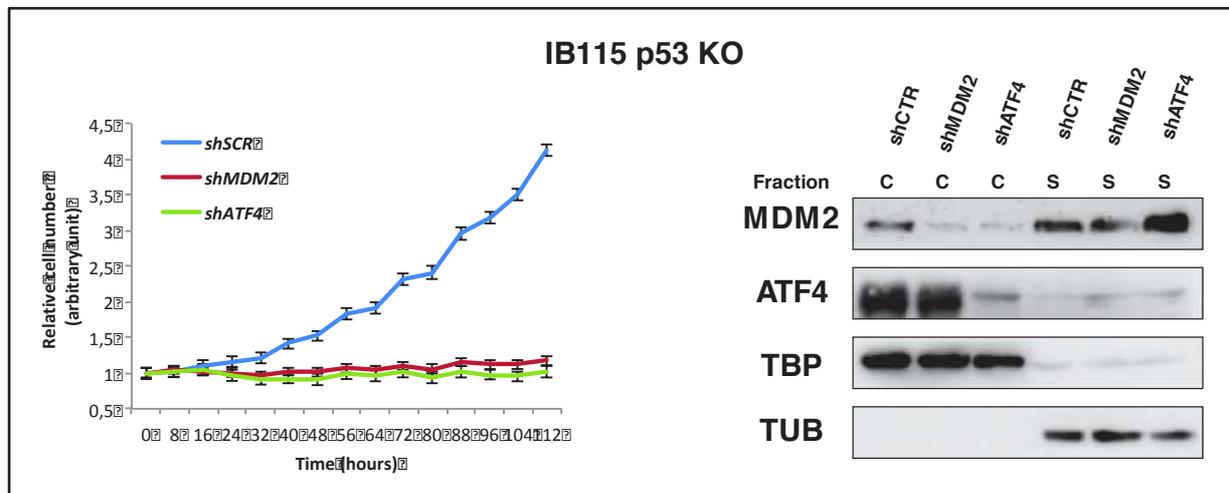


Figure 45 : Courbe de croissance d'IB115 P53 KO après infection avec un vecteur contrôle, *shMDM2* ou *shATF4*. Fractionnement subcellulaire de ces cellules. Fraction c= chromatinienne s= soluble.

Le mécanisme par lequel ATF4 transloque à la chromatine est peut-être la clé de la localisation subcellulaire de MDM2 dans les LPS. En effet l'un des mécanismes par lequel ATF4 est adressé à la chromatine repose sur une phosphorylation de ATF4 par la kinase TPL2 [410]. De plus, la translocation de ATF4 au noyau induit l'expression de PP2A qui est connu pour déphosphoryler MDM2 [411]. Or il se trouve que TPL2 est surexprimé dans 10% des LPS. Cette piste qui mérite d'être creusée d'avantage, pourrait être le processus agissant sur la conformation de MDM2.

En effet, on ne connaît pas les mécanismes par lesquels se fait le passage de l'état replié à l'état ouvert mais plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés comme étant associés à une localisation subcellulaire de MDM2. Effectivement, Romain Riscal a montré que lorsque PKM2 était inactivé, MDM2 était recruté à la chromatine. Dans des conditions normal, MDM2 et PKM2 forment un complexe protéique cytoplasmique dans lequel MDM2 est phosphorylé sur les résidus S166 et T351 de façon PKM2 dépendent. De plus, un mutant non phosphorylable de MDM2 sur ces 2 résidus est spontanément recruté à la chromatine. Notre hypothèse était alors qu'il existe des kinases qui phosphoryleraient MDM2 (le séquestrant ainsi dans le cytoplasme) et dont l'activité serait dépendante de l'état de la cellule (exemple : stress oxydatif ; carence en sérine). Dans le cas du liposarcome, on peut imaginer plusieurs scénarios quand à la localisation chromatinienne de MDM2. Nous avons tenté de trouver parmi les banques de données génomiques (à l'aide de l'équipe de Frédéric Chibon) si une ou plusieurs enzyme susceptibles de dé-phosphoryler MDM2 étaient également amplifier. Nous n'avons rien trouvé à ce jour. Il semblerait que seule l'amplification génique de *MDM2* soit un élément constant. Nous avons

également cherché à savoir si l'un des variant de MDM2 (retrouvé préférentiellement sous la forme ouverte) pouvait être sur-exprimé dans les LPS mais il ne semblerait pas que ce soit le cas. Toutes les hypothèses restent donc ouvertes sur la façon dont a lieu le recrutement de MDM2 à la chromatine.

La différenciation adipocytaire :

Une autre hypothèse intéressante vient d'une observation faite lors de la différenciation adipocytaire. En effet, les LPS qui ont bien souvent l'aspect du tissu adipeux mature et dont l'origine est souvent adipocytaire, nous ont poussés à étudier plus en détail ce processus physiologique. Il se trouve que, au cours de la différenciation adipocytaire *in vitro*, les cellules passent par un pic de prolifération, de manière très rapide et font face à un pique de stress oxydatif [412]. Durant cette vague, nous avons remarqué que MDM2 était alors recruté à la chromatine (**Figure 46**). On peut également ajouter à cela le fait que MDM2 a été montré comme étant impliqué dans le contrôle transcriptionnel du gène C/EBP δ lui-même nécessaire à l'initiation de l'adipogenèse [299].

De façon intéressante, les cellules 3T3L1, modèle de différenciation adipocytaire couramment utilisé *in vitro*, ont pour caractéristique une amplification du gène *MDM2*. Ces cellules induisent le développement de liposarcomes lorsqu'elles sont xénogreffées chez la souris [1][413][414].

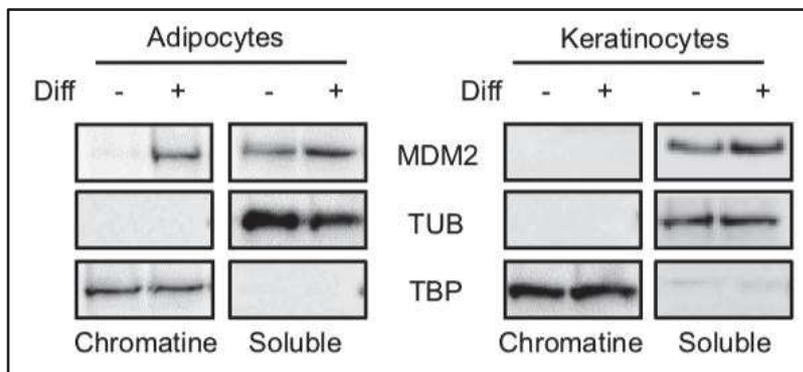


Figure 46 : Lors de la différenciation adipocytaire de MEFs primaires, MDM2 est recruté à la chromatine. Ce n'est pas le cas, par exemple, lors d'une différenciation kératinocytaire.

De plus, on pourrait penser que l'incidence du liposarcome serait plus grande chez des patients obèses ou ayant une masse adipocytaire plus importante. Or, ce n'est pas le cas. Actuellement, nous n'avons que très peu d'informations sur l'étiologie du liposarcome et sur ses facteurs de risques présumés. Toutefois, une étude récente menée en Suède a montré qu'il existait un lien entre la survenue d'un LPS et les traumatismes physiques sur les membres. Bien que les cellules adipocytaires soient surtout connues pour être impliquées dans le stockage énergétique, leur rôle s'étend à d'autres fonctions plus singulières comme la réparation et la cicatrisation. Effectivement, suite à une blessure, des pré-adipocytes peuvent migrer et initier une

différenciation en adipocyte mature sur le lieu du traumatisme dans le but de médier le recrutement de fibroblastes nécessaire à la réparation [415][416].

Prises ensemble, toutes ces données peuvent nous laisser présumer que la survenue d'un LPS pourrait être due à un « accident » au cours de la différenciation adipocytaire. On pourrait imaginer qu'au cours du processus, un accident génétique entraînant la sur-expression de *MDM2* confirait à ces cellules un avantage sélectif considérable par rapport aux autres cellules saines en cours de différenciation du fait que MDM2, en parallèle, inhiberait les effets tumeur suppresseur de p53 et permettrait aux cellules de moduler leur réponse antioxydante via la reprogrammation métabolique médié par MDM2.

2) MDM2 à la mitochondrie dans les LPS, un rôle important pour le métabolisme du 1C?

Comme décrit dans la partie « Résultats », notre laboratoire vient de démontrer qu'une fraction de MDM2 pouvait également être localisée dans la mitochondrie (indépendamment de p53) pour réguler la transcription du génome mitochondrial (Arena et al., 2018). Mes données préliminaires indiquent par ailleurs qu'une fraction de MDM2 est localisée à la mitochondrie dans différentes lignées de LPS. Il apparaît donc important d'évaluer la contribution relative des pools nucléaires et mitochondriaux de MDM2 dans le développement des LPS. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé des expériences de complémentation *in vitro* dans des lignées de LPS avec un mutant de MDM2 allant spontanément à la mitochondrie et dépourvu de son activité E3 ligase (MDM2-MTS) (**Figure 47**).

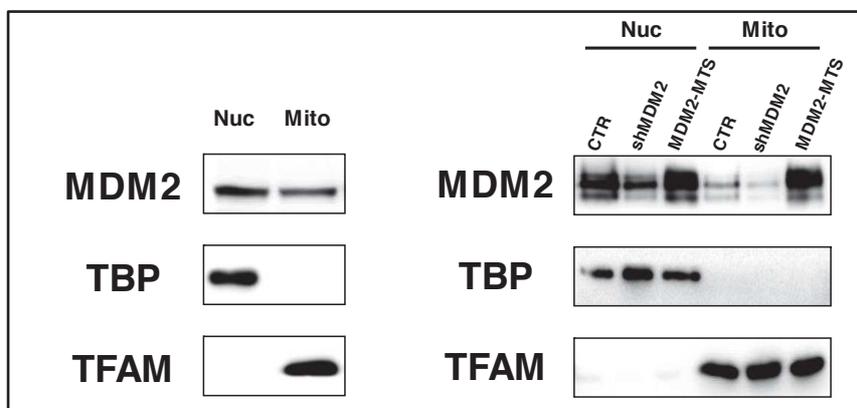


Figure 47 : Western Blot sur un fractionnement subcellulaire d'IB115, montrant qu'en plus d'une localisation nucléaire (Nuc) MDM2 est également retrouvé à la mitochondrie (Mito). On constate également que le mutant MDM2-MTS est spécifiquement surexprimé au niveau de la mitochondrie.

J'ai ensuite évalué la survie de ces cellules après traitement à l'inhibiteur de MDM2 le SP141 (**Figure 48**). On remarque que la surexpression du mutant chromatinien de MDM2 permet une survie quasi totale tandis que le mutant mitochondrial de MDM2 lui confère un « rescue » partiel de l'ordre de 10-15 %.

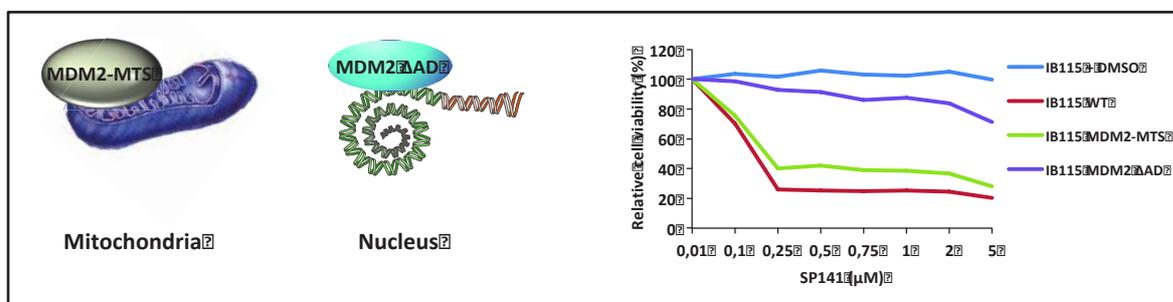


Figure 48 : Evaluation de la mort cellulaire induite par le SP141 dans une lignée de LPS sur-exprimant le mutant MDM2-MTS [27] ou MDM2 ΔAD.

Par conséquent, il est tentant de penser que les pools de MDM2 associés aux mitochondries et à la chromatine contribuent à une réponse métabolique globale nécessaire pour faire face à un déséquilibre de la balance redox.

En effet, le programme transcriptionnel régulé par la fraction chromatiniennne de MDM2 implique le contrôle du métabolisme de la sérine et donc du métabolisme du 1C. Il semble donc logique d'imaginer que la fraction mitochondriale de MDM2, qui influe sur la structure et l'organisation mitochondriale, devrait également influencer sur le métabolisme du 1C qui est, rappelons-le, essentiellement mitochondrial. Dans le liposarcome, on pourrait donc imaginer que l'amplification de MDM2 et ses différentes activités dans la cellule fonctionneraient de concert pour assurer des fonctions complémentaires et ainsi optimiser et contrôler le métabolisme à différents niveaux.

Il serait maintenant intéressant de chercher à évaluer si ces différents pools de MDM2 pourraient jouer un rôle complémentaire (synergique ?) dans le développement des LPS. Pour cela, on peut imaginer plusieurs expériences consistant à mesurer, par exemple, la survie ou la prolifération de cellules de LPS complémentées avec MDM2-MTS et MDM2 Δ AD.

Il faudrait également tenter de décortiquer les phénotypes engendrés par ces différents mutants. En effet, comme détaillé dans l'article de Arena et al., nous avons constaté que la fraction mitochondriale de MDM2 améliorait les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses. On pourrait alors imaginer que l'action de MDM2 au niveau de la mitochondrie servirait à la prise tumorale tandis que MDM2 au niveau de la chromatine assurerait la croissance.

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur la régulation du métabolisme de la sérine par la fraction chromatiniennne de MDM2 dans les LPS. Cependant, il est très peu probable que cette fonction de MDM2 soit la seule propriété à avoir été sélectionnée et à aboutir à la pression de sélection autour de l'amplification de MDM2 dans ce type tumoral.

Comprendre le fonctionnement global de MDM2 dans le développement des LPS nous permettra également d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces.

3) Une carte du métabolisme des Liposarcomes :

Pour améliorer nos connaissances sur le métabolisme du liposarcome et connaître plus en détail l'implication de MDM2 sur celui-ci, l'un des projets du laboratoire est de constituer une carte métabolique des LPS.

Les travaux de Romain Riscal ont montrés que MDM2 était capable de réguler une centaine de gènes du métabolisme. Nous nous sommes concentrés sur une partie de la réponse dans nos études mais il reste de nombreuses voies à explorer. Mon travail de thèse a permis d'initier le profilage génomique et métabolique d'une lignée de LPS (IB115), notamment grâce à des expériences de profilage isotopique à base de glucose ^{13}C et sérine ^{13}C . Nous avons analysé de manière approfondie la partie du réseau métabolique qui nous intéressait, mais nous avons pu observer des variations métaboliques à d'autres niveaux qu'il serait intéressant d'explorer en détail.

Par exemple, il se trouve qu'une perturbation de l'expression de MDM2 dans les IB115 induit un fort relargage de l'alanine et de la proline dans le milieu extracellulaire. Nous avons, par ailleurs, observé une augmentation de l'alanine circulante dans le sang des souris portant une tumeur.

L'idée maintenant est de réaliser des cartes de flux sur plusieurs lignées de LPS par des approches métabolomiques non ciblées et basées sur la spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour déterminer les niveaux relatifs ou absolus de différentes classes de métabolites (glucides, lipides, acides aminés, TCA, etc.) intracellulaires mais aussi extracellulaires (dans le milieu de culture). Ce profilage devra être réalisé de manière strictement standardisée afin de se concentrer sur les caractéristiques communes de la reprogrammation métabolique des LPS.

Grâce à l'utilisation de données de traçage d'isotopes stables basées sur des substrats énergétiques marqués au ^{13}C (via du glucose, de la glutamine, de la sérine ou du palmitate marqués au ^{13}C), nous pourrons modéliser les flux métaboliques dans les cellules de LPS présentant des altérations génétiques définies de MDM2. Contrairement à mes travaux de thèse qui constituent un projet pilote entre notre équipe et la plateforme MetaToul (INSA, Toulouse), l'objectif sera d'élargir l'analyse à d'autres classes de métabolites, telles que les lipides. Comme évoqué plus haut, étant donné que les LPS ont très souvent une composante adipocytaire, nous pensons que l'étude des fonctions de MDM2 dans le métabolisme des LPS pourrait être liée au métabolisme des lipides. De façon plus générale, ce projet pourrait mener à l'identification de voies métaboliques qui n'ont pas encore été associées à MDM2.

Pour mieux définir ce réseau métabolique, l'ensemble de ces données pourra être complété par des profils d'expression génique de ces mêmes cellules. Cette étape pourrait être réalisée par une approche de RT-qPCR de type microfluidique. Cette approche de profilage d'expression génique à moyenne échelle offre plusieurs avantages, parmi lesquels la possibilité de profiler simultanément et quantitativement

dans une seule plaque les niveaux d'ARNm de 94 gènes dans 94 échantillons sur une quantité très limitée de matériel.

Par la suite, ce grand ensemble de données générées pourra être analysé à l'aide de méthodes de modélisation informatique (modélisation à base de contraintes et analyse de flux *in silico*) reposant sur plusieurs outils bioinformatiques, tels que la boîte à outils Matlab COBRA, Recon 3D ou MetExplore [417][418][419]. Ces méthodes ont été développées pour intégrer des données de métabolomique, de fluxomique et de génomique afin de reconstituer un réseau métabolique *in silico*. En utilisant nos propres ensembles de données expérimentales, il sera possible d'appliquer ces outils pour étudier de manière plus globale les réseaux métaboliques régulés par MDM2 dans les cellules de LPS et de prévoir les conséquences de sa perturbation. Cette approche permet de prédire un flux par le biais d'une réaction basée non seulement sur le niveau d'expression de son gène associé, mais également en tenant compte de l'activité des réactions en amont et en aval dans le réseau. Cette approche nous permettra de prédire indirectement les flux métaboliques via des réactions qui pourraient échapper en partie à l'expression des gènes ou aux analyses métabolomiques. En d'autres mots, c'est un système de prédiction des distributions les plus probables des flux métaboliques en fonction des données d'expression génique et de la topologie du réseau.

Les contraintes qui sont appliquées à ces systèmes et qui proviennent de nos données expérimentales peuvent être de nature variée, à l'instar des variations mesurées dans la concentration des métabolites dans le milieu de culture. On pourrait ainsi évaluer les conséquences de la perturbation de l'activité de MDM2 et prévoir son impact sur les taux de production/consommation de métabolites importants. On pourrait également prévoir d'éventuelles dépendances métaboliques et ainsi tester des thérapies ciblées sur le métabolisme dans nos modèles *in vivo*.

Cette approche est très intéressante car ces modèles informatiques qui utilisent des données connues sur plusieurs milliers de réactions et de métabolites nous permettront d'étendre la recherche sur les réseaux métaboliques associés à MDM2 au-delà des voies métaboliques que l'on peut classiquement analyser par des expériences de traçage isotopiques et qui présentent des limites techniques (comme la détection de certains composés).

Dans un projet à plus grande échelle et à plus long terme, on peut imaginer réaliser ce type de carte métabolique sur un grand nombre de lignées de sarcomes et ainsi créer une reclassification des sarcomes suivant leur profil métabolique. Cela ouvrirait la voie à une nouvelle approche de la prise en charge clinique des patients atteints de sarcome, puisqu'on pourrait compléter ou associer aux thérapies existantes des traitements « métaboliques » suivant les profils métaboliques décrits.

4) Des biomarqueurs métaboliques pour améliorer la prise en charge des LPS.

Durant ma thèse, j'ai montré que MDM2 dans les LPS régulaient une signature métabolique caractéristique liée au métabolisme de la sérine. Parmi les gènes cibles régulés par MDM2 se trouve un grand nombre de gènes codant pour des protéines impliquées dans le transport de nutriments, telles que les transporteurs de sérine SLC1A4 et SERINC1. Au vu de mes observations quant à la dépendance des LPS à la sérine exogène notamment pour soutenir leur besoin anabolique et maintenir leur prolifération, nous avons monté un projet en collaboration avec l'équipe de Marc Sitbon qui vise à exploiter cette caractéristique dans le but de développer de nouveaux outils pour améliorer la prise en charge des patients atteints de LPS.

L'équipe de Marc Sitbon a développé des biomarqueurs dérivés des glycoprotéines d'enveloppes de rétrovirus qui ont la particularité de lier des transporteurs membranaires permettant ainsi aux virus d'infecter les cellules de l'hôte [420]. En l'absence d'outils de mesure fiables pour la détection et la quantification des transporteurs de surface, ces petites molécules, appelées RBD pour Receptor-Binding Domains, constituent de fantastiques accessoires [421].

Pour ce projet, avec l'aide de Alix Bouillin pendant son stage de master 2, nous avons dans un premier temps criblé par RT-QPCR l'expression de plus de 18 transporteurs de type SLC (pour solute carrier) en présence ou non d'un *shMDM2* dans une lignée cellulaire de LPS (**Figure 49**).

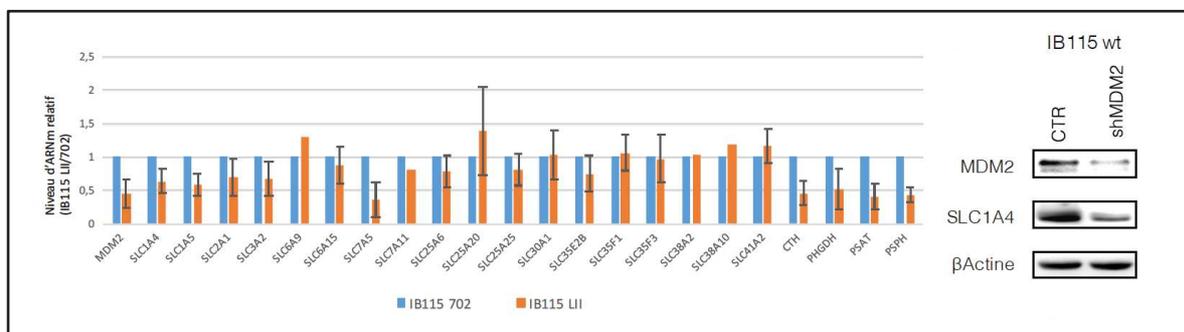


Figure 49 : Crible de l'expression des transporteurs métaboliques dans la lignée IBB15 72h après infection avec un *shMDM2*.

Nous avons ainsi pu confirmer que l'expression de certains d'entre eux, tels que SLC1A4, SLC1A5, SLC7A5, était régulée par MDM2.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si certains de ces transporteurs étaient surexprimés par les LPS en comparaison avec le tissu sain de patient. L'idée étant de trouver un biomarqueur spécifique des LPS qui pourrait faciliter le diagnostic de la maladie, le traitement ou encore guider le chirurgien lors d'une intervention si l'on imagine coupler ces molécules à un marqueur fluorescent.

Pour cela, nous avons, grâce à la BCB sarcome du centre, criblé par RT-QPCR l'expression de ces gènes directement sur du tissu tumoral en comparaison avec du tissu adipeux prélevé sur des patients sains ou du tissu adipeux sain de chaque patient, prélevé à distance de la tumeur (**Figure 50**).

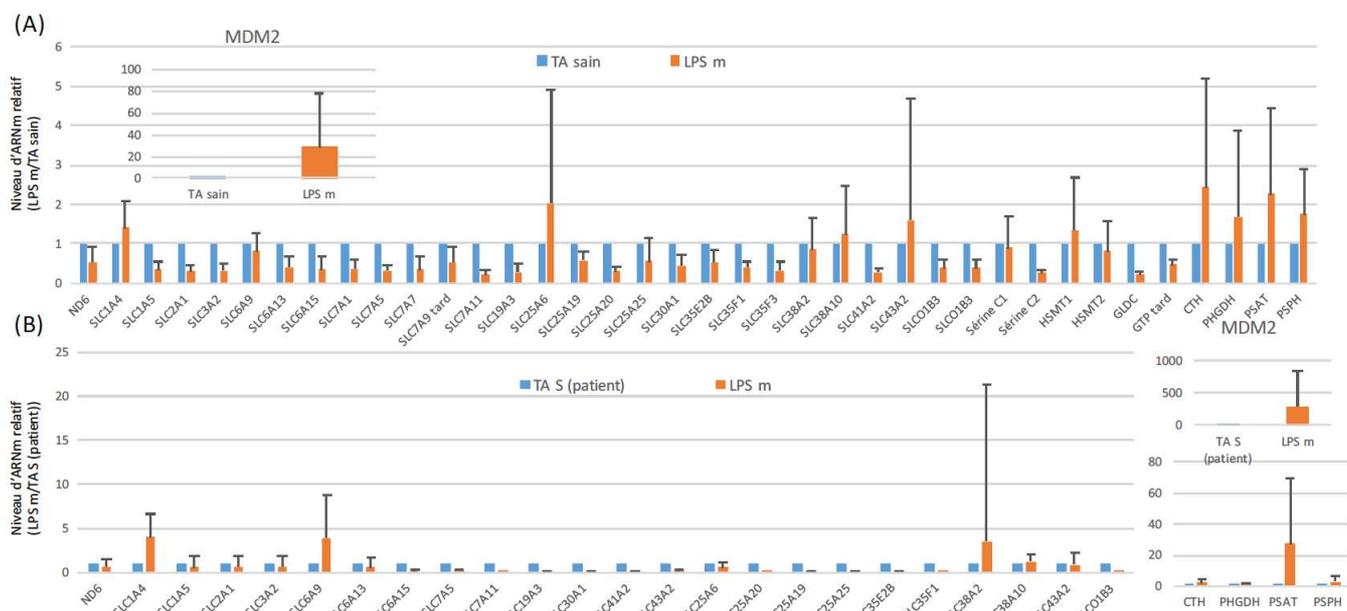


Figure 50 : L'expression génique des tumeurs de 9 patients a été comparée avec du tissu adipeux sain indemne de néoplasie (A) ou par le tissu adipeux sain de chaque patient (B).

Ces résultats ont fait ressortir le fait que le transporteur SLC1A4 est bien surexprimé dans les LPS par rapport au tissu adipeux sain et qu'il semble être un bon candidat pour développer des biomarqueurs permettant de détecter spécifiquement ce type de tumeurs.

Nous avons donc réalisé un crible avec des RBD existants sur des lignées de sarcomes et identifié deux RBD comme biomarqueurs potentiels : HERVWRBDMfc (HW) et RD114RBDMfc (RD) qui se lie préférentiellement à SLC1A4 et SLC1A5. Pour tester la spécificité de ces molécules à chaque transporteur, nous avons par cytométrie en flux et immunohistochimie mesuré l'affinité de chaque RBD sur des lignées cellulaires de LPS en condition de déplétion de SLC1A4 et SLC1A5. Ainsi il semblerait que HW soit capable de se lier aux deux transporteurs avec une affinité plus forte pour SLC1A4 tandis que RD se lie également aux deux transporteurs mais avec une affinité plus forte pour SLC1A5. Idéalement il faudrait identifier un RBD spécifique pour éviter tout risque de faux positif, c'est pourquoi en parallèle du travail de l'équipe de Marc Sitbon pour identifier de nouveaux RBD spécifiques, nous tentons de développer un anticorps spécifique du domaine extracellulaire de SLC1A4.

L'étape suivante de ce projet consiste à tester l'utilisation de ces RBD directement sur du tissu tumoral. Pour l'instant, les premières mises au point ont été initiées sur des coupes histologiques de tumeur et de tissu sain. Cette étude préliminaire qui demande à être approfondie est la première à tester les RBD en tant que biomarqueurs dans les LPS. Elle permettra peut-être un jour d'améliorer le diagnostic anatomopathologique, en médecine nucléaire dans un premier temps mais pourquoi pas, par la suite, en chirurgie grâce à la fluorescence per-opératoire, afin d'améliorer la qualité du traitement chirurgical qui reste à ce jour le seul traitement curatif de cette pathologie.

5) Un dialogue métabolique entre la tumeur et les organes :

L'étude du développement d'une tumeur *in vivo* est à prendre dans un contexte systémique. En effet, l'impact des cellules cancéreuses sur leur environnement (à la fois localement et à distance) est connu pour favoriser la malignité et la chimiorésistance. On sait que les cellules cancéreuses sont en compétition avec les cellules immunitaires pour le glucose, par exemple [422]. Mais la relation entre les tumeurs et l'organisme ne se limite pas au système immunitaire. Le cancer entraîne également des altérations du métabolisme dans tout le corps, qui sont susceptibles d'influencer la disponibilité des nutriments dans la tumeur. Comprendre les interactions entre les cellules cancéreuses et le métabolisme environnemental sera essentiel pour associer des thérapies ciblées sur le métabolisme à des chimiothérapies.

Durant mon projet de thèse, au vu des effets obtenus par un régime sans sérine/glycine sur la croissance des LPS, nous avons tenté de mesurer les niveaux en acides aminés circulant dans le sérum de nos modèles de PDX de LPS murins. Paradoxalement, il se trouve que les niveaux de sérine et de glycine circulants sont plus importants dans le sérum des souris portant une tumeur que pour les souris contrôles (**Figure 51**).

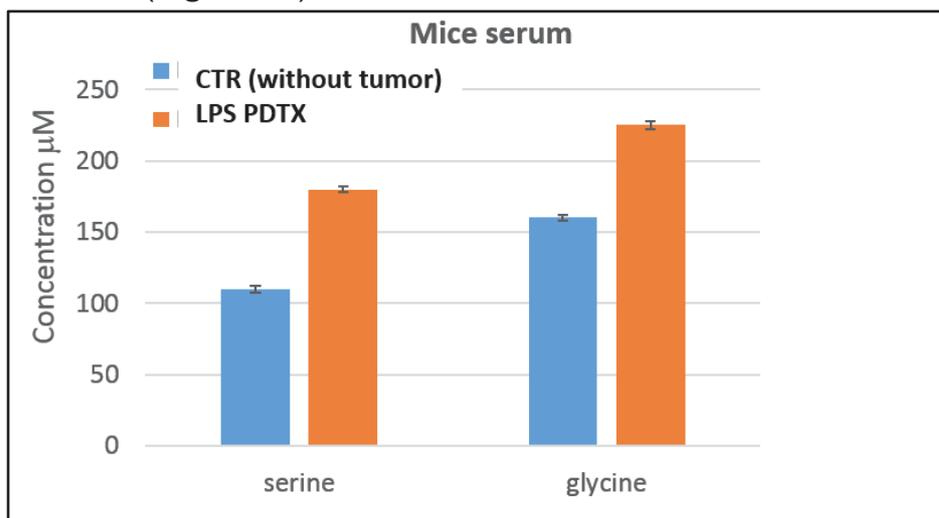


Figure 51 : Dosage des acides aminés par HPLC des acides aminés présent dans le sérum de souris nues.

La mise en place de la BCB sarcomes nous a permis d'accéder à des échantillons de sérum de patients. Sur la base des résultats obtenus sur notre modèle murin, nous avons constaté que les niveaux de sérine dans le sérum de 9 patients atteints de LPS étaient diminués après résection chirurgicale de la tumeur (**Figure 7**).

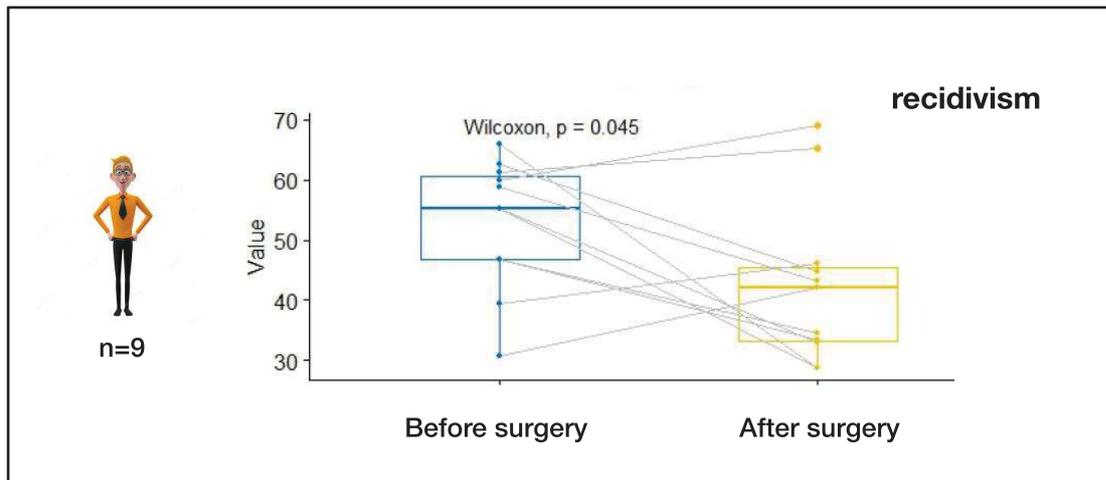


Figure 7 : Dosage de la sérine par HPLC des acides aminés présent dans le sérum de 9 patients atteints de LPS, avant et après chirurgie.

Il est intéressant de noter que les deux patients pour lesquels le niveau de sérine n'est pas descendu après l'opération ont par la suite présenté une récidive, suggérant une présence résiduelle de la tumeur.

Nous avons actuellement à disposition les échantillons sanguins de plus de 200 patients afin de déterminer si les taux de sérine et de glycine en circulation pourraient constituer un nouveau biomarqueur rapide pour le diagnostic du LPS.

Au regard de l'ensemble de ces observations préliminaires et étant donné la « dépendance » des LPS à la sérine/glycine, nous nous attendions à ce que la sérine circulante soit moins importante puisqu'elle serait consomm e par la tumeur. Il semblerait donc que les niveaux plus élevés de sérine chez des individus portant une tumeur proviennent soit de la tumeur en elle-même, soit d'une synthèse ou d'un relargage par un autre organe.

Nous avons donc souhaité étudier plus en détail le mécanisme de pathog nese du liposarcome en ce qui concerne une coopération métabolique potentielle entre les tissus normaux et la tumeur. Pour cela j'ai comparé les niveaux d'expression des gènes de la SSP dans différents tissus de souris nues portant un LPS (**Figure 52**).

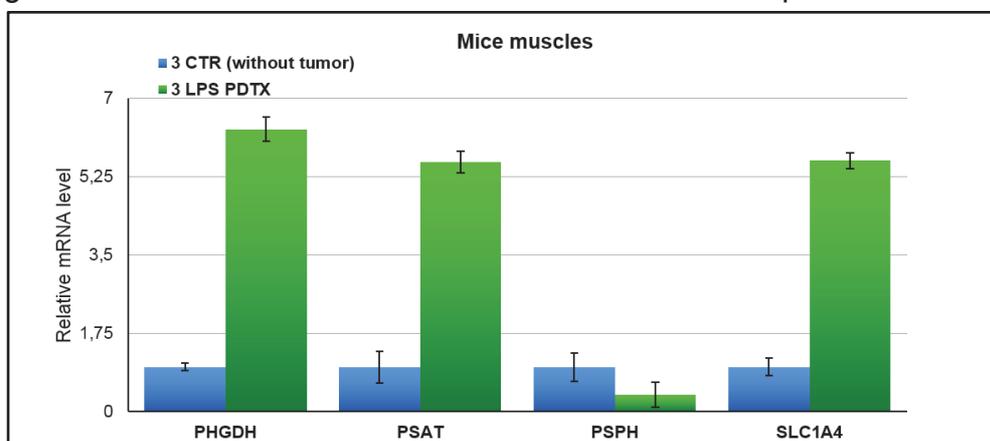


Figure 52 : Niveau relatif d'ARNm de *Phgdh*, *Psat*, *Psph* et *Slc1A4* dans les muscles de souris PDTX-LPS.

De manière frappante, il se trouve que le muscle squelettique se met à exprimer fortement les gènes codants pour la synthèse *de novo* de sérine. Ces données préliminaires ont par la suite été confirmées par un étudiant en thèse du laboratoire (Jaime Prieto) qui a observé une sur-expression de ces gènes dans le muscle des souris de plusieurs modèles de PDX de LPS mais aussi de xéno greffe de lignées cellulaires de LPS.

À ce jour, notre hypothèse serait que les LPS induiraient « en quelque sorte » la synthèse de sérine dans les tissus normaux pour répondre à leur demande massive en sérine. La reprogrammation métabolique des muscles squelettiques au cours du développement du LPS augmenterait la sécrétion de sérine dans le flux sanguin pour maintenir la croissance tumorale (**Figure 53**).

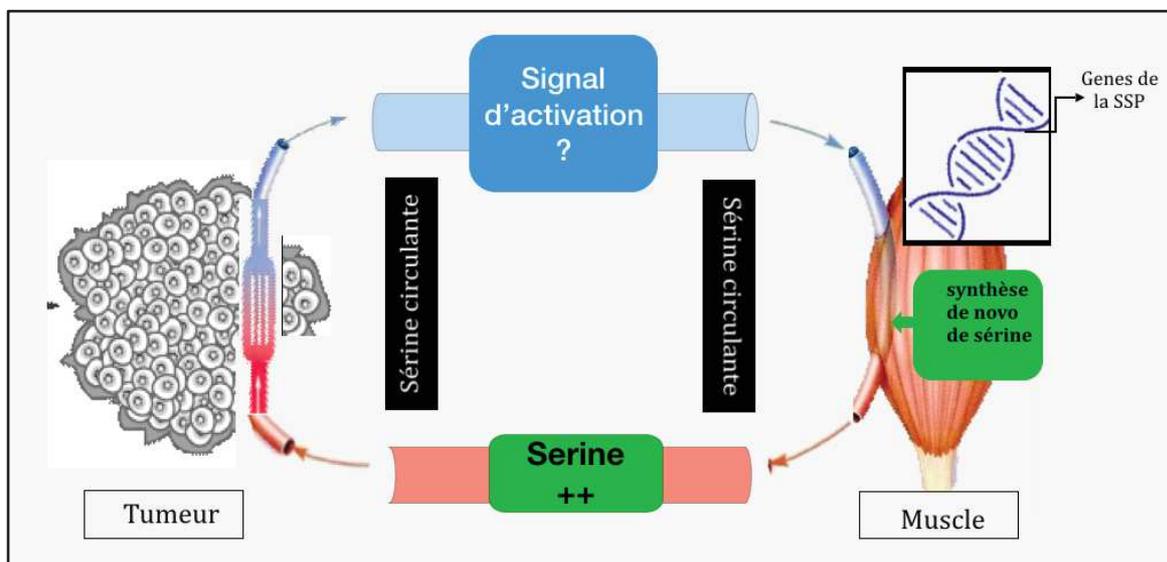


Figure 53 : Schéma du dialogue métabolique entre le muscle et la tumeur.

Une meilleure compréhension des mécanismes complexes par lesquels les LPS influent sur leur environnement, à la fois localement dans la tumeur et par le biais d'effets systémiques, pourrait à terme permettre de développer de nouvelles thérapies.

6) Un modèle murin de liposarcome :

Mon étude des fonctions métaboliques de MDM2 dans le développement des LPS *in vivo* a été réalisée dans des modèles murins de xénotransgreffe (lignées cellulaires ou de type PDTX). Pour aller plus loin dans la compréhension du développement des LPS *in vivo*, notamment en ce qui concerne la mise en place des stades précoces, la contribution des nutriments ou encore le rôle de différents organes, il est nécessaire d'avoir un bon modèle murin immunocompétent de LPS.

Actuellement, il n'existe pas de modèle murin « historique » et fiable de LPS. Dans cette partie, je tenterai donc dans un premier temps de décrire deux modèles *in vivo* de LPS récemment développés, puis d'imaginer quels seraient les moyens mis en place par notre laboratoire pour établir un modèle d'étude relevant.

En 2016, Stephen F. Konieczny et Shihuan Kuang ont développé un modèle de souris génétiquement modifiées, dont la voie Notch était constitutivement activée spécifiquement dans les adipocytes [423]. Ce modèle *Adipoq-Cre/Rosa^{N1ICD}* est basé sur une forme constitutivement active du récepteur de Notch, NICD (Notch intracellular domain). La transduction du signal de Notch est initiée lors de la liaison d'un récepteur de Notch avec le ligand, qui entraîne des clivages protéolytiques séquentiels du récepteur de Notch et la libération du domaine intracellulaire de Notch (NICD). Ces souris développent vers 8 mois des tumeurs solides à différents endroits du corps tel que le diaphragme, la colonne vertébrale, le rétro-péritoine ou encore des régions sous-cutanées. Une analyse histologique de ces tumeurs a montré qu'elles présentaient des similitudes sur le plan structurel avec les DD-LPS de patients. Au niveau moléculaire, ces tumeurs présentent également certains marqueurs diagnostiques des LPS comme *Mdm2*, *Cdk4* ou *p16*. Des analyses par microarray ont révélées que la signature « Notch » de ces tumeurs, n'était significativement enrichie au sein d'une base de donnée de sarcomes humains, que dans des tumeurs de DD-LPS.

Pour comprendre le processus de dédifférenciation du tissu adipeux en LPS, les auteurs ont suivi l'évolution du tissu adipeux dans ces souris et constaté qu'elles développaient graduellement une lipodystrophie résultant en une perte d'environ 90% de la masse du tissu adipeux. Par ailleurs, ils ont remarqué que l'activation de Notch dans ces cellules induisait une diminution de l'oxydation des acides gras, de l'absorption des lipides, de l'activité des voies d'oxydations et entraînait également une augmentation des ROS. Ces bouleversements métaboliques semblent être le point de départ de la dédifférenciation des cellules adipocytaires en DD-LPS.

Ici Konieczny et Kuang ont montré que des adipocytes matures pouvaient se dédifférencier en tumeur de type DD-LPS. Ce modèle pourrait être utilisé pour améliorer nos connaissances sur le processus de dédifférenciation des DD-LPS et l'impact qu'une perturbation métabolique pourrait avoir sur ces cellules. Cependant il me semble que ce modèle reste limité aux DD-LPS et ne permet pas d'avoir une vision plus large de la pathologie. En effet, rappelons qu'une grande partie des DD-

LPS proviennent d'une dédifférenciation d'un WD-LPS et qu'un modèle qui récapitulerait d'abord l'étape de transformation du tissu adipocytaire en WD-LPS serait plus relevant pour comprendre la maladie. De plus, bien que cela soit très intéressant qu'une perturbation métabolique médiée par la voie Notch induise des DD-LPS, on peut s'interroger sur le rationnel de cette approche. En effet, à ce jour, rien ne semble indiquer l'existence d'un lien entre une dérégulation de cette voie et la survenue de liposarcome chez les patients.

Enfin la dernière critique que l'on peut émettre sur ce modèle concerne le niveau de caractérisation de ces tumeurs. Il semble en effet que leur profil génétique soit proche de celui des DD-LPS humain, cependant lorsque l'on regarde les niveaux d'expression de *Mdm2*, ils ne semblent que faiblement sur-exprimer au niveau protéique et seulement 2x au niveau génique par rapport au tissu sain (WAT) contre 100x pour les 3T3L1 (**Figure 54**).

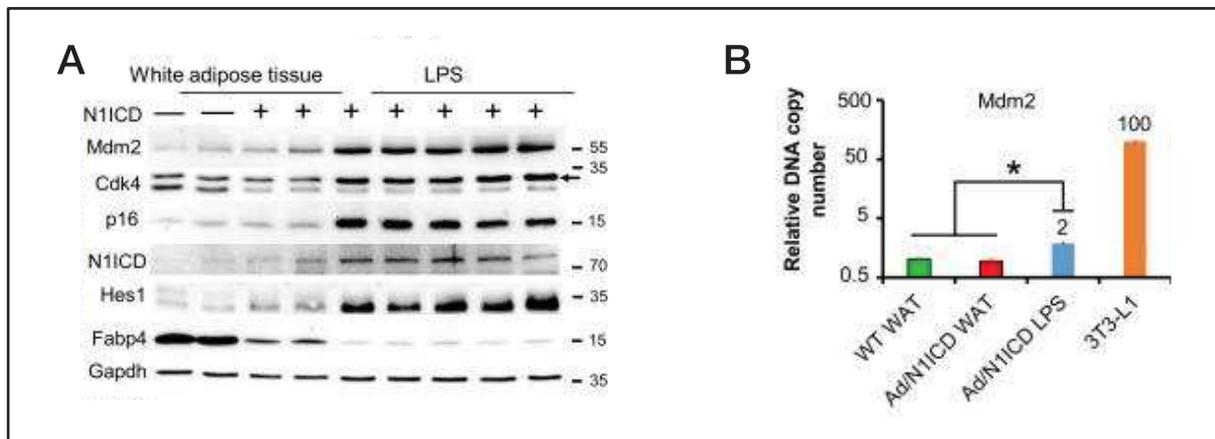


Figure 54 : (A) Western Blot de tissu adipeux WT ou Ad/N11CD comparé à du tissu humain de DD-LPS. (B) Comparaison relative du nombre de copies d'ADN génomique de *Mdm2* dans le tissu adipeux WT, Ad/N11CD ou dans des 3T3L1 (utilisées ici comme contrôle positif). (Adapté de Bi et al (2016) [423]).

Plus récemment l'équipe de Grant A. Mitchell a développé un modèle murin génétiquement modifié développant spontanément une forme unique de liposarcome [424]. En partant du postulat que les WD-LPS et les DD-LPS avaient une origine adipocytaire et que des défauts de lipolyse (une des voies métaboliques principale du tissu adipeux) ont été associés à la survenue du cancer [425] [426][427], ils ont généré une lignée de souris transgénique déficiente pour deux lipase du tissu adipeux. Ces souris DAKO (pour Double adipose knock out) n'expriment pas les deux principales lipases adipeuses ATGL et HSL, codées respectivement par les gènes *Pnpla2* et *Lipe*, dans le tissu adipeux brun et blanc. Il est intéressant de noter qu'une délétion de ces deux gènes est fréquemment observé dans les WD-LPS et les DD-LPS [428][429].

L'apparition de tumeurs est alors observée chez des souris âgées de 11 à 14 mois dans 100% des cas, au niveau du tissu adipeux brun. Une analyse histologique, morphologique ainsi qu'une comparaison des profils transcriptomiques de ces tumeurs en comparaison avec des tumeurs humaines de LPS a conduit à ce que ces tumeurs étaient des liposarcomes. On note la présence caractéristique de l'amplification de *Mdm2* et *Cdk4*.

Ce modèle, qui semble plus proche du liposarcome que celui généré par Konieczny et Kuang, devra être caractérisé d'avantage mais suscite un intérêt certain.

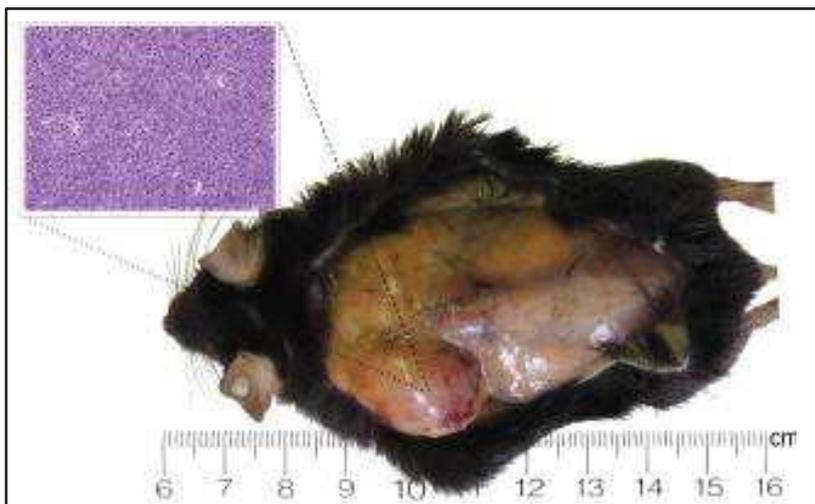


Figure 55 : Liposarcome dans la région inter-scapulaire gauche d'une souris DAKO âgée de 12 mois. (Adapté de Wu et al (2017) [424]).

Ces deux modèles murins sont à ce jour les seuls modèles d'études in vivo de développement spontané de LPS. Il y a un réel besoin quand à l'établissement d'un bon modèle in vivo pour améliorer notre compréhension du développement de la pathologie mais aussi pour tester de nouvelles thérapies.

L'un des projets du laboratoire consiste en l'établissement d'un modèle murin de LPS. Pour cela, l'une des stratégies repose sur notre hypothèse selon laquelle l'un des points de départ de la tumorigenèse du LPS surviendrait au moment de la différenciation adipocytaire. En effet comme évoqué précédemment, lors de la différenciation adipocytaire, MDM2 se retrouve recruté à la chromatine suite à l'augmentation des ROS. On pourrait alors imaginer que si l'on sur-exprime notre mutant de MDM2 (deltaAD), spontanément localisé à la chromatine, dans des pré-adipocytes murins, et que l'on greffe ces cellules dans une souris ayant le même fond génétique, ces cellules donneraient alors lieu à la formation d'une tumeur de type liposarcome.

L'avantage de cette méthode, qui est un modèle de xéno greffe, est qu'elle permet de greffer des cellules sur des souris génétiquement modifiées. On peut ainsi contourner la problématique de rejet, si l'origine des cellules est du même fond génétique que celui de la souris greffée. On peut alors imaginer étudier par exemple l'impact de l'expression de *Mdm2* dans les muscles sur la croissance tumorale dans une souris n'exprimant pas *Mdm2* spécifiquement dans les muscles (modèle Acta-cre). L'autre avantage d'un tel modèle de xéno greffe c'est qu'il tient compte du système immunitaire de la souris.

Ce modèle est comparable aux études évoquées précédemment et qui ont montrées que lorsque des 3T3 L1 (qui présentent une amplification de MDM2) sont greffées chez la souris, elles développent des tumeurs de type liposarcome [393][413][414]. Nous redérivons actuellement des souris dans le même fond génétique d'où proviennent les 3T3L1, c'est-à-dire des BALBC, dans le but de générer des modèles génétiquement modifiés pour greffer ce type de cellules. Nous voulons à terme pouvoir comparer ces deux type d'approche. Bien entendu l'établissement de ces modèles nécessite une caractérisation fine des tumeurs émergentes et devront s'avérer être le plus proche génétiquement et physiologiquement des LPS humain.

7) MDM2 une cible thérapeutique pour le liposarcome

Mes travaux de thèse ont montrés que cibler MDM2 et ses fonctions métaboliques, constituait une piste thérapeutique prometteuse pour le traitement des liposarcomes. Pour poursuivre dans cette voie, il faudrait poursuivre les recherches visant à développer des molécules induisant la dégradation de MDM2 ou perturbant ses fonctions métaboliques.

Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la plupart des travaux réalisés dans le but « d'inhiber » MDM2, reposent sur l'optimisation de molécule ciblant l'inhibition de l'interaction entre MDM2 et p53. Les problématiques qui se posent avec cette stratégie sont d'une part : qu'il a été montré que l'administration d'une dose de ses composés ne permettait l'accumulation de p53 dans les cellules ou dans les tissus que quelques heures suivant le traitement [430] ; et d'autre part, que ces molécules induisaient également la stabilisation de MDM2 dans les tissus, potentialisant ainsi ses potentielles effets indépendants de p53.

Pour surmonter ces limitations des inhibiteurs de MDM2, l'équipe de Shaomeng Wang a récemment développé des molécules basées sur le concept des PROTAC pour induire la dégradation de MDM2 [431].

Le système des PROTAC (pour proteolysis targeting chimera), officiellement découvert il y a 15 ans, consiste à détourner la machinerie cellulaire de dégradation des protéines, représenté par le complexe ubiquitin/protéasome, dans le but d'induire une dégradation ciblée d'une protéine donnée. Pour cela, le système PROTAC utilise une petite molécule bifonctionnelle contenant un ligand de petites molécules (se liant à la protéine d'intérêt cible) et un autre ligand de petites molécules se liant à un complexe ubiquitine-ligase E3, pour obtenir une dégradation ciblée de la protéine. L'approche PROTAC a récemment pris un élan considérable en raison notamment de l'augmentation de la disponibilité de ligands puissants pour les systèmes de dégradation de la culline 2 et de la culline 4A. Cette stratégie a été utilisée avec succès dans la conception de dégradeurs PROTAC puissants pour un grand nombre de protéines, notamment les protéines BET (bromodomain and extra-terminal) [432][433], le récepteur des androgènes [434] la tyrosine kinase BCR-ABL [435][436] ou encore le récepteur lié aux œstrogènes α (ERR α) [437].

Par cette approche, Shaomeng Wang et son équipe, ont créé le MD-224, une fusion de la molécule MI-1061 (un inhibiteur de l'interaction p53/MDM2) avec le ligand CBRN (cereblon ligand), qui est un adaptateur spécifique de l'ubiquitine E3 ligase de la cullin 4A (**Figure 56**).

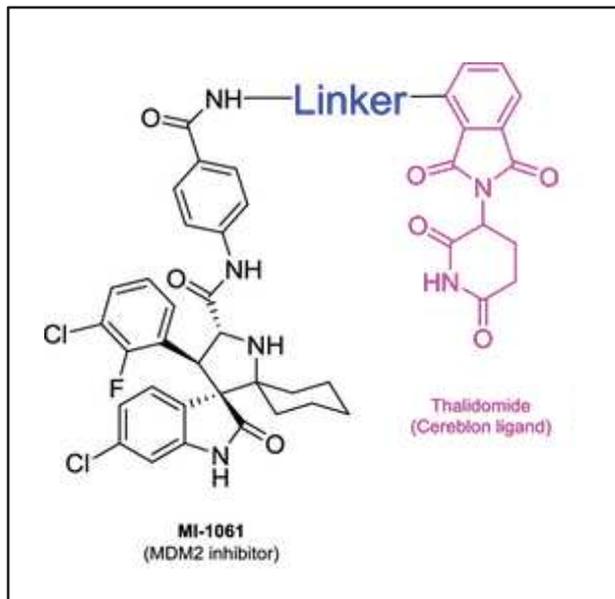


Figure 56 : Structure d'un inhibiteur de MDM2 de type PROTAC utilisant un inhibiteur de l'interaction P53/MDM2 avec un ligand CRBN. (Adapté de Li et al (2019) [431]).

Ce composé a par la suite été testé *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine de leucémie (RS4 ;11) arborant une version sauvage de p53. Son IC50 a alors été évalué à environ 1,5nM, contre environ 141nM pour le M1-1061 seul. Par Western blot, ils ont également confirmé que le MD-224 induisait bien la dégradation de MDM2, provoquant ainsi la stabilisation de p53 (**Figure 57**).

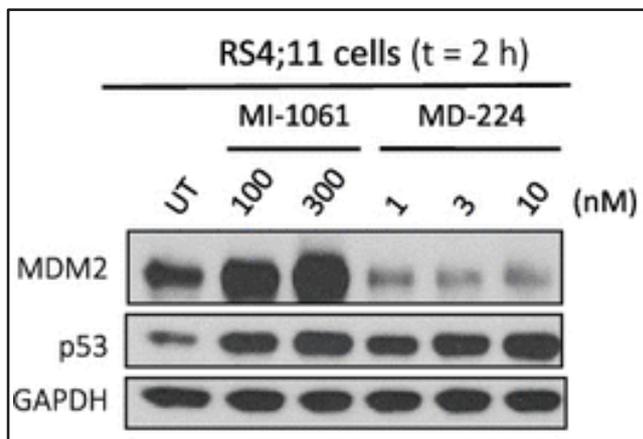


Figure 57 : Western Blot mesurant les niveaux des protéines P53 et MDM2 de la lignée RS4 ;11 après traitement avec le MI-1061 ou le MD-224. (Adapté de Li et al (2019) [431]).

Ils ont par la suite montré que le MD-224 était capable d'induire une forte régression tumorale quasi complète et durable dans le modèle de xénogreffe RS4; 11 avec des doses ne présentant pas de toxicité apparente.

Ces résultats très prometteurs nous laissent donc penser que ce type de composés serait idéal dans le cas du traitement des LPS et ne demandent qu'à être testé dans nos modèles de PDX.

Une autre approche dans l'optique de cibler MDM2 pour le traitement des LPS, consisterait à cibler directement les fonctions métaboliques de MDM2. Pour cela on pourrait imaginer élaborer des molécules inhibant la relocalisation de MDM2 à la chromatine. Par exemple, en inhibant l'interaction entre MDM2 et ATF4, qui comme évoqué précédemment semble être indispensable à sa relocalisation subcellulaire. Pour que cette stratégie soit intéressante, il est essentiel d'améliorer notre compréhension des mécanismes par lesquels MDM2 se retrouve spontanément associé à la chromatine dans les LPS.

7) Cibler le métabolisme comme stratégie thérapeutique pour le liposarcome?

Aujourd'hui, le challenge dans la lutte contre le cancer, en vue d'une meilleure stratification et prise en charge des patients, est le développement de thérapies plus ciblées, associées à de nouveaux outils de dépistage et d'identification de la maladie.

Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses est un aspect de la tumorigenèse suscitant un intérêt grandissant, y compris dans le domaine de l'élaboration de nouveaux traitements.

Historiquement, les anti-métabolites sont pourtant des molécules couramment utilisées en oncologie médicale. Parmi eux, on retrouve des agents de chimiothérapies, tels que le méthotrexate, un antifolate ciblant SHMT utilisé en première ligne notamment pour traiter les lymphomes, le cancer du sein ou la leucémie [438]. Une meilleure connaissance des voies métaboliques spécifiquement dérégulées pour chaque type de cancer permettra à l'avenir de développer des combinaisons d'inhibiteurs ayant potentiellement de meilleures efficacités cliniques que ces chimiothérapies souvent très toxiques et non spécifiques. Dans cette partie, je tenterai d'imaginer quelles pourraient être les futures pistes de recherche pour améliorer la prise en charge des patients atteints de liposarcome.

a) PHGDH une piste thérapeutique prometteuse:

Mes travaux de thèse ont mis en avant le rôle important de la voie de biosynthèse de la sérine pour le développement des LPS et ont révélé que la perturbation de cette voie métabolique impactait fortement leur prolifération. L'amplification de PHGDH dans plusieurs cancers et le fait que l'inactivation de PHGDH entraîne une inhibition sélective de la croissance des lignées cellulaires cancéreuses arborant une amplification de *PHGDH* ou une surexpression de PHGDH, ont poussé plusieurs équipes à concentrer leurs recherches sur le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de PHGDH.

D'un point de vue structurel, les inhibiteurs de PHGDH, comme tout autre inhibiteur de la voie de la synthèse de la sérine, ne doivent pas être capables de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, en raison de la structure de la BHE, l'apport de la sérine par la circulation sanguine est insuffisant et, de ce fait, la SSP dans le système nerveux central est indispensable aux cellules nerveuses pour fournir de la sérine à la synthèse de précurseurs impliqués dans de multiples voies métaboliques, telles que la biosynthèse de neurotransmetteurs [439].

Sur la base de cette observation, un inhibiteur de PHGDH (ou un inhibiteur d'une enzyme de la SSP) ne doit pas interférer avec l'homéostasie de la sérine dans le SNC afin d'éviter de potentiels effets secondaires neurologiques.

L'autre point important à prendre en compte dépend de la structure de PHGDH elle-même. En effet, PHGDH est une enzyme de 56,8 KDa ayant une activité déshydrogénase dépendante du NAD. La protéine humaine de PHGDH présente

plusieurs domaines dont les domaines de liaison aux nucléotides et aux substrats (le 3-PG) situés au niveau de la partie N-terminale et qui sont responsables de son activité catalytique. La partie C-terminale contient deux domaines qui jouent un rôle de régulation de l'enzyme. On y retrouve le domaine ACT (pour *Aspartate kinase-Chorismate mutase-TyrA*) et le domaine ASB (pour *Allosteric Substrate Binding*). Le domaine ACT est un domaine sur lequel la L-sérine se lie pour générer une boucle de rétrocontrôle négative, tandis que le domaine ASB ajoute un niveau supplémentaire de régulation allostérique de l'enzyme (**Figure 58**).

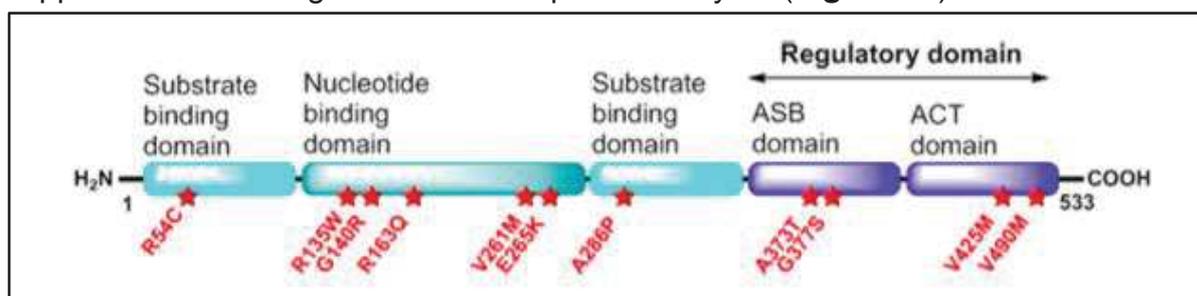


Figure 58: Structure de la protéine PHGDH. En rouge sont indiqués les mutations connues qui aboutissent à un défaut d'activité de l'enzyme. (Adapté de Ravez et al (2017) [52]).

Pour concevoir des inhibiteurs de PHGDH efficaces et spécifiques par rapport à d'autres déshydrogénases dépendantes du NAD, ces inhibiteurs doivent idéalement posséder un ou plusieurs groupes chargés négativement pour interagir avec les chaînes latérales basiques du site de liaison au substrat. De plus, la molécule doit être relativement petite pour tenir dans cette poche de liaison au substrat mesurant environ 10-12 Å. Il est également possible d'améliorer les propriétés physicochimiques de ces molécules en étendant la zone d'interaction jusqu'au site de liaison du NAD, une poche d'environ 20-22 Å.

Jusqu'à présent, deux stratégies principales ont été utilisées avec succès pour concevoir ces molécules. La première, dite de criblage de fragments (FBLD pour *Fragment-Based Lead Discovery*), consiste à cribler par cristallographie de petits fragments simples susceptibles de se fixer au site de fixation du NAD. Cette méthode utilisée par le groupe de AstraZeneca a permis la découverte de molécules dérivées de l'indole qui présentent une affinité intéressante pour PHGDH [440]. Ces composés ont une haute affinité pour PHGDH puisqu'ils se fixent à la fois au site de liaison au NAD mais aussi au site de liaison au 3-PG. On peut également citer les molécules, générées de la même façon par l'équipe de Curtin, et qui se fixent avec une très bonne affinité au domaine de liaison au NAD de PHGDH [441] (**Figure 59**).

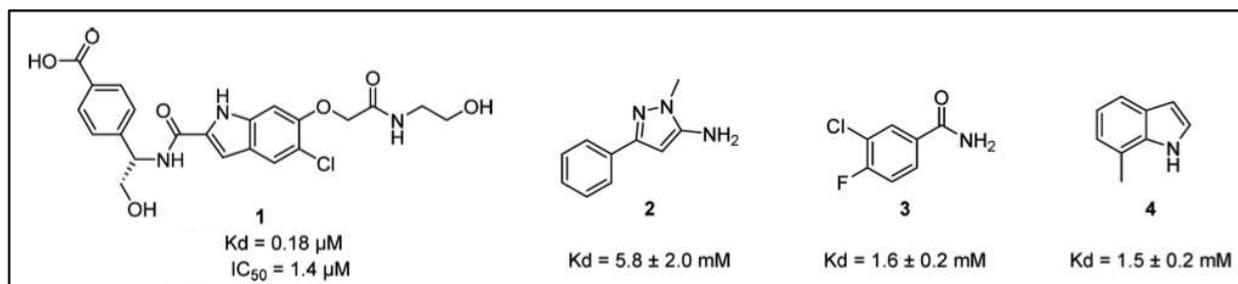


Figure 59: Structure des molécules générées par FBLD. La molécule 1 est issue du criblage du groupe de AstraZeneca et les molécules 2 à 4 de l'équipe de Curtin. (Adapté de Unterlass et al (2018) [441]).

La deuxième approche pour concevoir des molécules inhibitrices d'enzymes est la méthode de criblage à haut débit (HTS pour *High Throughput Screening*). Cette technique utilisée par l'équipe de Mullarky a permis de screener *in vitro* une bibliothèque de plus de 800 000 petites molécules sur PHGDH [442]. Les chercheurs ont ainsi identifié une classe de molécules appelée CBR qui inhibe l'activité de PHGDH (**Figure 60**). Les études menées sur le CBR-5884 ont montré que ce composé présentait une valeur d' IC_{50} de $33 \mu\text{M}$ sur des lignées cellulaires cancéreuses surexprimant PHGDH et qu'il n'avait aucun effet sur les cellules cancéreuses qui ne surexprimaient pas l'enzyme. L'équipe de Mullarky a montré par spectrométrie de masse qu'en plus d'inhiber la prolifération des cellules dites dépendantes de la synthèse *de novo* de sérine, cet inhibiteur réduisait spécifiquement la synthèse *de novo* de sérine d'environ 30 %. Toutefois, il est à noter que le mécanisme par lequel le CBR-5884 inhibe PHGDH reste à déterminer. En effet, il semblerait que cette molécule ne fonctionne pas selon un mode d'action de liaison compétitive, mais affecterait l'état d'oligomérisation de PHGDH. On peut également ajouter que les résultats des études préliminaires de l'utilisation de ce composé *in vivo* se sont avérés limités du fait que le CBR-5884 n'est que faiblement stable dans le sérum de souris.

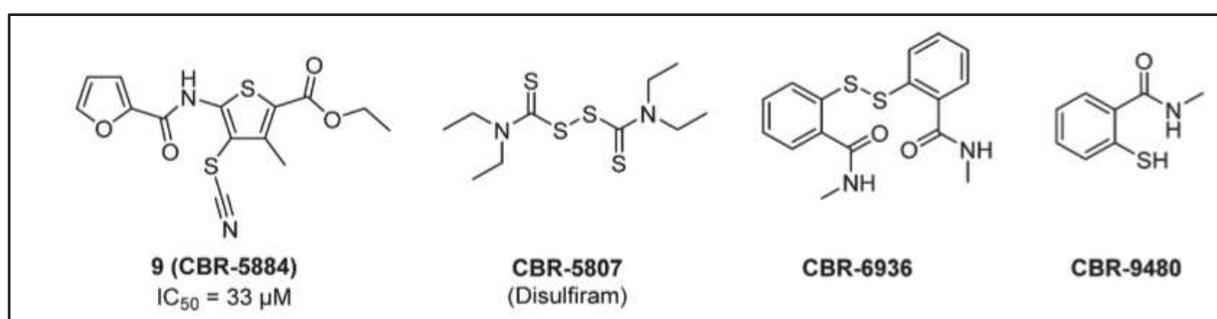


Figure 60 : Structure de quelques molécules créées par Mullarky et al (2016) [442].

Au cours de mes travaux, j'ai été amené à utiliser *in vitro* le CBR-5884 en vue d'évaluer l'impact d'une inhibition pharmacologique de la SSP dans les LPS. En adéquation avec l'impact de l'inhibition de l'expression des enzymes de la SSP par shRNA, j'ai ainsi pu constater que les lignées de LPS étaient sensibles à ce composé (**Figure 61**).

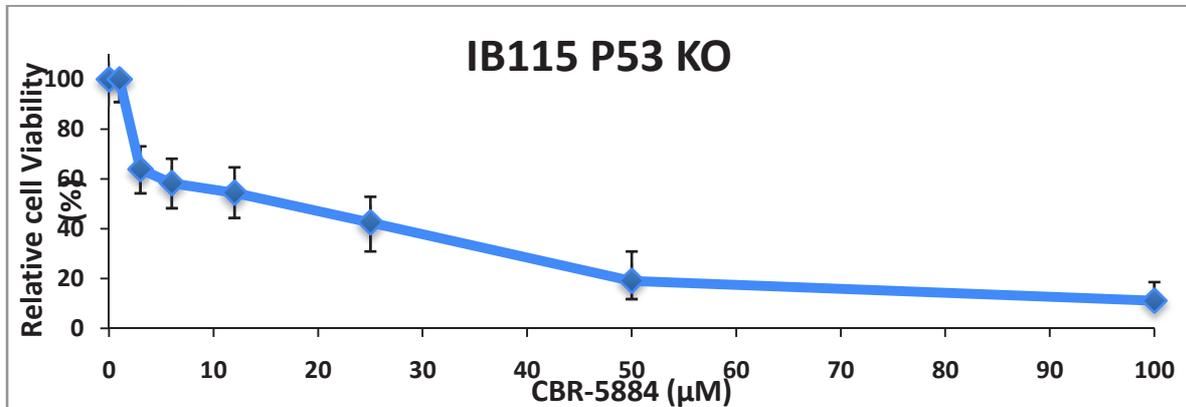


Figure 61 : Le CBR-5884 à un IC50 d'environ 16 μM pour la lignée IB115 P53 KO.

Les conclusions de Mullarky, à l'instar des recherches sur les inhibiteurs de PHGDH en général, montrent qu'il reste encore du chemin à parcourir pour améliorer ces composés en vue d'une utilisation en clinique. Cependant, ceux-ci constituent déjà de très bons outils *in vitro* pour l'étude des fonctions de la voie de biosynthèse de la sérine, notamment dans le cas du cancer. On peut prendre pour exemple les travaux récents d'équipes référentes dans l'étude du métabolisme, telles que les équipes de Sabatini, de Lewis C. Canley et de J. Locasale. [442][443][444].

b) Cibler le métabolisme du 1C:

Comme évoqué précédemment, le métabolisme de la sérine et celui du 1C sont en relation étroite puisque la sérine et la glycine constituent la source majeure de groupement méthyl du métabolisme 1C requis pour la synthèse *de novo* de nucléotides et la méthylation de l'ADN. Plusieurs études ont montré que MTHFD2 est l'enzyme métabolique la plus régulièrement surexprimée dans plusieurs types de tumeurs et qu'elle est également associée à une faible survie dans certains cas de cancer du sein [445]. Il semble donc que cibler le métabolisme mitochondrial du 1C pour le traitement du cancer constitue une approche thérapeutique intéressante. Certaines chimiothérapies de la famille des antifolates sont déjà basées sur l'inhibition du métabolisme à 1C, comme décrit dans le tableau ci-dessous.

| Composé | Cibles | Utilisation thérapeutique |
|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| Aminopterin | DHFR | Leucémie (n'est plus utilisé) |
| Methotrexate | DHFR | Large éventail de cancers |
| Pemetrexed | DHFR ; TYMS ; SHMT | Carcinome pulmonaire / Mésothéliome |
| Pralatrexate | DHFR | Lymphome |
| Raltitrexed | DHFR ; TYMS | Cancer colorectaux |
| 5-Fluorouracil | TYMS | Large éventail de cancers |

Tableau 1 : DHFR=dihydrofolate reductase; SHMT=serine hydroxymethyltransferase; TYMS=thymidylate synthase. (Adapté de Maddocks et Newman (2017) [446]).

Comme pour la plupart des thérapies non ciblées, les problèmes liés à la toxicité doivent se poser. Les cellules saines qui prolifèrent moins vite que les cellules cancéreuses ont également besoin d'avoir un métabolisme du 1C fonctionnel pour maintenir la balance redox. De plus, d'un point de vue structural, les inhibiteurs ciblant cette voie métabolique essentiellement mitochondriale, doivent franchir un obstacle majeur que sont les membranes lipidiques de la mitochondrie. Pour cela, ces molécules peuvent être liées à un cation lipophile pour augmenter leur accumulation dans la matrice mitochondriale.

Ces dernières années, plusieurs études menées notamment par les équipes de Chandel N ou Zhang J [87][447] ont dévoilé que le métabolisme mitochondrial du 1C constituait une voie prometteuse pour le traitement ciblé du cancer, en particulier dans les tumeurs hypoxiques pour lesquelles les options thérapeutiques restent limitées à ce jour. Il est intéressant de noter qu'une méta-analyse récente regroupant 16 études allant de 2006 à 2015 a montré que le marqueur de l'hypoxie, HIF-1 α , était associé à un plus mauvais pronostic dans les cancers des tissus mous [448]. Ajouté à cela que l'expression de HIF-1 α était significativement et positivement corrélée à la dédifférenciation du liposarcome [449], il semble cohérent de penser que les liposarcomes seraient des candidats pour les thérapies visant le métabolisme à 1C.

Pour l'instant, nous avons tenté de traiter nos modèles de PDX de LPS avec la doxorubicine en combinaison avec le SP141. L'idée était basée sur le fait qu'en tant qu'intercalant de l'ADN, la doxorubicine perturbe la synthèse des nucléotides et la structure de l'ADN et pourrait ainsi avoir des effets complémentaires et synergiques avec le SP141. En effet, nos données préliminaires montrent que le SP141 et la doxorubicine semblent avoir conjointement un meilleur effet sur la croissance tumorale que lorsqu'ils sont utilisés séparément (**Figure 62**).

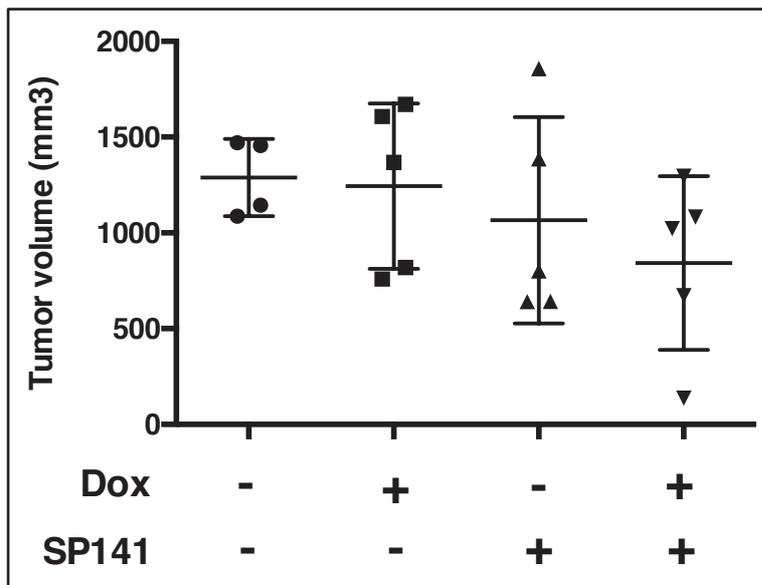


Figure 62 : Mesure de la croissance tumorale d'un modèle de PDX de LPS, traité avec le SP141 et/ou la doxorubicine. Cette expérience préliminaire demande à être répétée en vue d'une interprétation statistique.

Nous souhaiterions à présent effectuer le même type d'expérience avec d'autres chimiothérapies visant, par exemple, le métabolisme du 1C, et ainsi évaluer l'intérêt clinique potentiel d'une association du SP141 à des thérapies existantes.

c) Des régimes alimentaires en association à la thérapie ciblée :

L'impact de notre alimentation sur notre santé n'est plus à prouver. Les relations directes que celle-ci peut avoir sur le développement du cancer restent cependant plus subtiles. Si cibler des voies métaboliques pour traiter le cancer est une stratégie déjà employée, on peut légitimement envisager de jouer, via l'alimentation, sur la disponibilité de certains nutriments nécessaires à la prolifération tumorale.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai montré que le métabolisme de la sérine/glycine était essentiel pour le développement des LPS. Pour ce faire, j'ai été amené à tester l'impact d'une déprivation en sérine et glycine sur la croissance tumorale *in vivo* et constaté qu'un tel régime alimentaire impactait le développement des LPS chez la souris nue (**Figure 63**).

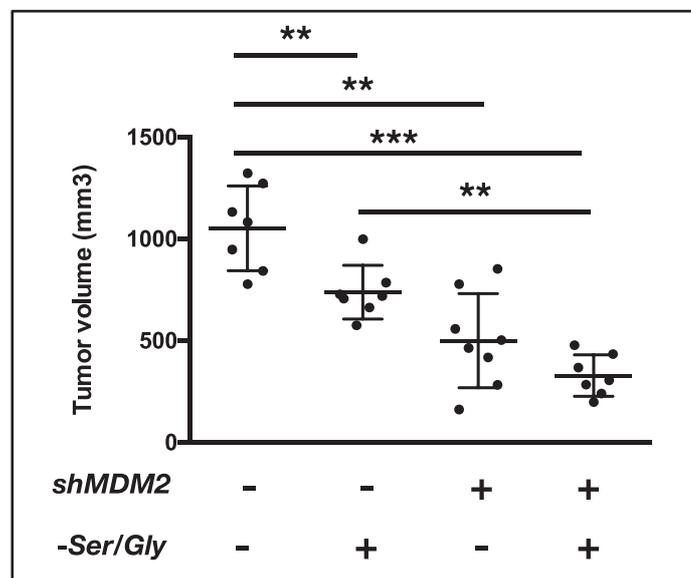


Figure 63 : Des souris nues ont été greffées avec une lignée cellulaire de liposarcome exprimant de façon stable un vecteur contrôle ou un shRNA dirigé contre MDM2. Les souris ont par la suite été séparées en deux groupes, l'un nourrit avec un régime normal et l'autre avec une alimentation dépourvu de sérine et de glycine.

Ces dernières années, les travaux de Karen Vousden et Oliver Maddocks ont montré que des régimes pauvres en sérine/glycine pouvaient réduire la croissance tumorale *in vivo* mais également moduler et améliorer les effets thérapeutiques d'agents anticancéreux, comme la phenformine qui inhibe la respiration mitochondriale [450]. Ces travaux ont été menés dans des modèles de souris génétiquement modifiés de cancers intestinaux ou de lymphomes, plus pertinents que les modèles de xénogreffes d'un point de vue clinique. Ainsi, des composés, tels que la phenformine ou la metformine qui inhibe la réponse antioxydante, ont vu leurs effets anti-tumoraux amplifiés par des régimes dépourvus de sérine/glycine (**Figure 64**).

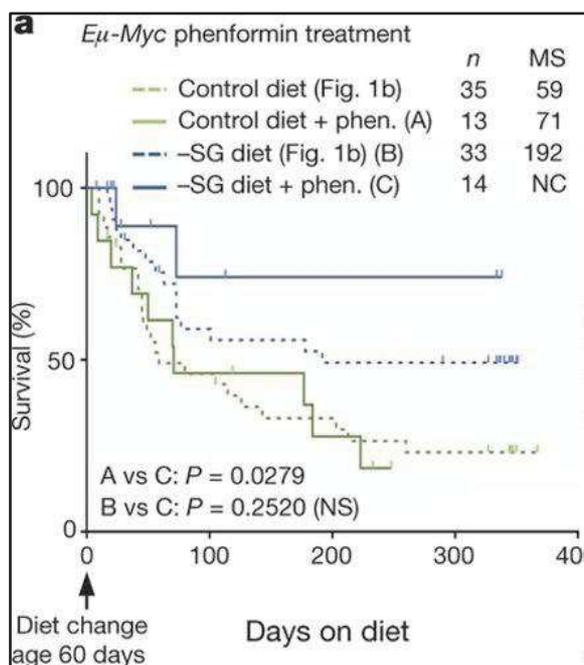


Figure 64 : La survie des souris *Eμ-Myc* (un modèle génétiquement modifié développant spontanément des lymphomes) est augmentée par l'association d'un régime sans sérine/glycine et un traitement à la phenformin. (Adapté de Maddocks et al (2017) [450]).

Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, il est tout de même important de rappeler que l'utilisation de ces composés suivant leurs doses peut également avoir des effets antioxydants [451][452] et ravive le débat quant à l'emploi de molécules pro- ou anti-oxydantes pour le traitement du cancer.

Dans leurs travaux, Vousden et Maddocks ont également montré que les cellules cancéreuses pouvaient s'adapter à la privation de sérine/glycine en activant la SSP, en diminuant la glycolyse aérobie et en augmentant le flux du cycle de l'acide tricarboxylique. Cette reprogrammation du métabolisme favorise l'adaptation au stress oxydatif et permet aux cellules de survivre dans ces conditions défavorables. Ils ont par ailleurs observé que la réponse à une carence de sérine était régulée par p53 et, par conséquent, que les cellules p53 - / - étaient nettement plus sensibles à l'épuisement de la sérine/glycine [48].

Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'utilisation de régimes pauvres en sérine/glycine associés à des chimiothérapies classiques qui visent, par exemple, le métabolisme du 1C, serait un outil complémentaire potentiel pour le traitement de certaines tumeurs.

La sérine n'est pas le seul acide aminé étudié pour l'élaboration de régimes spéciaux en vue de potentialiser l'effet de traitement anticancéreux. Il a été aussi décrit que la disponibilité de l'histidine et de l'asparagine pouvait influencer la réponse au méthotrexate et la progression des métastases du cancer du sein [453][454]. De plus, une étude du groupe de Jason Locasale, publiée cette année, a montré qu'un régime dépourvu de méthionine avait des effets bénéfiques sur la prolifération tumorale chez la souris et que ce type de régime pouvait également être transposé chez l'Homme en vue d'une utilisation en clinique [455]. Une restriction en

méthionine, un acide aminé essentiel au métabolisme du 1C, rappelons-le, entraîne une diminution de la croissance tumorale dans deux modèles de PDX colorectaux (CRC119 et CRC140) résistants à la chimiothérapie, ainsi que dans un modèle murin de sarcome des tissus mous résistant aux radiations [456] (**Figure 65**).

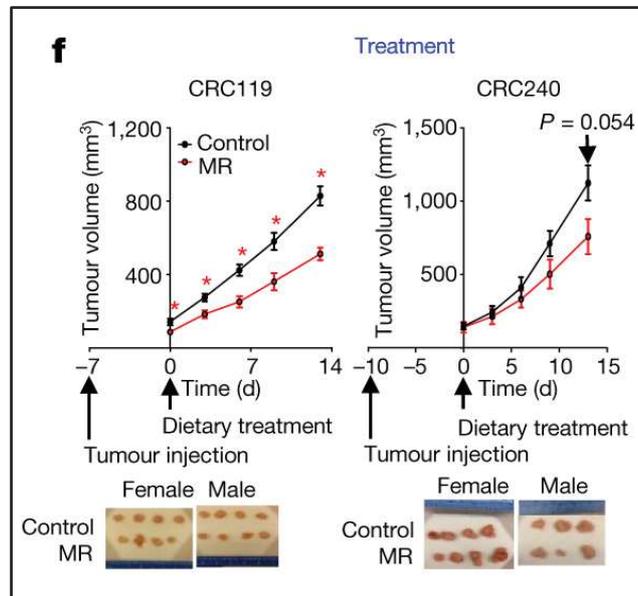


Figure 65 : Mesure de la croissance tumorale de deux modèles de PDX de cancer colorectaux suite à un régime dépourvu de méthionine (Adapté de Gao et al (2019) [455]).

Par la suite, ils ont observé que le régime pauvre en méthionine augmentait de façon synergique les effets du 5-FU (chimiothérapie ciblant le métabolisme du 1C) sur la croissance tumorale mais perturbait également le métabolisme des nucléotides et la balance redox.

Enfin, comme preuve de concept en vue d'une utilisation clinique, le groupe de Locasale a placé, pendant 3 semaines, 6 individus sains d'âge moyen (5 femmes et 1 homme) sous régime pauvre en méthionine. Les analyses sanguines de ces cobayes se sont trouvées être hautement corrélées aux données obtenues chez la souris, à savoir que ce régime entraînait une baisse de la méthionine circulante mais aussi des métabolites liés à ses voies métaboliques, tels que le NAC le glutathion et les nucléotides. Il est intéressant de noter que cette étude clinique a été réalisée avec un régime alimentaire dans lequel l'apport journalier en méthionine a été réduit de 83 %, ce qui correspond à des niveaux parfaitement tolérables par l'Homme et parfois retrouvés dans certains régimes méditerranéens ou végétariens.

L'ensemble de ces travaux ouvre la voie à l'utilisation de régimes alimentaires comme compléments thérapeutiques contre le cancer.

On peut aisément imaginer que dans le cas du liposarcome, un régime alimentaire pauvre en sérine/glycine accentuerait les effets d'un traitement ciblant la synthèse *de novo* de sérine directement ou indirectement via MDM2.

Ainsi, l'étude des fonctions métaboliques de MDM2 dans le développement du liposarcome, nous a permis d'entrouvrir la porte à un large panel de potentielles nouvelles thérapies pour ce type de cancer. Néanmoins, la perspective de cibler les fonctions métaboliques de MDM2 ou directement le métabolisme de la sérine ne doit pas être limitée simplement aux LPS.

Parmi les lignées cellulaires criblées pour l'étude de la localisation subcellulaire de MDM2, certaines, comme les MDA-MB468 (cancer du sein), les A549 (cancer du poumon) ou encore les 786.0 (cancer rénal), présentent des niveaux non négligeables du pool de MDM2 associé à la chromatine. Il n'est pas exclu de penser que l'utilisation de dégradeurs de MDM2, ciblant ses fonctions indépendantes de P53, pourrait avoir des bénéfices thérapeutiques pour des cancers variés et notamment ceux arborant une amplification de MDM2 et une protéine p53 non mutée.

Dans ces travaux, nous avons mis en avant la dépendance des LPS vis à vis du métabolisme de la sérine. Toutefois, cette caractéristique observée chez les LPS, fait partie d'un processus largement décrit, entre autre par Hanahan et Weinberg, chez les cellules tumorales, qui consiste en une altération du métabolisme cellulaire pour assurer leur croissance et leur survie. L'étude des voies métaboliques dérégulées par les cellules cancéreuses et les rendant parfois dépendantes de la disponibilité de nutriments essentiels, est un domaine de recherche passionnant, représentant de surcroît un axe prometteur dans la lutte contre le cancer.

Bibliographie

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [2] P. Som *et al.*, "A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection," *J. Nucl. Med.*, vol. 21, no. 7, pp. 670–675, Jul. 1980.
- [3] A. Almuhaideb, N. Papathanasiou, and J. Bomanji, "18F-FDG PET/CT imaging in oncology," *Ann Saudi Med*, vol. 31, no. 1, pp. 3–13, Feb. 2011.
- [4] T. Yamamoto *et al.*, "Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 170, no. 1, pp. 223–230, Jul. 1990.
- [5] H. Ying *et al.*, "Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism," *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 656–670, Apr. 2012.
- [6] H. Cerwenka *et al.*, "TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions," *Anticancer Res.*, vol. 19, no. 1B, pp. 849–851, Feb. 1999.
- [7] A. Kumar *et al.*, "Fat cell-specific ablation of rictor in mice impairs insulin-regulated fat cell and whole-body glucose and lipid metabolism," *Diabetes*, vol. 59, no. 6, pp. 1397–1406, Jun. 2010.
- [8] H. R. Christofk *et al.*, "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth," *Nature*, vol. 452, no. 7184, pp. 230–233, Mar. 2008.
- [9] Y. Lu *et al.*, "Common Human Cancer Genes Discovered by Integrated Gene-Expression Analysis," *PLoS One*, vol. 2, no. 11, Nov. 2007.
- [10] B. Altenberg and K. O. Greulich, "Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes," *Genomics*, vol. 84, no. 6, pp. 1014–1020, Dec. 2004.
- [11] C. Gu *et al.*, "KO of 5-InsP7 kinase activity transforms the HCT116 colon cancer cell line into a hypermetabolic, growth-inhibited phenotype," *PNAS*, vol. 114, no. 45, pp. 11968–11973, Nov. 2017.
- [12] C. T. Hensley, A. T. Wasti, and R. J. DeBerardinis, "Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 9, pp. 3678–3684, Sep. 2013.
- [13] S. M. Davidson *et al.*, "Environment impacts the metabolic dependencies of Ras-driven non-small cell lung cancer," *Cell Metab*, vol. 23, no. 3, pp. 517–528, Mar. 2016.
- [14] A. Muir, L. V. Danai, D. Y. Gui, C. Y. Waingarten, C. A. Lewis, and M. G. Vander Heiden, "Environmental cystine drives glutamine anaplerosis and sensitizes cancer cells to glutaminase inhibition," *Elife*, vol. 6, 15 2017.
- [15] X. Tong, F. Zhao, and C. B. Thompson, "The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 19, no. 1, pp. 32–37, Feb. 2009.
- [16] W. N. Tian *et al.*, "Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 17, pp. 10609–10617, Apr. 1998.
- [17] L. G. Boros, J. S. Torday, S. Lim, S. Bassilian, M. Cascante, and W. N. Lee, "Transforming growth factor beta2 promotes glucose carbon incorporation into

- nucleic acid ribose through the nonoxidative pentose cycle in lung epithelial carcinoma cells," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 5, pp. 1183–1185, Mar. 2000.
- [18] S. Langbein *et al.*, "Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted," *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 4, pp. 578–585, Feb. 2006.
- [19] J. F. Coy, D. Dressler, J. Wilde, and P. Schubert, "Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer," *Clin. Lab.*, vol. 51, no. 5–6, pp. 257–273, 2005.
- [20] R. J. DeBerardinis, "Serine metabolism: some tumors take the road less traveled," *Cell Metab.*, vol. 14, no. 3, pp. 285–286, Sep. 2011.
- [21] "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1937," *NobelPrize.org*. [Online]. Available: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1937/summary/>. [Accessed: 15-Jul-2019].
- [22] G. Hatzivassiliou *et al.*, "ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 4, pp. 311–321, Oct. 2005.
- [23] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation," *Cell Metab.*, vol. 7, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2008.
- [24] M. Lacroix *et al.*, "E4F1 controls a transcriptional program essential for pyruvate dehydrogenase activity," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 113, no. 39, pp. 10998–11003, 27 2016.
- [25] P. Goguet-Rubio *et al.*, "E4F1-mediated control of pyruvate dehydrogenase activity is essential for skin homeostasis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 113, no. 39, pp. 11004–11009, 27 2016.
- [26] M. Griffiths and D. Keast, "The effect of glutamine on murine splenic leukocyte responses to T and B cell mitogens," *Immunol Cell Biol*, vol. 68 (Pt 6), pp. 405–408, Dec. 1990.
- [27] G. Arena *et al.*, "Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53," *Mol. Cell*, vol. 69, no. 4, pp. 594-609.e8, 15 2018.
- [28] "Oxidative phosphorylation," *Khan Academy*. [Online]. Available: <https://www.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/oxidative-phosphorylation/a/oxidative-phosphorylation-etc>. [Accessed: 15-Jul-2019].
- [29] A. Vazquez, J. Liu, Y. Zhou, and Z. N. Oltvai, "Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited," *BMC Syst Biol*, vol. 4, p. 58, May 2010.
- [30] S. C. Kalhan and R. W. Hanson, "Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 24, pp. 19786–19791, Jun. 2012.
- [31] K. R. Mattaini, M. R. Sullivan, and M. G. Vander Heiden, "The importance of serine metabolism in cancer," *J. Cell Biol.*, vol. 214, no. 3, pp. 249–257, 01 2016.
- [32] A. W. El-Hattab, "Serine biosynthesis and transport defects," *Mol. Genet. Metab.*, vol. 118, no. 3, pp. 153–159, 2016.
- [33] K. Snell and G. Weber, "Enzymic imbalance in serine metabolism in rat hepatomas," *Biochem J*, vol. 233, no. 2, pp. 617–620, Jan. 1986.
- [34] O. D. K. Maddocks *et al.*, "Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells," *Nature*, vol. 493, no. 7433, pp. 542–546, Jan. 2013.

- [35] R. Beroukhi *et al.*, “The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers,” *Nature*, vol. 463, no. 7283, pp. 899–905, Feb. 2010.
- [36] J. W. Locasale *et al.*, “Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis,” *Nature genetics*, vol. 43, no. 9, pp. 869–874, Sep. 2011.
- [37] R. Possemato *et al.*, “Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer,” *Nature*, vol. 476, no. 7360, pp. 346–350, Aug. 2011.
- [38] G. M. DeNicola *et al.*, “NRF2 regulates serine biosynthesis in non-small cell lung cancer,” *Nat. Genet.*, vol. 47, no. 12, pp. 1475–1481, Dec. 2015.
- [39] L. Sun *et al.*, “cMyc-mediated activation of serine biosynthesis pathway is critical for cancer progression under nutrient deprivation conditions,” *Cell Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 429–444, Apr. 2015.
- [40] S. Mazurek, “Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 7, pp. 969–980, Jul. 2011.
- [41] J. Ye *et al.*, “Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, no. 18, pp. 6904–6909, May 2012.
- [42] B. Chaneton *et al.*, “Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2,” *Nature*, vol. 491, no. 7424, pp. 458–462, Nov. 2012.
- [43] M. Yang and K. H. Vousden, “Serine and one-carbon metabolism in cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 10, pp. 650–662, Oct. 2016.
- [44] J. Ding *et al.*, “The histone H3 methyltransferase G9A epigenetically activates the serine-glycine synthesis pathway to sustain cancer cell survival and proliferation,” *Cell Metab.*, vol. 18, no. 6, pp. 896–907, Dec. 2013.
- [45] D. Samanta, Y. Park, S. A. Andrabi, L. M. Shelton, D. M. Gilkes, and G. L. Semenza, “PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis,” *Cancer Res.*, vol. 76, no. 15, pp. 4430–4442, 01 2016.
- [46] L. Ma *et al.*, “Control of nutrient stress-induced metabolic reprogramming by PKC ζ in tumorigenesis,” *Cell*, vol. 152, no. 3, pp. 599–611, Jan. 2013.
- [47] Y. Ou, S.-J. Wang, L. Jiang, B. Zheng, and W. Gu, “p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 457–466, Jan. 2015.
- [48] O. D. K. Maddocks *et al.*, “Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells,” *Nature*, vol. 493, pp. 542–546, Jan. 2013.
- [49] S. Y. Lunt and M. G. Vander Heiden, “Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, pp. 441–464, 2011.
- [50] S. Ravez, Q. Spillier, R. Marteau, O. Feron, and R. Frédérick, “Challenges and Opportunities in the Development of Serine Synthetic Pathway Inhibitors for Cancer Therapy,” *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 1227–1237, Feb. 2017.
- [51] J. Luo, “Cancer’s sweet tooth for serine,” *Breast Cancer Res.*, vol. 13, no. 6, p. 317, 2011.
- [52] S. Ravez, Q. Spillier, R. Marteau, O. Feron, and R. Frédérick, “Challenges and Opportunities in the Development of Serine Synthetic Pathway Inhibitors for Cancer Therapy,” *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 4, pp. 1227–1237, 23 2017.

- [53] M. Inuzuka, M. Hayakawa, and T. Ingi, "Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 42, pp. 35776–35783, Oct. 2005.
- [54] N. Damseh *et al.*, "Mutations in SLC1A4, encoding the brain serine transporter, are associated with developmental delay, microcephaly and hypomyelination," *J Med Genet*, vol. 52, no. 8, pp. 541–547, Aug. 2015.
- [55] G. Heimer *et al.*, "SLC1A4 mutations cause a novel disorder of intellectual disability, progressive microcephaly, spasticity and thin corpus callosum," *Clin. Genet.*, vol. 88, no. 4, pp. 327–335, Oct. 2015.
- [56] M. Srour *et al.*, "A homozygous mutation in SLC1A4 in siblings with severe intellectual disability and microcephaly," *Clinical Genetics*, vol. 88, no. 1, pp. E1–E4, 2015.
- [57] C. F. Labuschagne, N. J. F. van den Broek, G. M. Mackay, K. H. Vousden, and O. D. K. Maddocks, "Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells," *Cell Rep*, vol. 7, no. 4, pp. 1248–1258, May 2014.
- [58] M. Jain *et al.*, "Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation," *Science*, vol. 336, no. 6084, pp. 1040–1044, May 2012.
- [59] O. D. K. Maddocks, C. F. Labuschagne, P. D. Adams, and K. H. Vousden, "Serine Metabolism Supports the Methionine Cycle and DNA/RNA Methylation through De Novo ATP Synthesis in Cancer Cells," *Mol. Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 210–221, Jan. 2016.
- [60] J. W. Locasale, "Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 8, pp. 572–583, Aug. 2013.
- [61] T. A. Garrow *et al.*, "Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 16, pp. 11910–11916, Jun. 1993.
- [62] R. Teperino, K. Schoonjans, and J. Auwerx, "Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription?," *Cell Metab.*, vol. 12, no. 4, pp. 321–327, Oct. 2010.
- [63] Y. Yang and M. T. Bedford, "Protein arginine methyltransferases and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 1, pp. 37–50, Jan. 2013.
- [64] P. B. Rowe and G. P. Lewis, "Mammalian folate metabolism. Regulation of folate interconversion enzymes," *Biochemistry*, vol. 12, no. 10, pp. 1862–1869, May 1973.
- [65] B. D. Bennett, J. Yuan, E. H. Kimball, and J. D. Rabinowitz, "Absolute quantitation of intracellular metabolite concentrations by an isotope ratio-based approach," *Nat Protoc*, vol. 3, no. 8, pp. 1299–1311, 2008.
- [66] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation," *Science*, vol. 324, no. 5930, pp. 1029–1033, May 2009.
- [67] B. D. Paul and S. H. Snyder, "H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 8, pp. 499–507, Jul. 2012.
- [68] C. E. Cross *et al.*, "Oxygen radicals and human disease," *Ann. Intern. Med.*, vol. 107, no. 4, pp. 526–545, Oct. 1987.
- [69] T. Finkel, "Signal transduction by reactive oxygen species," *J. Cell Biol.*, vol. 194, no. 1, pp. 7–15, Jul. 2011.
- [70] Z. A. Wood, L. B. Poole, and P. A. Karplus, "Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling," *Science*, vol. 300, no. 5619, pp. 650–653, Apr. 2003.

- [71] P. J. Kiley and G. Storz, "Exploiting thiol modifications," *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 11, p. e400, Nov. 2004.
- [72] A.-B. Al-Mehdi *et al.*, "Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription," *Sci Signal*, vol. 5, no. 231, p. ra47, Jul. 2012.
- [73] Y. Liu, H. Zhao, H. Li, B. Kalyanaraman, A. C. Nicolosi, and D. D. Gutterman, "Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries," *Circ. Res.*, vol. 93, no. 6, pp. 573–580, Sep. 2003.
- [74] A. P. West, G. S. Shadel, and S. Ghosh, "Mitochondria in innate immune responses," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 6, pp. 389–402, Jun. 2011.
- [75] M. M. Kamiński, D. Röth, P. H. Krammer, and K. Gülow, "Mitochondria as Oxidative Signaling Organelles in T-cell Activation: Physiological Role and Pathological Implications," *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, vol. 61, no. 5, pp. 367–384, Oct. 2013.
- [76] R. Rajendran, R. Garva, M. Krstic-Demonacos, and C. Demonacos, "Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, p. 368276, 2011.
- [77] M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy, and A. B. Malik, "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, no. 7, pp. 1126–1167, Mar. 2014.
- [78] B. Halliwell, "Biochemistry of oxidative stress," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 5, pp. 1147–1150, Nov. 2007.
- [79] D. Harman, "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry," *J Gerontol*, vol. 11, no. 3, pp. 298–300, Jul. 1956.
- [80] R. S. Balaban, S. Nemoto, and T. Finkel, "Mitochondria, oxidants, and aging," *Cell*, vol. 120, no. 4, pp. 483–495, Feb. 2005.
- [81] J. M. Van Raamsdonk and S. Hekimi, "Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship?," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 12, pp. 1911–1953, Dec. 2010.
- [82] M. Ristow and S. Schmeisser, "Extending life span by increasing oxidative stress," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 2, pp. 327–336, Jul. 2011.
- [83] M. Sundaresan, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Irani, and T. Finkel, "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction," *Science*, vol. 270, no. 5234, pp. 296–299, Oct. 1995.
- [84] K. M. Connor *et al.*, "Mitochondrial H₂O₂ regulates the angiogenic phenotype via PTEN oxidation," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 17, pp. 16916–16924, Apr. 2005.
- [85] R. D. Guzy and P. T. Schumacker, "Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia," *Exp. Physiol.*, vol. 91, no. 5, pp. 807–819, Sep. 2006.
- [86] J. Ye *et al.*, "Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia," *Cancer Discov*, vol. 4, no. 12, pp. 1406–1417, Dec. 2014.
- [87] I. Martínez-Reyes and N. S. Chandel, "Mitochondrial one-carbon metabolism maintains redox balance during hypoxia," *Cancer Discov*, vol. 4, no. 12, pp. 1371–1373, Dec. 2014.
- [88] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, Mar. 2006.

- [89] N. Singh, A. K. Dhalla, C. Seneviratne, and P. K. Singal, "Oxidative stress and heart failure," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 147, no. 1–2, pp. 77–81, Jun. 1995.
- [90] A. Ramond *et al.*, "Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia," *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 27, no. 3, pp. 252–261, Jun. 2013.
- [91] M. Bošković, T. Vovk, B. Kores Plesničar, and I. Grabnar, "Oxidative stress in schizophrenia," *Curr Neuropharmacol*, vol. 9, no. 2, pp. 301–312, Jun. 2011.
- [92] O. M. Dean, M. van den Buuse, M. Berk, D. L. Copolov, C. Mavros, and A. I. Bush, "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.*, vol. 499, no. 3, pp. 149–153, Jul. 2011.
- [93] Y. de Diego-Otero *et al.*, "Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency," *Neuropsychopharmacology*, vol. 34, no. 4, pp. 1011–1026, Mar. 2009.
- [94] J. Amer, H. Ghoti, E. Rachmilewitz, A. Koren, C. Levin, and E. Fibach, "Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants," *Br. J. Haematol.*, vol. 132, no. 1, pp. 108–113, Jan. 2006.
- [95] D. G. Aly and R. S. Shahin, "Oxidative stress in lichen planus," *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, vol. 19, no. 1, pp. 3–11, 2010.
- [96] O. Arican and E. B. Kurutas, "Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo," *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, vol. 17, no. 1, pp. 12–16, Mar. 2008.
- [97] S. J. James *et al.*, "Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 6, pp. 1611–1617, Dec. 2004.
- [98] M. Pangare and A. Makino, "Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes," *J Smooth Muscle Res*, vol. 48, no. 1, pp. 1–26, 2012.
- [99] G. Kennedy, V. A. Spence, M. McLaren, A. Hill, C. Underwood, and J. J. F. Belch, "Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 39, no. 5, pp. 584–589, Sep. 2005.
- [100] H. J. Forman, H. Zhang, and A. Rinna, "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis," *Mol. Aspects Med.*, vol. 30, no. 1–2, pp. 1–12, Apr. 2009.
- [101] C. Hwang, A. J. Sinskey, and H. F. Lodish, "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum," *Science*, vol. 257, no. 5076, pp. 1496–1502, Sep. 1992.
- [102] P. Rauhala, T. Andoh, and C. C. Chiueh, "Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 207, no. 2 Suppl, pp. 91–95, Sep. 2005.
- [103] S. C. Lu, "Glutathione synthesis," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 5, pp. 3143–3153, May 2013.
- [104] T. Simpson, M. Pase, and C. Stough, "Bacopa monnieri as an Antioxidant Therapy to Reduce Oxidative Stress in the Aging Brain," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/615384/>. [Accessed: 15-Jul-2019].

- [105] S. C. Lu and J. M. Mato, "S-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer," *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 4, pp. 1515–1542, Oct. 2012.
- [106] W. Zhang, A. Braun, Z. Bauman, H. Olteanu, P. Madzelan, and R. Banerjee, "Expression profiling of homocysteine junction enzymes in the NCI60 panel of human cancer cell lines," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 4, pp. 1554–1560, Feb. 2005.
- [107] D. Daye and K. E. Wellen, "Metabolic reprogramming in cancer: unraveling the role of glutamine in tumorigenesis," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 362–369, Jun. 2012.
- [108] J. M. McCord and I. Fridovich, "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)," *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, Nov. 1969.
- [109] R. Pamplona and G. Barja, "An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms," *Biogerontology*, vol. 12, no. 5, pp. 409–435, Oct. 2011.
- [110] D. S. Frear and H. R. Swanson, "Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazino) glutathione: Partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn," *Phytochemistry*, vol. 9, no. 10, pp. 2123–2132, Oct. 1970.
- [111] R. A. Cairns, I. S. Harris, and T. W. Mak, "Regulation of cancer cell metabolism," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 2, pp. 85–95, Feb. 2011.
- [112] T. P. Szatrowski and C. F. Nathan, "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells," *Cancer Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 794–798, Feb. 1991.
- [113] B. N. Ames, M. K. Shigenaga, and T. M. Hagen, "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, no. 17, pp. 7915–7922, Sep. 1993.
- [114] M. Schieber and N. S. Chandel, "ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress," *Curr Biol*, vol. 24, no. 10, pp. R453–R462, May 2014.
- [115] S. Coso *et al.*, "NADPH oxidases as regulators of tumor angiogenesis: current and emerging concepts," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 11, pp. 1229–1247, Jun. 2012.
- [116] X. Shi, Y. Zhang, J. Zheng, and J. Pan, "Reactive oxygen species in cancer stem cells," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 11, pp. 1215–1228, Jun. 2012.
- [117] J.-S. Pan, M.-Z. Hong, and J.-L. Ren, "Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 15, no. 14, pp. 1702–1707, Apr. 2009.
- [118] S. C. Gupta, D. Hevia, S. Patchva, B. Park, W. Koh, and B. B. Aggarwal, "Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 16, no. 11, pp. 1295–1322, Jun. 2012.
- [119] M. R. Ramsey and N. E. Sharpless, "ROS as a tumour suppressor?," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1213–1215, Nov. 2006.
- [120] A. Takahashi *et al.*, "Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 11, pp. 1291–1297, Nov. 2006.
- [121] O. Shuvalov, A. Petukhov, A. Daks, O. Fedorova, E. Vasileva, and N. A. Barlev, "One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy," *Oncotarget*, vol. 8, no. 14, pp. 23955–23977, Apr. 2017.
- [122] A. J. Levine and M. Oren, "The first 30 years of p53: growing ever more complex," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 10, pp. 749–758, 2009.

- [123] P. May and E. May, "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein," *Oncogene*, vol. 18, no. 53, pp. 7621–7636, Dec. 1999.
- [124] O. Laptenko and C. Prives, "Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 6, pp. 951–961, Jun. 2006.
- [125] V. Leblanc and P. May, "Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN," *Med Sci (Paris)*, vol. 18, no. 5, pp. 577–584, May 2002.
- [126] M. A. Allen *et al.*, "Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms," *Elife*, vol. 3, p. e02200, May 2014.
- [127] S. Matoba *et al.*, "p53 regulates mitochondrial respiration," *Science*, vol. 312, no. 5780, pp. 1650–1653, Jun. 2006.
- [128] K. Bensaad *et al.*, "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis," *Cell*, vol. 126, no. 1, pp. 107–120, Jul. 2006.
- [129] Y. Ou, S.-J. Wang, L. Jiang, B. Zheng, and W. Gu, "p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 457–466, Jan. 2015.
- [130] D. Crighton *et al.*, "DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis," *Cell*, vol. 126, no. 1, pp. 121–134, Jul. 2006.
- [131] S. A. Gatz and L. Wiesmüller, "p53 in recombination and repair," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 6, pp. 1003–1016, Jun. 2006.
- [132] K. Bensaad and K. H. Vousden, "Savior and slayer: the two faces of p53," *Nat. Med.*, vol. 11, no. 12, pp. 1278–1279, Dec. 2005.
- [133] L. Roger, G. Gadea, and P. Roux, "Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53?," *Biol. Cell*, vol. 98, no. 3, pp. 141–152, Mar. 2006.
- [134] R. M. Kortlever, P. J. Higgins, and R. Bernardis, "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 877–884, Aug. 2006.
- [135] J. G. Teodoro, A. E. Parker, X. Zhu, and M. R. Green, "p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase," *Science*, vol. 313, no. 5789, pp. 968–971, Aug. 2006.
- [136] F. Murray-Zmijewski, D. P. Lane, and J.-C. Bourdon, "p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 6, pp. 962–972, Jun. 2006.
- [137] P. Forbes, "P53: The Gene That Cracked the Cancer Code by Sue Armstrong – review," *The Guardian*, 21-Nov-2014.
- [138] M. Lacroix, L. Linares, and L. Le Cam, [*Role of the p53 tumor suppressor in metabolism*], vol. 29. 2013.
- [139] E. O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating, and P. Huang, "Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 53, no. 3, pp. 209–219, Mar. 2004.
- [140] L. J. Marnett, "Oxyradicals and DNA damage," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 3, pp. 361–370, Mar. 2000.
- [141] D. Ravi, H. Muniyappa, and K. C. Das, "Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 48, pp. 40084–40096, Dec. 2005.
- [142] N. S. Chandel, M. G. Vander Heiden, C. B. Thompson, and P. T. Schumacker, "Redox regulation of p53 during hypoxia," *Oncogene*, vol. 19, no. 34, pp. 3840–3848, Aug. 2000.

- [143] Mohd. A. Yusuf, T. Chuang, G. J. Bhat, and K. S. Srivenugopal, "Cys-141 glutathionylation of human p53: Studies using specific polyclonal antibodies in cancer samples and cell lines," *Free Radic Biol Med*, vol. 49, no. 5, pp. 908–917, Sep. 2010.
- [144] B. Liu, Y. Chen, and D. K. St Clair, "ROS and p53: a versatile partnership," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 8, pp. 1529–1535, Apr. 2008.
- [145] K. Polyak, Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "A model for p53-induced apoptosis," *Nature*, vol. 389, no. 6648, pp. 300–305, Sep. 1997.
- [146] S. Macip, M. Igarashi, P. Berggren, J. Yu, S. W. Lee, and S. A. Aaronson, "Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions," *Mol. Cell Biol.*, vol. 23, no. 23, pp. 8576–8585, Dec. 2003.
- [147] A. V. Budanov, A. A. Sablina, E. Feinstein, E. V. Koonin, and P. M. Chumakov, "Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD," *Science*, vol. 304, no. 5670, pp. 596–600, Apr. 2004.
- [148] S. Pikkariainen *et al.*, "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.*, vol. 284, no. 40, pp. 27195–27210, Oct. 2009.
- [149] M. Malmlöf, E. Roudier, J. Högberg, and U. Stenius, "MEK-ERK-mediated phosphorylation of Mdm2 at Ser-166 in hepatocytes. Mdm2 is activated in response to inhibited Akt signaling," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 4, pp. 2288–2296, Jan. 2007.
- [150] A. B. Brenkman, P. L. J. de Keizer, N. J. F. van den Broek, A. G. Jochemsen, and B. M. T. Burgering, "Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4," *PLoS ONE*, vol. 3, no. 7, p. e2819, Jul. 2008.
- [151] J.-P. Kruse and W. Gu, "Modes of p53 regulation," *Cell*, vol. 137, no. 4, pp. 609–622, May 2009.
- [152] J. Momand, G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, and A. J. Levine, "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation," *Cell*, vol. 69, no. 7, pp. 1237–1245, Jun. 1992.
- [153] J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53," *Nature*, vol. 362, no. 6423, pp. 857–860, Apr. 1993.
- [154] M. H. Kubbutat, S. N. Jones, and K. H. Vousden, "Regulation of p53 stability by Mdm2," *Nature*, vol. 387, no. 6630, pp. 299–303, May 1997.
- [155] M. J. Riemenschneider *et al.*, "Amplification and overexpression of the MDM4 (MDMX) gene from 1q32 in a subset of malignant gliomas without TP53 mutation or MDM2 amplification," *Cancer Res.*, vol. 59, no. 24, pp. 6091–6096, Dec. 1999.
- [156] L. Cahilly-Snyder, T. Yang-Feng, U. Francke, and D. L. George, "Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line," *Somat. Cell Mol. Genet.*, vol. 13, no. 3, pp. 235–244, May 1987.
- [157] C. Capoulade and J. Wiels, "MDM2 s'émancipe de la p53.," *MDM2 liberates from p53*, 1999.
- [158] F. Toledo and G. M. Wahl, "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 12, pp. 909–923, Dec. 2006.
- [159] F. Bartel, H. Taubert, and L. C. Harris, "Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 9–15, Jul. 2002.

- [160] F. Schwartzberg-Bar-Yoseph, M. Armoni, and E. Karnieli, "The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 7, pp. 2627–2633, Apr. 2004.
- [161] K. Kawachi, K. Araki, K. Tobiume, and N. Tanaka, "p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 611–618, May 2008.
- [162] H. Kondoh *et al.*, "Glycolytic enzymes can modulate cellular life span," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 1, pp. 177–185, Jan. 2005.
- [163] P. Jiang *et al.*, "p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase," *Nat. Cell Biol.*, vol. 13, no. 3, pp. 310–316, Mar. 2011.
- [164] Y. Ou, S.-J. Wang, L. Jiang, B. Zheng, and W. Gu, "p53 Protein-mediated regulation of phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) is crucial for the apoptotic response upon serine starvation," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 457–466, Jan. 2015.
- [165] T. Iwakuma and G. Lozano, "MDM2, an introduction," *Mol. Cancer Res.*, vol. 1, no. 14, pp. 993–1000, Dec. 2003.
- [166] S. C. Evans, M. Viswanathan, J. D. Grier, M. Narayana, A. K. El-Naggar, and G. Lozano, "An alternatively spliced HDM2 product increases p53 activity by inhibiting HDM2," *Oncogene*, vol. 20, no. 30, pp. 4041–4049, Jul. 2001.
- [167] K. Schuster and L. C. Harris, "Selection for mutations in the cDNAs of transgenic mice upon expression of an embryonic lethal protein," *Transgenic Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 527–530, Aug. 2007.
- [168] T. Zheng *et al.*, "Spliced MDM2 isoforms promote mutant p53 accumulation and gain-of-function in tumorigenesis," *Nat Commun*, vol. 4, p. 2996, 2013.
- [169] F. Bartel, H. Taubert, and L. C. Harris, "Alternative and aberrant splicing of MDM2 mRNA in human cancer," *Cancer Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 9–15, Jul. 2002.
- [170] D. A. Freedman and A. J. Levine, "Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 12, pp. 7288–7293, Dec. 1998.
- [171] J. Roth, M. Dobbstein, D. A. Freedman, T. Shenk, and A. J. Levine, "Nucleocytoplasmic 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.*, vol. 17, no. 2, pp. 554–564, Jan. 1998.
- [172] M. A. Lohrum, M. Ashcroft, M. H. Kubbutat, and K. H. Vousden, "Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2," *Nat. Cell Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 179–181, Mar. 2000.
- [173] M.-S. Dai, S. X. Zeng, Y. Jin, X.-X. Sun, L. David, and H. Lu, "Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition," *Mol Cell Biol*, vol. 24, no. 17, pp. 7654–7668, Sep. 2004.
- [174] M. Argentini, N. Barboule, and B. Wasylyk, "The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability," *Oncogene*, vol. 20, no. 11, pp. 1267–1275, Mar. 2001.
- [175] Q. Zhu, J. Yao, G. Wani, M. A. Wani, and A. A. Wani, "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.*, vol. 276, no. 32, pp. 29695–29701, Aug. 2001.

- [176] Y. Zhang, Y. Xiong, and W. G. Yarbrough, "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways," *Cell*, vol. 92, no. 6, pp. 725–734, Mar. 1998.
- [177] B. Cross, L. Chen, Q. Cheng, B. Li, Z.-M. Yuan, and J. Chen, "Inhibition of p53 DNA binding function by the MDM2 protein acidic domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 18, pp. 16018–16029, May 2011.
- [178] Q. Cheng, T. Song, L. Chen, and J. Chen, "Autoactivation of the MDM2 E3 ligase by intramolecular interaction," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 34, no. 15, pp. 2800–2810, Aug. 2014.
- [179] Q. Cheng, T. Song, L. Chen, and J. Chen, "Autoactivation of the MDM2 E3 Ligase by Intramolecular Interaction," *Mol Cell Biol*, vol. 34, no. 15, pp. 2800–2810, Aug. 2014.
- [180] L. Chen, C. Li, Y. Pan, and J. Chen, "Regulation of p53-MDMX interaction by casein kinase 1 alpha," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 15, pp. 6509–6520, Aug. 2005.
- [181] C. Challen, J. J. Anderson, Z. M. A. Chrzanowska-Lightowlers, R. N. Lightowlers, and J. Lunec, "Recombinant human MDM2 oncoprotein shows sequence composition selectivity for binding to both RNA and DNA," *Int. J. Oncol.*, vol. 40, no. 3, pp. 851–859, Mar. 2012.
- [182] D. A. Sharp, S. A. Kratowicz, M. J. Sank, and D. L. George, "Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 53, pp. 38189–38196, Dec. 1999.
- [183] S. Tanimura, S. Ohtsuka, K. Mitsui, K. Shirouzu, A. Yoshimura, and M. Ohtsubo, "MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains," *FEBS Lett.*, vol. 447, no. 1, pp. 5–9, Mar. 1999.
- [184] B. Elenbaas, M. Dobbstein, J. Roth, T. Shenk, and A. J. Levine, "The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain," *Mol. Med.*, vol. 2, no. 4, pp. 439–451, Jul. 1996.
- [185] L. K. Linares and M. Scheffner, "The ubiquitin-protein ligase activity of Hdm2 is inhibited by nucleic acids," *FEBS Lett.*, vol. 554, no. 1–2, pp. 73–76, Nov. 2003.
- [186] J. Chen, V. Marechal, and A. J. Levine, "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 13, no. 7, pp. 4107–4114, Jul. 1993.
- [187] "p73_p63." [Online]. Available: http://p53.free.fr/p53_info/mdm_family.html. [Accessed: 10-Jul-2019].
- [188] P. K. Jackson *et al.*, "The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases," *Trends Cell Biol.*, vol. 10, no. 10, pp. 429–439, Oct. 2000.
- [189] C. M. Pickart and M. J. Eddins, "Ubiquitin: structures, functions, mechanisms," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1695, no. 1, pp. 55–72, Nov. 2004.
- [190] J. C. Lee and M. E. Peter, "Regulation of apoptosis by ubiquitination," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 39–47, Jun. 2003.
- [191] Y. Yang and X. Yu, "Regulation of apoptosis: the ubiquitous way," *FASEB J.*, vol. 17, no. 8, pp. 790–799, May 2003.
- [192] O. Coux, K. Tanaka, and A. L. Goldberg, "Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 65, pp. 801–847, 1996.
- [193] S. M. Mendrysa and M. E. Perry, "The p53 tumor suppressor protein does not regulate expression of its own inhibitor, MDM2, except under conditions of stress," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 6, pp. 2023–2030, Mar. 2000.

- [194] A. Slack *et al.*, "The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 102, no. 3, pp. 731–736, Jan. 2005.
- [195] X. Zhang *et al.*, "Transcription factor NFAT1 activates the mdm2 oncogene independent of p53," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 36, pp. 30468–30476, Aug. 2012.
- [196] J. X. Zhou *et al.*, "IFN regulatory factor 8 regulates MDM2 in germinal center B cells," *J. Immunol.*, vol. 183, no. 5, pp. 3188–3194, Sep. 2009.
- [197] C.-J. Chang, D. J. Freeman, and H. Wu, "PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 28, pp. 29841–29848, Jul. 2004.
- [198] G. L. Bond *et al.*, "A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans," *Cell*, vol. 119, no. 5, pp. 591–602, Nov. 2004.
- [199] R. Matsumoto, M. Tada, M. Nozaki, C. L. Zhang, Y. Sawamura, and H. Abe, "Short alternative splice transcripts of the mdm2 oncogene correlate to malignancy in human astrocytic neoplasms," *Cancer Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 609–613, Feb. 1998.
- [200] Y. Zhao, H. Yu, and W. Hu, "The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 46, no. 3, p. 180, Mar. 2014.
- [201] I. López, A.-S. Tournillon, K. Nylander, and R. Fåhraeus, "p53-mediated control of gene expression via mRNA translation during Endoplasmic Reticulum stress," *Cell Cycle*, vol. 14, no. 21, pp. 3373–3378, 2015.
- [202] L. D. Mayo, J. J. Turchi, and S. J. Berberich, "Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 22, pp. 5013–5016, Nov. 1997.
- [203] R. Maya *et al.*, "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage," *Genes Dev.*, vol. 15, no. 9, pp. 1067–1077, May 2001.
- [204] X. Lu, O. Ma, T.-A. Nguyen, S. N. Jones, M. Oren, and L. A. Donehower, "The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop," *Cancer Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 342–354, Oct. 2007.
- [205] E. Yu *et al.*, "Overexpression of the wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 101, no. 3, pp. 269–278, Mar. 2007.
- [206] Z. Goldberg *et al.*, "Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation," *EMBO J.*, vol. 21, no. 14, pp. 3715–3727, Jul. 2002.
- [207] R. Kulikov, K. A. Boehme, and C. Blattner, "Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 16, pp. 7170–7180, Aug. 2005.
- [208] H. Inuzuka *et al.*, "Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 147–159, Aug. 2010.
- [209] L. D. Mayo and D. B. Donner, "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 20, pp. 11598–11603, Sep. 2001.
- [210] D. W. Meek and U. Knippschild, "Posttranslational Modification of MDM2," *Mol Cancer Res.*, vol. 1, no. 14, pp. 1017–1026, Dec. 2003.

- [211] K. Itahana *et al.*, "Targeted inactivation of Mdm2 RING finger E3 ubiquitin ligase activity in the mouse reveals mechanistic insights into p53 regulation," *Cancer Cell*, vol. 12, no. 4, pp. 355–366, Oct. 2007.
- [212] L. K. Linares *et al.*, "Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 3, pp. 331–338, Mar. 2007.
- [213] Z. Wang *et al.*, "DNA damage-induced activation of ATM promotes β -TRCP-mediated Mdm2 ubiquitination and destruction," *Oncotarget*, vol. 3, no. 9, pp. 1026–1035, Sep. 2012.
- [214] M. S. Song, S. J. Song, S. Y. Kim, H. J. Oh, and D.-S. Lim, "The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex," *EMBO J.*, vol. 27, no. 13, pp. 1863–1874, Jul. 2008.
- [215] L. Li, J. Liao, J. Ruland, T. W. Mak, and S. N. Cohen, "A TSG101/MDM2 regulatory loop modulates MDM2 degradation and MDM2/p53 feedback control," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 4, pp. 1619–1624, Feb. 2001.
- [216] T. Buschmann, D. Lerner, C. G. Lee, and Z. Ronai, "The Mdm-2 amino terminus is required for Mdm2 binding and SUMO-1 conjugation by the E2 SUMO-1 conjugating enzyme Ubc9," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 44, pp. 40389–40395, Nov. 2001.
- [217] Y. Miyauchi, S. Yogosawa, R. Honda, T. Nishida, and H. Yasuda, "Sumoylation of Mdm2 by protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and RanBP2 enzymes," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 50131–50136, Dec. 2002.
- [218] D. P. Xirodimas, J. Chisholm, J. M. S. Desterro, D. P. Lane, and R. T. Hay, "P14ARF promotes accumulation of SUMO-1 conjugated (H)Mdm2," *FEBS Lett.*, vol. 528, no. 1–3, pp. 207–211, Sep. 2002.
- [219] D. P. Xirodimas, M. K. Saville, J.-C. Bourdon, R. T. Hay, and D. P. Lane, "Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity," *Cell*, vol. 118, no. 1, pp. 83–97, Jul. 2004.
- [220] T. Kamijo, J. D. Weber, G. Zambetti, F. Zindy, M. F. Roussel, and C. J. Sherr, "Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 95, no. 14, pp. 8292–8297, Jul. 1998.
- [221] R. Honda and H. Yasuda, "Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53," *EMBO J.*, vol. 18, no. 1, pp. 22–27, Jan. 1999.
- [222] D. E. Quelle, F. Zindy, R. A. Ashmun, and C. J. Sherr, "Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest," *Cell*, vol. 83, no. 6, pp. 993–1000, Dec. 1995.
- [223] W. Tao and A. J. Levine, "P19ARF stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 12, pp. 6937–6941, Jun. 1999.
- [224] J. D. Weber, L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and D. Bar-Sagi, "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53," *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 20–26, May 1999.
- [225] M. A. E. Lohrum, R. L. Ludwig, M. H. G. Kubbutat, M. Hanlon, and K. H. Vousden, "Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11," *Cancer Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 577–587, Jun. 2003.
- [226] D. Chen, M. Li, J. Luo, and W. Gu, "Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 16, pp. 13595–13598, Apr. 2003.

- [227] D. Lo and H. Lu, "Nucleostemin: Another nucleolar 'Twister' of the p53-MDM2 loop," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 16, pp. 3227–3232, Aug. 2010.
- [228] H. S. Park, J. M. Park, S. Park, J. Cho, S. I. Kim, and B.-W. Park, "Subcellular localization of Mdm2 expression and prognosis of breast cancer," *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 5, pp. 842–851, Oct. 2014.
- [229] A. Shvarts *et al.*, "MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2," *EMBO J.*, vol. 15, no. 19, pp. 5349–5357, Oct. 1996.
- [230] A. Shvarts *et al.*, "Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx," *Genomics*, vol. 43, no. 1, pp. 34–42, Jul. 1997.
- [231] S. Tanimura, S. Ohtsuka, K. Mitsui, K. Shirouzu, A. Yoshimura, and M. Ohtsubo, "MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains," *FEBS Lett.*, vol. 447, no. 1, pp. 5–9, Mar. 1999.
- [232] J. Gu *et al.*, "Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 22, pp. 19251–19254, May 2002.
- [233] R. Stad *et al.*, "Hdmx stabilizes Mdm2 and p53," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 36, pp. 28039–28044, Sep. 2000.
- [234] J. C. Badciong and A. L. Haas, "MdmX Is a RING Finger Ubiquitin Ligase Capable of Synergistically Enhancing Mdm2 Ubiquitination," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 49668–49675, Dec. 2002.
- [235] X. Wang, J. Wang, and X. Jiang, "MdmX Protein Is Essential for Mdm2 Protein-mediated p53 Polyubiquitination," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 27, pp. 23725–23734, Jul. 2011.
- [236] J. Parant *et al.*, "Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53," *Nat. Genet.*, vol. 29, no. 1, pp. 92–95, Sep. 2001.
- [237] D. Migliorini *et al.*, "Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 15, pp. 5527–5538, Aug. 2002.
- [238] R. A. Finch *et al.*, "mdmx is a negative regulator of p53 activity in vivo," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 11, pp. 3221–3225, Jun. 2002.
- [239] M. Liang *et al.*, "HDM4 is overexpressed in mantle cell lymphoma and its inhibition induces p21 expression and apoptosis," *Mod. Pathol.*, vol. 23, no. 3, pp. 381–391, Mar. 2010.
- [240] J.-C. W. Marine, M. A. Dyer, and A. G. Jochemsen, "MDMX: from bench to bedside," *J. Cell. Sci.*, vol. 120, no. Pt 3, pp. 371–378, Feb. 2007.
- [241] A. Gembarska *et al.*, "MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma," *Nat. Med.*, vol. 18, no. 8, pp. 1239–1247, Aug. 2012.
- [242] L. K. Linares, A. Hengstermann, A. Ciechanover, S. Müller, and M. Scheffner, "HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, no. 21, pp. 12009–12014, Oct. 2003.
- [243] M. W. Jackson and S. J. Berberich, "MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 1001–1007, Feb. 2000.
- [244] S. Francoz *et al.*, "Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, no. 9, pp. 3232–3237, Feb. 2006.
- [245] S. Xiong, C. S. Van Pelt, A. C. Elizondo-Fraire, G. Liu, and G. Lozano, "Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system

- development," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, no. 9, pp. 3226–3231, Feb. 2006.
- [246] J. D. Grier, S. Xiong, A. C. Elizondo-Fraire, J. M. Parant, and G. Lozano, "Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 1, pp. 192–198, Jan. 2006.
- [247] L. S. M. Boesten *et al.*, "Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 12, pp. 2089–2098, Dec. 2006.
- [248] M. Dewaele *et al.*, "Antisense oligonucleotide-mediated MDM4 exon 6 skipping impairs tumor growth," *J. Clin. Invest.*, vol. 126, no. 1, pp. 68–84, Jan. 2016.
- [249] O. Karni-Schmidt, M. Lokshin, and C. Prives, "The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer," *Annu Rev Pathol*, vol. 11, pp. 617–644, May 2016.
- [250] Q. Li and G. Lozano, "Molecular pathways: targeting Mdm2 and Mdm4 in cancer therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 34–41, Jan. 2013.
- [251] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren, "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53," *Nature*, vol. 387, no. 6630, pp. 296–299, May 1997.
- [252] S. N. Jones, A. E. Roe, L. A. Donehower, and A. Bradley, "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53," *Nature*, vol. 378, no. 6553, pp. 206–208, Nov. 1995.
- [253] R. Montes de Oca Luna, D. S. Wagner, and G. Lozano, "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53," *Nature*, vol. 378, no. 6553, pp. 203–206, Nov. 1995.
- [254] A. Chavez-Reyes, J. M. Parant, L. L. Amelse, R. M. de Oca Luna, S. J. Korsmeyer, and G. Lozano, "Switching mechanisms of cell death in mdm2- and mdm4-null mice by deletion of p53 downstream targets," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 24, pp. 8664–8669, Dec. 2003.
- [255] S. M. Mendrysa, M. K. McElwee, J. Michalowski, K. A. O'Leary, K. M. Young, and M. E. Perry, "mdm2 Is critical for inhibition of p53 during lymphopoiesis and the response to ionizing irradiation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 2, pp. 462–472, Jan. 2003.
- [256] T. Léveillard, P. Gorry, K. Niederreither, and B. Wasylyk, "MDM2 expression during mouse embryogenesis and the requirement of p53," *Mech. Dev.*, vol. 74, no. 1–2, pp. 189–193, Jun. 1998.
- [257] U. M. Moll and O. Petrenko, "The MDM2-p53 Interaction," *Mol Cancer Res*, vol. 1, no. 14, pp. 1001–1008, Dec. 2003.
- [258] I. Ringshausen, C. C. O'Shea, A. J. Finch, L. B. Swigart, and G. I. Evan, "Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo," *Cancer Cell*, vol. 10, no. 6, pp. 501–514, Dec. 2006.
- [259] J. F. Armstrong, M. H. Kaufman, D. J. Harrison, and A. R. Clarke, "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice," *Curr. Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 931–936, Aug. 1995.
- [260] V. P. Sah, L. D. Attardi, G. J. Mulligan, B. O. Williams, R. T. Bronson, and T. Jacks, "A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly," *Nat. Genet.*, vol. 10, no. 2, pp. 175–180, Jun. 1995.
- [261] J. D. Grier, W. Yan, and G. Lozano, "Conditional allele of mdm2 which encodes a p53 inhibitor," *Genesis*, vol. 32, no. 2, pp. 145–147, Feb. 2002.

- [262] L. Wu and A. J. Levine, "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.*, vol. 3, no. 7, pp. 441–451, Jul. 1997.
- [263] Y. Barak, T. Juven, R. Haffner, and M. Oren, "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity," *EMBO J.*, vol. 12, no. 2, pp. 461–468, Feb. 1993.
- [264] S. M. Picksley and D. P. Lane, "The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?," *Bioessays*, vol. 15, no. 10, pp. 689–690, Oct. 1993.
- [265] M. H. Kubbutat, S. N. Jones, and K. H. Vousden, "Regulation of p53 stability by Mdm2," *Nature*, vol. 387, no. 6630, pp. 299–303, May 1997.
- [266] R. Kulikov, J. Letienne, M. Kaur, S. R. Grossman, J. Arts, and C. Blattner, "Mdm2 facilitates the association of p53 with the proteasome," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, no. 22, pp. 10038–10043, Jun. 2010.
- [267] C. L. Brooks and W. Gu, "p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond," *Molecular Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 307–315, Feb. 2006.
- [268] M. A. Lohrum, D. B. Woods, R. L. Ludwig, E. Bálint, and K. H. Vousden, "C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 24, pp. 8521–8532, Dec. 2001.
- [269] N. C. Arva *et al.*, "A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 29, pp. 26776–26787, Jul. 2005.
- [270] D. E. White, K. E. Talbott, N. C. Arva, and J. Bargonetti, "Mouse Double Minute 2 Associates with Chromatin in the Presence of p53 and Is Released to Facilitate Activation of Transcription," *Cancer Res*, vol. 66, no. 7, pp. 3463–3470, Apr. 2006.
- [271] Y. Tang, W. Zhao, Y. Chen, Y. Zhao, and W. Gu, "Acetylation is indispensable for p53 activation," *Cell*, vol. 133, no. 4, pp. 612–626, May 2008.
- [272] L. Chen and J. Chen, "MDM2-ARF complex regulates p53 sumoylation," *Oncogene*, vol. 22, no. 34, pp. 5348–5357, Aug. 2003.
- [273] M. H. Stindt, S. Carter, A. M. Vigneron, K. M. Ryan, and K. H. Vousden, "MDM2 promotes SUMO-2/3 modification of p53 to modulate transcriptional activity," *Cell Cycle*, vol. 10, no. 18, pp. 3176–3188, Sep. 2011.
- [274] N. Minsky and M. Oren, "The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression," *Mol. Cell*, vol. 16, no. 4, pp. 631–639, Nov. 2004.
- [275] A. Ito *et al.*, "MDM2–HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation," *EMBO J.*, vol. 21, no. 22, pp. 6236–6245, Nov. 2002.
- [276] T. Léveillard and B. Wasylyk, "The MDM2 C-terminal region binds to TAFII250 and is required for MDM2 regulation of the cyclin A promoter," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 49, pp. 30651–30661, Dec. 1997.
- [277] C. Cordon-Cardo *et al.*, "Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 3, pp. 794–799, Feb. 1994.
- [278] I. Sigalas, A. H. Calvert, J. J. Anderson, D. E. Neal, and J. Lunec, "Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer," *Nat. Med.*, vol. 2, no. 8, pp. 912–917, Aug. 1996.
- [279] K. Lundgren *et al.*, "Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53," *Genes Dev.*, vol. 11, no. 6, pp. 714–725, Mar. 1997.

- [280] G. Ganguli and B. Wasylyk, "p53-independent functions of MDM2," *Mol. Cancer Res.*, vol. 1, no. 14, pp. 1027–1035, Dec. 2003.
- [281] P. Würfl *et al.*, "High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities," *Oncogene*, vol. 16, no. 9, pp. 1183–1185, Mar. 1998.
- [282] H. Taubert *et al.*, "Association of HDM2 transcript levels with age of onset and prognosis in soft tissue sarcomas," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 1575–1581, Oct. 2008.
- [283] Z. X. Xiao *et al.*, "Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2," *Nature*, vol. 375, no. 6533, pp. 694–698, Jun. 1995.
- [284] J. K. Hsieh, F. S. Chan, D. J. O'Connor, S. Mitnacht, S. Zhong, and X. Lu, "RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2," *Mol. Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 181–193, Feb. 1999.
- [285] R. Touitou, J. Richardson, S. Bose, M. Nakanishi, J. Rivett, and M. J. Allday, "A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 α -subunit of the 20S proteasome," *The EMBO Journal*, vol. 20, no. 10, pp. 2367–2375, May 2001.
- [286] Z. Zhang, H. Wang, M. Li, S. Agrawal, X. Chen, and R. Zhang, "MDM2 is a negative regulator of p21WAF1/CIP1, independent of p53," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 16, pp. 16000–16006, Apr. 2004.
- [287] X. Wei *et al.*, "Physical and functional interactions between PML and MDM2," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 31, pp. 29288–29297, Aug. 2003.
- [288] M. T. Boyd, N. Vlatkovic, and D. S. Haines, "A novel cellular protein (MTBP) binds to MDM2 and induces a G1 arrest that is suppressed by MDM2," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 41, pp. 31883–31890, Oct. 2000.
- [289] P. Sun, P. Dong, K. Dai, G. J. Hannon, and D. Beach, "p53-independent role of MDM2 in TGF- β 1 resistance," *Science*, vol. 282, no. 5397, pp. 2270–2272, Dec. 1998.
- [290] P. Mo, H. Wang, H. Lu, D. D. Boyd, and C. Yan, "MDM2 mediates ubiquitination and degradation of activating transcription factor 3," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 35, pp. 26908–26915, Aug. 2010.
- [291] T. W. Hai, F. Liu, W. J. Coukos, and M. R. Green, "Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers," *Genes Dev.*, vol. 3, no. 12B, pp. 2083–2090, Dec. 1989.
- [292] B. P. Chen, C. D. Wolfgang, and T. Hai, "Analysis of ATF3, a transcription factor induced by physiological stresses and modulated by gadd153/Chop10," *Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 3, pp. 1157–1168, Mar. 1996.
- [293] T. Hai, C. D. Wolfgang, D. K. Marsee, A. E. Allen, and U. Sivaprasad, "ATF3 and stress responses," *Gene Expr.*, vol. 7, no. 4–6, pp. 321–335, 1999.
- [294] H. Davies *et al.*, "Mutations of the BRAF gene in human cancer," *Nature*, vol. 417, no. 6892, pp. 949–954, Jun. 2002.
- [295] J.-Y. Yang *et al.*, "ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 138–148, Feb. 2008.
- [296] T. A. Fiddler, L. Smith, S. J. Tapscott, and M. J. Thayer, "Amplification of MDM2 inhibits MyoD-mediated myogenesis," *Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 5048–5057, Sep. 1996.

- [297] T. Juven-Gershon, O. Shifman, T. Unger, A. Elkeles, Y. Haupt, and M. Oren, "The Mdm2 oncoprotein interacts with the cell fate regulator Numb," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 7, pp. 3974–3982, Jul. 1998.
- [298] S. Yogosawa, Y. Miyauchi, R. Honda, H. Tanaka, and H. Yasuda, "Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 302, no. 4, pp. 869–872, Mar. 2003.
- [299] P. Hallenborg *et al.*, "Mdm2 controls CREB-dependent transactivation and initiation of adipocyte differentiation," *Cell Death Differ.*, vol. 19, no. 8, pp. 1381–1389, Aug. 2012.
- [300] L. Gu, H. W. Findley, and M. Zhou, "MDM2 induces NF-kappaB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia," *Blood*, vol. 99, no. 9, pp. 3367–3375, May 2002.
- [301] M. D. Cheney, P. P. McKenzie, E. L. Volk, L. Fan, and L. C. Harris, "MDM2 displays differential activities dependent upon the activation status of NFkappaB," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 38–44, Jan. 2008.
- [302] M. Wienken *et al.*, "MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of p53," *Mol. Cell*, vol. 61, no. 1, pp. 68–83, Jan. 2016.
- [303] N. Vlatkovic, S. Guerrero, Y. Li, S. Linn, D. S. Haines, and M. T. Boyd, "MDM2 interacts with the C-terminus of the catalytic subunit of DNA polymerase epsilon," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 18, pp. 3581–3586, Sep. 2000.
- [304] H. Asahara *et al.*, "Stimulation of human DNA polymerase epsilon by MDM2," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 9, pp. 2451–2459, May 2003.
- [305] Y.-S. Jung, Y. Qian, and X. Chen, "DNA polymerase eta is targeted by Mdm2 for polyubiquitination and proteasomal degradation in response to ultraviolet irradiation," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 11, no. 2, pp. 177–184, Feb. 2012.
- [306] J. R. Alt, A. Bouska, M. R. Fernandez, R. L. Cerny, H. Xiao, and C. M. Eischen, "Mdm2 binds to Nbs1 at sites of DNA damage and regulates double strand break repair," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 19, pp. 18771–18781, May 2005.
- [307] T. H. Stracker, J.-W. F. Theunissen, M. Morales, and J. H. J. Petrini, "The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 3, no. 8–9, pp. 845–854, Sep. 2004.
- [308] V. Marechal, B. Elenbaas, J. Piette, J. C. Nicolas, and A. J. Levine, "The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 14, no. 11, pp. 7414–7420, Nov. 1994.
- [309] A. Jin, K. Itahana, K. O'Keefe, and Y. Zhang, "Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 17, pp. 7669–7680, Sep. 2004.
- [310] Y. Zhang *et al.*, "Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 19, pp. 6544–6554, Oct. 2010.
- [311] Y. Zhu *et al.*, "Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 3, pp. 316–326, Aug. 2009.
- [312] M. Takagi, M. J. Absalon, K. G. McLure, and M. B. Kastan, "Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin," *Cell*, vol. 123, no. 1, pp. 49–63, Oct. 2005.

- [313] Y. Ofir-Rosenfeld, K. Boggs, D. Michael, M. B. Kastan, and M. Oren, "Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26," *Mol. Cell*, vol. 32, no. 2, pp. 180–189, Oct. 2008.
- [314] A.-L. Nieminen, S. Qanungo, E. A. Schneider, B.-H. Jiang, and F. H. Agani, "Mdm2 and HIF-1 α interaction in tumor cells during hypoxia," *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 2, pp. 364–369, Aug. 2005.
- [315] Y. Zhao, X. Chen, and J. Du, "Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation," *J Zhejiang Univ Sci B*, vol. 10, no. 5, pp. 404–410, May 2009.
- [316] D. R. Fels and C. Koumenis, "HIF-1 α and p53: the ODD couple?," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 30, no. 8, pp. 426–429, Aug. 2005.
- [317] D. R. Brown, C. A. Thomas, and S. P. Deb, "The human oncoprotein MDM2 arrests the cell cycle: elimination of its cell-cycle-inhibitory function induces tumorigenesis," *EMBO J.*, vol. 17, no. 9, pp. 2513–2525, May 1998.
- [318] R. Zhou, R. Frum, S. Deb, and S. P. Deb, "The growth arrest function of the human oncoprotein mouse double minute-2 is disabled by downstream mutation in cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 5, pp. 1839–1848, Mar. 2005.
- [319] T. Dilla, J. A. Velasco, D. L. Medina, J. F. González-Palacios, and P. Santisteban, "The MDM2 Oncoprotein Promotes Apoptosis in p53-Deficient Human Medullary Thyroid Carcinoma Cells," *Endocrinology*, vol. 141, no. 1, pp. 420–429, Jan. 2000.
- [320] A. Folberg-Blum, A. Sapir, B.-Z. Shilo, and M. Oren, "Overexpression of mouse Mdm2 induces developmental phenotypes in *Drosophila*," *Oncogene*, vol. 21, no. 15, pp. 2413–2417, Apr. 2002.
- [321] J.-Y. Yang *et al.*, "MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 19, pp. 7269–7282, Oct. 2006.
- [322] M. W. Datta, E. Macri, S. Signoretti, A. A. Renshaw, and M. Loda, "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.*, vol. 14, no. 5, pp. 437–442, May 2001.
- [323] M. Ladanyi, C. Cha, R. Lewis, S. C. Jhanwar, A. G. Huvos, and J. H. Healey, "MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 1, pp. 16–18, Jan. 1993.
- [324] S. Nag, X. Zhang, K. S. Srivenugopal, M.-H. Wang, W. Wang, and R. Zhang, "Targeting MDM2-p53 interaction for cancer therapy: are we there yet?," *Curr. Med. Chem.*, vol. 21, no. 5, pp. 553–574, 2014.
- [325] P. H. Kussie *et al.*, "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain," *Science*, vol. 274, no. 5289, pp. 948–953, Nov. 1996.
- [326] X. Yu, A. Vazquez, A. J. Levine, and D. R. Carpizo, "Allele Specific p53 Mutant Reactivation," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 5, pp. 614–625, May 2012.
- [327] P. Hainaut and J. Milner, "A structural role for metal ions in the 'wild-type' conformation of the tumor suppressor protein p53," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 8, pp. 1739–1742, Apr. 1993.
- [328] C.-X. Deng, "SIRT1, Is It a Tumor Promoter or Tumor Suppressor?," *Int J Biol Sci*, vol. 5, no. 2, pp. 147–152, Jan. 2009.
- [329] A. Sriraman, M. Radovanovic, M. Wienken, Z. Najafova, Y. Li, and M. Dobbelstein, "Cooperation of Nutlin-3a and a Wip1 inhibitor to induce p53 activity," *Oncotarget*, vol. 7, no. 22, pp. 31623–31638, May 2016.

- [330] C. Y. Zhao, V. V. Grinkevich, F. Nikulenkov, W. Bao, and G. Selivanova, "Rescue of the apoptotic-inducing function of mutant p53 by small molecule RITA," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 9, pp. 1847–1855, May 2010.
- [331] Y. Zhao, D. Bernard, and S. Wang, "Small Molecule Inhibitors of MDM2-p53 and MDMX-p53 Interactions as New Cancer Therapeutics," *BioDiscovery*, vol. 8, p. e8950, Aug. 2013.
- [332] I. Ray-Coquard *et al.*, "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.*, vol. 13, no. 11, pp. 1133–1140, Nov. 2012.
- [333] M. Miyazaki *et al.*, "Lead optimization of novel p53-MDM2 interaction inhibitors possessing dihydroimidazothiazole scaffold," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 3, pp. 728–732, Feb. 2013.
- [334] M. Miyazaki *et al.*, "Synthesis and evaluation of novel orally active p53-MDM2 interaction inhibitors," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 14, pp. 4319–4331, Jul. 2013.
- [335] M. Miyazaki *et al.*, "Discovery of DS-5272 as a promising candidate: A potent and orally active p53-MDM2 interaction inhibitor," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 23, no. 10, pp. 2360–2367, May 2015.
- [336] Y. Liu, X. Wang, G. Wang, Y. Yang, Y. Yuan, and L. Ouyang, "The past, present and future of potential small-molecule drugs targeting p53-MDM2/MDMX for cancer therapy," *Eur J Med Chem*, vol. 176, pp. 92–104, Aug. 2019.
- [337] Z. Guo *et al.*, "Structure-activity relationship and antitumor activity of thio-benzodiazepines as p53-MDM2 protein-protein interaction inhibitors.," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 56, pp. 10–16, 2012.
- [338] E. Barbieri *et al.*, "MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 9, pp. 2358–2365, Sep. 2006.
- [339] M. Xia, D. Knezevic, C. Tovar, B. Huang, D. C. Heimbrook, and L. T. Vassilev, "Elevated MDM2 boosts the apoptotic activity of p53-MDM2 binding inhibitors by facilitating MDMX degradation," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 11, pp. 1604–1612, Jun. 2008.
- [340] M. Jiang *et al.*, "Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 4, pp. 2636–2645, Jan. 2007.
- [341] E. Tonsing-Carter *et al.*, "Potentiation of Carboplatin-Mediated DNA Damage by the Mdm2 Modulator Nutlin-3a in a Humanized Orthotopic Breast-to-Lung Metastatic Model," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 14, no. 12, pp. 2850–2863, Dec. 2015.
- [342] C. C. Jiang *et al.*, "Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 16, pp. 6708–6717, Aug. 2008.
- [343] A. M. Sosin, A. M. Burger, A. Siddiqi, J. Abrams, R. M. Mohammad, and A. M. Al-Katib, "HDM2 antagonist MI-219 (spiro-oxindole), but not Nutlin-3 (cis-imidazoline), regulates p53 through enhanced HDM2 autoubiquitination and degradation in human malignant B-cell lymphomas," *J Hematol Oncol*, vol. 5, p. 57, Sep. 2012.
- [344] S. Wang *et al.*, "Spiro-oxindole MDM2 antagonists," US8877796B2, 04-Nov-2014.

- [345] V. J. N. Bykov *et al.*, "Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 282–288, Mar. 2002.
- [346] G. Ambrosini, E. B. Sambol, D. Carvajal, L. T. Vassilev, S. Singer, and G. K. Schwartz, "Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1," *Oncogene*, vol. 26, no. 24, pp. 3473–3481, May 2007.
- [347] M. Bista *et al.*, "Transient protein states in designing inhibitors of the MDM2-p53 interaction," *Structure*, vol. 21, no. 12, pp. 2143–2151, Dec. 2013.
- [348] L. Chen, S. Yang, J. Zhang, and Z. Zhang, "Oxindole derivatives," US8058269B2, 15-Nov-2011.
- [349] L. Chen, S. Yang, J. Zhang, and Z. Zhang, "Oxindole derivatives," US20080081810A1, 03-Apr-2008.
- [350] A. Aguilar *et al.*, "Discovery of 4-((3'R,4'S,5'R)-6"-Chloro-4'-(3-chloro-2-fluorophenyl)-1'-ethyl-2"-oxodispiro[cyclohexane-1,2'-pyrrolidine-3',3"-indoline]-5'-carboxamido)bicyclo[2.2.2]octane-1-carboxylic Acid (AA-115/APG-115): A Potent and Orally Active Murine Double Minute 2 (MDM2) Inhibitor in Clinical Development," *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 7, pp. 2819–2839, 13 2017.
- [351] W. Wang *et al.*, "The pyrido[b]indole MDM2 inhibitor SP-141 exerts potent therapeutic effects in breast cancer models," *Nat Commun*, vol. 5, p. 5086, Oct. 2014.
- [352] W. Wang *et al.*, "Identification of a New Class of MDM2 Inhibitor That Inhibits Growth of Orthotopic Pancreatic Tumors in Mice," *Gastroenterology*, vol. 147, no. 4, pp. 893-902.e2, Oct. 2014.
- [353] E. M. Pridgen, F. Alexis, and O. C. Farokhzad, "Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 12, no. 9, pp. 1459–1473, 2015.
- [354] K. Thanki, R. P. Gangwal, A. T. Sangamwar, and S. Jain, "Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities," *J Control Release*, vol. 170, no. 1, pp. 15–40, Aug. 2013.
- [355] J.-J. Qin, W. Wang, S. Sarkar, and R. Zhang, "Oral delivery of anti-MDM2 inhibitor SP141-loaded FcRn-targeted nanoparticles to treat breast cancer and metastasis," *J Control Release*, vol. 237, pp. 101–114, Sep. 2016.
- [356] D. Vllasaliu, C. Alexander, M. Garnett, M. Eaton, and S. Stolnik, "Fc-mediated transport of nanoparticles across airway epithelial cell layers," *J Control Release*, vol. 158, no. 3, pp. 479–486, Mar. 2012.
- [357] E. M. Pridgen *et al.*, "Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal fc receptor for oral delivery," *Sci Transl Med*, vol. 5, no. 213, p. 213ra167, Nov. 2013.
- [358] V. Y. Jo and C. D. M. Fletcher, "WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition," *Pathology*, vol. 46, no. 2, pp. 95–104, Feb. 2014.
- [359] A. P. Dei Tos, "Liposarcoma: new entities and evolving concepts," *Ann Diagn Pathol*, vol. 4, no. 4, pp. 252–266, Aug. 2000.
- [360] M. G. M. MD PJ Buecker, "Liposarcomes: Diagnostic, Traitement et Pronostic," *Liddy Shriver Sarcoma Initiative*. [Online]. Available: <http://sarcomahelp.org/translate/fr-liposarcome.html>. [Accessed: 15-Oct-2019].

- [361] L. Laurino, A. Furlanetto, E. Orvieto, and A. P. Dei Tos, "Well-differentiated liposarcoma (atypical lipomatous tumors)," *Semin Diagn Pathol*, vol. 18, no. 4, pp. 258–262, Nov. 2001.
- [362] A. G. Nascimento, "Dedifferentiated liposarcoma," *Semin Diagn Pathol*, vol. 18, no. 4, pp. 263–266, Nov. 2001.
- [363] I. U.--T. D. RESERVES, "Orphanet." [Online]. Available: <http://www.orpha.net/consor/www/cgi-bin/index.php?lng=FR>. [Accessed: 15-Oct-2019].
- [364] D. R. Lucas, A. G. Nascimento, B. K. Sanjay, and M. G. Rock, "Well-differentiated liposarcoma. The Mayo Clinic experience with 58 cases," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 102, no. 5, pp. 677–683, Nov. 1994.
- [365] W. GAO, H. WANG, J. LIU, F. WANG, J. DONG, and J. GENG, "Multiple mesenteric well-differentiated liposarcoma complicated by purulent inflammation: A case report," *Oncol Lett*, vol. 9, no. 3, pp. 1333–1336, Mar. 2015.
- [366] H. L. Evans, "Liposarcoma: a study of 55 cases with a reassessment of its classification," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 3, no. 6, pp. 507–523, Dec. 1979.
- [367] D. McCormick, T. Mentzel, A. Beham, and C. D. Fletcher, "Dedifferentiated liposarcoma. Clinicopathologic analysis of 32 cases suggesting a better prognostic subgroup among pleomorphic sarcomas," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 18, no. 12, pp. 1213–1223, Dec. 1994.
- [368] W. H. Henricks, Y. C. Chu, J. R. Goldblum, and S. W. Weiss, "Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 21, no. 3, pp. 271–281, Mar. 1997.
- [369] K. Thway, "Well-differentiated liposarcoma and dedifferentiated liposarcoma: An updated review," *Semin Diagn Pathol*, vol. 36, no. 2, pp. 112–121, Mar. 2019.
- [370] S. Okamoto, R. Machinami, T. Tanizawa, S. Matsumoto, G.-H. Lee, and Y. Ishikawa, "Dedifferentiated liposarcoma with rhabdomyoblastic differentiation in an 8-year-old girl," *Pathol. Res. Pract.*, vol. 206, no. 3, pp. 191–196, Mar. 2010.
- [371] R. Alaggio *et al.*, "Liposarcomas in young patients: a study of 82 cases occurring in patients younger than 22 years of age," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 33, no. 5, pp. 645–658, May 2009.
- [372] "Dedifferentiated Liposarcoma - an overview | ScienceDirect Topics." [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/dedifferentiated-liposarcoma>. [Accessed: 15-Oct-2019].
- [373] E. Montgomery and C. Fisher, "Paratesticular liposarcoma: a clinicopathologic study," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 27, no. 1, pp. 40–47, Jan. 2003.
- [374] J. M. Boland, T. V. Colby, and A. L. Folpe, "Liposarcomas of the mediastinum and thorax: a clinicopathologic and molecular cytogenetic study of 24 cases, emphasizing unusual and diverse histologic features," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 36, no. 9, pp. 1395–1403, Sep. 2012.
- [375] M. Bosco, E. Allia, J.-M. Coindre, C. Odasso, A. Pagani, and D. Pacchioni, "alpha-fetoprotein expression in a dedifferentiated liposarcoma," *Virchows Arch.*, vol. 448, no. 4, pp. 517–520, Apr. 2006.
- [376] M. Hisaoka, S. Tsuji, H. Hashimoto, T. Aoki, and K. Uriu, "Dedifferentiated liposarcoma with an inflammatory malignant fibrous histiocytoma-like component presenting a leukemoid reaction," *Pathol. Int.*, vol. 47, no. 9, pp. 642–646, Sep. 1997.

- [377] E. Fabre-Guillevin, J.-M. Coindre, N. de S. A. Somerhausen, F. Bonichon, E. Stoeckle, and N. B. Bui, "Retroperitoneal liposarcomas: follow-up analysis of dedifferentiation after clinicopathologic reexamination of 86 liposarcomas and malignant fibrous histiocytomas," *Cancer*, vol. 106, no. 12, pp. 2725–2733, Jun. 2006.
- [378] S. W. Weiss, "Lipomatous tumors," *Monogr Pathol*, vol. 38, pp. 207–239, 1996.
- [379] C. Fisher, E. A. Montgomery, and K. Thway, *Biopsy interpretation of soft tissue tumors*. Wolters Kluwer (UK) Ltd., 2012.
- [380] A. Gronchi *et al.*, "Myogenic differentiation and histologic grading are major prognostic determinants in retroperitoneal liposarcoma," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 39, no. 3, pp. 383–393, Mar. 2015.
- [381] H.-Y. Huang, M. F. Brennan, S. Singer, and C. R. Antonescu, "Distant metastasis in retroperitoneal dedifferentiated liposarcoma is rare and rapidly fatal: a clinicopathological study with emphasis on the low-grade myxofibrosarcoma-like pattern as an early sign of dedifferentiation," *Mod. Pathol.*, vol. 18, no. 7, pp. 976–984, Jul. 2005.
- [382] T. Hasegawa *et al.*, "Dedifferentiated liposarcoma of retroperitoneum and mesentery: varied growth patterns and histological grades--a clinicopathologic study of 32 cases," *Hum. Pathol.*, vol. 31, no. 6, pp. 717–727, Jun. 2000.
- [383] N. Sirvent *et al.*, "Characterization of centromere alterations in liposarcomas," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 29, no. 2, pp. 117–129, Oct. 2000.
- [384] Z. Hélias-Rodzewicz, F. Pédeutour, J.-M. Coindre, P. Terrier, and A. Aurias, "Selective elimination of amplified CDK4 sequences correlates with spontaneous adipocytic differentiation in liposarcoma," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 48, no. 11, pp. 943–952, Nov. 2009.
- [385] F. Mertens *et al.*, "Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. Chromosomes and MorPhology," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 22, no. 1, pp. 16–25, May 1998.
- [386] A. Italiano *et al.*, "HMGA2 is the partner of MDM2 in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas whereas CDK4 belongs to a distinct inconsistent amplicon," *Int. J. Cancer*, vol. 122, no. 10, pp. 2233–2241, May 2008.
- [387] J.-M. Coindre, F. Pédeutour, and A. Aurias, "Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas," *Virchows Arch.*, vol. 456, no. 2, pp. 167–179, Feb. 2010.
- [388] "WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Fourth Edition - WHO - OMS -." [Online]. Available: <https://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codch=4005>. [Accessed: 15-Oct-2019].
- [389] A. Italiano *et al.*, "Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas," *Clin. Cancer Res.*, vol. 15, no. 18, pp. 5696–5703, Sep. 2009.
- [390] D. Creytens, J. V. Gorp, E.-J. Speel, and L. Ferdinande, "Characterization of the 12q Amplicons in Lipomatous Soft Tissue Tumors by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification-based Copy Number Analysis," *Anticancer Res*, vol. 35, no. 4, pp. 1835–1842, Apr. 2015.

- [391] B. S. Taylor *et al.*, "Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas," *Cancer Discov*, vol. 1, no. 7, pp. 587–597, Dec. 2011.
- [392] W. D. Tap *et al.*, "Evaluation of well-differentiated/de-differentiated liposarcomas by high-resolution oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization," *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 50, no. 2, pp. 95–112, Feb. 2011.
- [393] O. Mariani *et al.*, "JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas," *Cancer Cell*, vol. 11, no. 4, pp. 361–374, Apr. 2007.
- [394] E. L. Snyder *et al.*, "c-Jun amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme," *J. Pathol.*, vol. 218, no. 3, pp. 292–300, Jul. 2009.
- [395] A. P. Dei Tos *et al.*, "Molecular abnormalities of the p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma," *J. Pathol.*, vol. 181, no. 1, pp. 8–13, Jan. 1997.
- [396] M. B. N. Binh *et al.*, "MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 29, no. 10, pp. 1340–1347, Oct. 2005.
- [397] K. Thway, R. Flora, C. Shah, D. Olmos, and C. Fisher, "Diagnostic utility of p16, CDK4, and MDM2 as an immunohistochemical panel in distinguishing well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas from other adipocytic tumors," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 36, no. 3, pp. 462–469, Mar. 2012.
- [398] L. Chung *et al.*, "Overlapping features between dedifferentiated liposarcoma and undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 33, no. 11, pp. 1594–1600, Nov. 2009.
- [399] J. Weaver *et al.*, "Can MDM2 analytical tests performed on core needle biopsy be relied upon to diagnose well-differentiated liposarcoma?," *Mod. Pathol.*, vol. 23, no. 10, pp. 1301–1306, Oct. 2010.
- [400] K. Thway, J. Wang, J. Swansbury, T. Min, and C. Fisher, "Fluorescence In Situ Hybridization for MDM2 Amplification as a Routine Ancillary Diagnostic Tool for Suspected Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcomas: Experience at a Tertiary Center," *Sarcoma*, vol. 2015, p. 812089, 2015.
- [401] J. Weaver *et al.*, "Fluorescence in situ hybridization for MDM2 gene amplification as a diagnostic tool in lipomatous neoplasms," *Mod. Pathol.*, vol. 21, no. 8, pp. 943–949, Aug. 2008.
- [402] A. M. Crago and S. Singer, "Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma," *Curr Opin Oncol*, vol. 23, no. 4, pp. 373–378, Jul. 2011.
- [403] R. L. Jones, C. Fisher, O. Al-Muderis, and I. R. Judson, "Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy," *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 18, pp. 2853–2860, Dec. 2005.
- [404] A. Karch, A. Koch, and V. Grünwald, "A phase II trial comparing pazopanib with doxorubicin as first-line treatment in elderly patients with metastatic or advanced soft tissue sarcoma (EPAZ): study protocol for a randomized controlled trial," *Trials*, vol. 17, Jul. 2016.
- [405] S. Bonvalot *et al.*, "Primary retroperitoneal sarcomas: a multivariate analysis of surgical factors associated with local control," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 1, pp. 31–37, Jan. 2009.

- [406] K. L. J. Bill *et al.*, "SAR405838: A Novel and Potent Inhibitor of the MDM2:p53 Axis for the Treatment of Dedifferentiated Liposarcoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 22, no. 5, pp. 1150–1160, Mar. 2016.
- [407] A. Burgess, K. M. Chia, S. Haupt, D. Thomas, Y. Haupt, and E. Lim, "Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies," *Front Oncol*, vol. 6, p. 7, 2016.
- [408] M. A. Dickson *et al.*, "Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 16, pp. 2024–2028, Jun. 2013.
- [409] J. J. Luke *et al.*, "The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial," *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 9, pp. 2638–2647, May 2012.
- [410] D.-W. Lai *et al.*, "TPL2 (Therapeutic Targeting Tumor Progression Locus-2)/ATF4 (Activating Transcription Factor-4)/SDF1 α (Chemokine Stromal Cell-Derived Factor- α) Axis Suppresses Diabetic Retinopathy," *Circ. Res.*, vol. 121, no. 6, pp. e37–e52, Sep. 2017.
- [411] K. Okamoto *et al.*, "Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2," *Mol. Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 761–771, Apr. 2002.
- [412] Y. Kanda, T. Hinata, S. W. Kang, and Y. Watanabe, "Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells," *Life Sci.*, vol. 89, no. 7–8, pp. 250–258, Aug. 2011.
- [413] C. Fischbach *et al.*, "Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes," *Experimental Cell Research*, vol. 300, no. 1, pp. 54–64, Oct. 2004.
- [414] H. Green and O. Kehinde, "Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line," *J. Cell. Physiol.*, vol. 101, no. 1, pp. 169–171, Oct. 1979.
- [415] A. Franz, W. Wood, and P. Martin, "Fat Body Cells Are Motile and Actively Migrate to Wounds to Drive Repair and Prevent Infection," *Developmental Cell*, vol. 44, no. 4, pp. 460–470.e3, Feb. 2018.
- [416] B. A. Schmidt and V. Horsley, "Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing," *Development*, vol. 140, no. 7, pp. 1517–1527, Apr. 2013.
- [417] J. Schellenberger *et al.*, "Quantitative prediction of cellular metabolism with constraint-based models: the COBRA Toolbox v2.0," *Nat Protoc*, vol. 6, no. 9, pp. 1290–1307, Aug. 2011.
- [418] E. Brunk *et al.*, "Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism," *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. 3, pp. 272–281, 2018.
- [419] "MetExplore." [Online]. Available: <https://metexplore.toulouse.inra.fr/index.html/>. [Accessed: 08-Oct-2019].
- [420] F. J. Kim *et al.*, "Intrahost variations in the envelope receptor-binding domain (RBD) of HTLV-1 and STLV-1 primary isolates," *Retrovirology*, vol. 3, p. 29, May 2006.
- [421] L. Swainson, S. Kinet, N. Manel, J.-L. Battini, M. Sitbon, and N. Taylor, "Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4+CD8+ human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 36, pp. 12867–12872, Sep. 2005.

- [422] C.-H. Chang *et al.*, “Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression,” *Cell*, vol. 162, no. 6, pp. 1229–1241, Sep. 2015.
- [423] P. Bi *et al.*, “Notch activation drives adipocyte dedifferentiation and tumorigenic transformation in mice,” *J Exp Med*, vol. 213, no. 10, pp. 2019–2037, Sep. 2016.
- [424] J. W. Wu *et al.*, “Epistatic interaction between the lipase-encoding genes *Pnpla2* and *Lipe* causes liposarcoma in mice,” *PLoS Genet*, vol. 13, no. 5, May 2017.
- [425] K. M. Nieman *et al.*, “Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth,” *Nat. Med.*, vol. 17, no. 11, pp. 1498–1503, Oct. 2011.
- [426] N. Zaidi, L. Lupien, N. B. Kuemmerle, W. B. Kinlaw, J. V. Swinnen, and K. Smans, “Lipogenesis and lipolysis: the pathways exploited by the cancer cells to acquire fatty acids,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 585–589, Oct. 2013.
- [427] P. Arner and D. Langin, “Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 5, pp. 255–262, May 2014.
- [428] A. M. Crago *et al.*, “Copy number losses define subgroups of dedifferentiated liposarcoma with poor prognosis and genomic instability,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 5, pp. 1334–1340, Mar. 2012.
- [429] W. Al-Zoughbi *et al.*, “Loss of adipose triglyceride lipase is associated with human cancer and induces mouse pulmonary neoplasia,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 23, pp. 33832–33840, Jun. 2016.
- [430] S. Wang *et al.*, “SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 20, pp. 5855–5865, Oct. 2014.
- [431] Y. Li *et al.*, “Discovery of MD-224 as a First-in-Class, Highly Potent, and Efficacious Proteolysis Targeting Chimera Murine Double Minute 2 Degradable Capable of Achieving Complete and Durable Tumor Regression,” *J. Med. Chem.*, vol. 62, no. 2, pp. 448–466, 24 2019.
- [432] G. E. Winter *et al.*, “DRUG DEVELOPMENT. Phthalimide conjugation as a strategy for in vivo target protein degradation,” *Science*, vol. 348, no. 6241, pp. 1376–1381, Jun. 2015.
- [433] J. Lu *et al.*, “Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4,” *Chem. Biol.*, vol. 22, no. 6, pp. 755–763, Jun. 2015.
- [434] T. K. Neklesa *et al.*, “ARV-330: Androgen receptor PROTAC degrader for prostate cancer,” *JCO*, vol. 34, no. 2_suppl, pp. 267–267, Jan. 2016.
- [435] A. C. Lai *et al.*, “Modular PROTAC Design for the Degradation of Oncogenic BCR-ABL,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 55, no. 2, pp. 807–810, Jan. 2016.
- [436] Y. Demizu *et al.*, “Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 20, pp. 4865–4869, 15 2016.
- [437] D. P. Bondeson *et al.*, “Catalytic in vivo protein knockdown by small-molecule PROTACs,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 8, pp. 611–617, Aug. 2015.
- [438] F. Daidone *et al.*, “In silico and in vitro validation of serine hydroxymethyltransferase as a chemotherapeutic target of the antifolate drug pemetrexed,” *Eur J Med Chem*, vol. 46, no. 5, pp. 1616–1621, May 2011.
- [439] J. Y. Sonn *et al.*, “Serine metabolism in the brain regulates starvation-induced sleep suppression in *Drosophila melanogaster*,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 115, no. 27, pp. 7129–7134, Jul. 2018.

- [440] N. Fuller *et al.*, “An improved model for fragment-based lead generation at AstraZeneca,” *Drug Discov. Today*, vol. 21, no. 8, pp. 1272–1283, 2016.
- [441] J. E. Unterlass *et al.*, “Validating and enabling phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) as a target for fragment-based drug discovery in PHGDH-amplified breast cancer,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 17, pp. 13139–13153, Mar. 2018.
- [442] E. Mullarky *et al.*, “Identification of a small molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase to target serine biosynthesis in cancers,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 113, no. 7, pp. 1778–1783, Feb. 2016.
- [443] M. E. Pacold *et al.*, “A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and 1-carbon unit fate,” *Nat Chem Biol*, vol. 12, no. 6, pp. 452–458, Jun. 2016.
- [444] M. A. Reid *et al.*, “Serine synthesis through PHGDH coordinates nucleotide levels by maintaining central carbon metabolism,” *Nat Commun*, vol. 9, no. 1, p. 5442, 21 2018.
- [445] R. Nilsson *et al.*, “Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer,” *Nat Commun*, vol. 5, p. 3128, 2014.
- [446] A. C. Newman and O. D. K. Maddocks, “One-carbon metabolism in cancer,” *Br J Cancer*, vol. 116, no. 12, pp. 1499–1504, Jun. 2017.
- [447] J. Ye *et al.*, “Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia,” *Cancer Discov*, vol. 4, no. 12, pp. 1406–1417, Dec. 2014.
- [448] Y. Li, W. Zhang, S. Li, and C. Tu, “Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis,” *Springerplus*, vol. 5, no. 1, Aug. 2016.
- [449] F. Picaud, “Analyse des marqueurs de la radiorésistance et de l’hypoxie tumorales dans le liposarcome du rétro péritoine traité par radiothérapie pré-opératoire,” exercice, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2014.
- [450] O. D. K. Maddocks *et al.*, “Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation,” *Nature*, vol. 544, no. 7650, pp. 372–376, Apr. 2017.
- [451] A. Chakraborty, S. Chowdhury, and M. Bhattacharyya, “Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 93, no. 1, pp. 56–62, Jul. 2011.
- [452] A. Esteghamati *et al.*, “Effects of metformin on markers of oxidative stress and antioxidant reserve in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a randomized clinical trial,” *Clin Nutr*, vol. 32, no. 2, pp. 179–185, Apr. 2013.
- [453] N. Kanarek *et al.*, “Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity,” *Nature*, vol. 559, no. 7715, pp. 632–636, Jul. 2018.
- [454] S. R. V. Knott *et al.*, “Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer,” *Nature*, vol. 554, no. 7692, pp. 378–381, Feb. 2018.
- [455] X. Gao *et al.*, “Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism,” *Nature*, vol. 572, no. 7769, pp. 397–401, Aug. 2019.
- [456] D. G. Kirsch *et al.*, “A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma,” *Nat Med*, vol. 13, no. 8, pp. 992–997, Aug. 2007.

Résumé :

Les Liposarcomes (LPS) sont des tumeurs rares (environ 1% des nouveaux cas de cancers en France) faisant partie de la grande famille des sarcomes. Le pronostic de ce cancer dépend principalement de sa localisation, de son grade, de sa taille, mais également de la qualité de chirurgie qui est aujourd'hui la stratégie thérapeutique la plus efficace. En effet les LPS présentent une résistance importante à la plupart des chimiothérapies classiques ainsi qu'à la radiothérapie, soulignant l'importance de découvrir et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les LPS peuvent être classés en différents sous-types dont les plus communs sont les LPS bien différenciés et les LPS dédifférenciés qui ont pour particularité commune d'avoir une amplification massive du gène de *MDM2*. L'amplification quasi systématique de ce gène est d'ailleurs utilisée en clinique pour discriminer les LPS des autres sous-types de sarcomes au moment du diagnostic de la maladie.

Au niveau moléculaire, les propriétés oncogéniques de la protéine MDM2 ont été jusqu'à présent principalement attribuées à son activité E3 ubiquitine ligase qui conduit à la dégradation du suppresseur de tumeurs p53 par le protéasome. Cette fonction de MDM2 fût à la base du développement de thérapies ciblées reposant sur différentes molécules, telles que celles de la famille de la Nutlin, capables de bloquer l'interaction entre p53 et MDM2 et de réactiver les fonctions suppresseur de tumeurs de p53. Malheureusement, la plupart des essais cliniques réalisés avec ces inhibiteurs pharmacologiques ont montrés un bénéfice thérapeutique faible, voir inexistant, pour les patients atteints de LPS. Aujourd'hui, des preuves croissantes suggèrent que les fonctions oncogéniques de MDM2 s'étendent au-delà de son rôle de régulateur négatif de p53. Parmi ces fonctions indépendantes de p53, notre laboratoire a récemment montré d'une part, que MDM2 est capable d'être recruté à la chromatine afin de réguler un programme transcriptionnel impliqué dans le métabolisme des acides aminés et plus particulièrement dans celui de la sérine et de la glycine (Riscal et al., Mol. Cell. 2016), d'autre part que MDM2 peut-être localisé à la mitochondrie pour réguler transcriptionnellement certaines sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire (Arena et al., Mol Cell, accepté).

L'analyse d'échantillons frais de tumeurs humaines issus d'une collection unique de sarcomes (Banque Clinico Biologique créée en 2016 au centre régional de lutte contre le Cancer de Montpellier / ICM) m'a permis de montrer que MDM2 est fortement recrutée à la chromatine dans les LPS contrairement à d'autres types de sarcomes. Mon projet de thèse, vise à étudier le rôle de MDM2 dans le développement des LPS et à mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à son amplification systématique dans ce type tumoral. En utilisant une collection unique de lignées cellulaires dérivées de patients et de modèles de xénogreffes (PDX) de LPS, mes travaux ont permis de montrer pour la première fois que le rôle de MDM2 dans le contrôle du métabolisme de la sérine et de la glycine joue un rôle essentiel dans le développement des LPS et constitue une nouvelle cible thérapeutique.