



HAL
open science

Etudes moléculaires et pharmacologiques du récepteur Smoothened

Lucile Hoch

► **To cite this version:**

Lucile Hoch. Etudes moléculaires et pharmacologiques du récepteur Smoothened. Pharmacologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA11T042 . tel-01214094v2

HAL Id: tel-01214094

<https://theses.hal.science/tel-01214094v2>

Submitted on 13 Oct 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 419 :
BIOSIGNE

Laboratoire Neuro-PSI UMR-9197

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

par

Lucile HOCH

ÉTUDES MOLÉCULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DU RÉCEPTEUR SMOOTHENED

Date de soutenance : 21/09/2015

Directeur de thèse : Martial RUAT

Directeur de Recherche / Neuro-PSI - Gif-sur-Yvette

Composition du jury :

Président : Hervé DANIEL

Directeur de Recherche / Neuro-PSI - Orsay

Rapporteurs : Isabelle MUS-VETEAU

Chercheur - CNRS / IPMC - Valbonne

Philippe RONDARD

Directeur de Recherche / IGF - Montpellier

Examineurs : Anne PLESSIS

Directeur de Recherche / IJM - Paris

Hervé CHNEIWEISS

Directeur de Recherche / IBPS - Paris

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement le Dr Martial Ruat qui a été mon directeur de thèse au cours de ces quatre années. Ses qualités professionnelles et sa rigueur scientifique ont été pour moi exemplaires. Merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir encadrée tout au long de mes recherches. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors de nombreux congrès scientifiques.

Je remercie le Dr Hervé Daniel d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie chaleureusement les Drs Isabelle Mus-Veteau et Philippe Rondard d'avoir accepté de prendre le temps de juger mon travail en tant que rapporteur. C'est un privilège pour moi de recevoir l'avis de deux spécialistes dans leurs domaines respectifs.

De même, je remercie les Drs Hervé Chneiweiss et Anne Plessis d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie le Dr Alain Mauviel, mon tuteur de thèse, d'avoir pris le temps d'examiner mes travaux au cours de cette thèse et pour son soutien dans ma recherche de post-doctorat. Je remercie également le Dr Birgit Geogerger, pour avoir pris le temps d'évaluer mes travaux à mi-parcours et pour son expertise en tant que chercheur-clinicien.

Je remercie également très vivement mes collaborateurs chimistes. Je remercie le Dr Didier Rognan pour son excellente expertise en modélisation moléculaire. Je remercie mes collaborateurs italiens, le Pr Maurizio Taddei, le Dr Fabrizio Manetti, le Dr Antonio Solinas et le Dr Elena Petricci, et mes collaborateurs français, le Dr André Mann, le Dr Nicolas Girard et Angèle Schoenfelder pour la synthèse des différents composés ainsi que le modèle pharmacophorique.

Je remercie le Dr Olivier Ayrault ainsi que son étudiante Laure Bihannic qui ont contribué à l'évaluation des effets *ex vivo* des composés. Merci pour votre aide précieuse.

Cette thèse a été réalisée dans l'Unité Mixte de Recherche 9197 de l'Institut des Neurosciences de Paris-Saclay, au CNRS de Gif-sur-Yvette. Je remercie le directeur Philippe Vernier de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci également à l'ensemble des chercheurs et étudiants de l'institut avec qui j'ai eu plaisir de travailler au cours de ces quatre années, ainsi qu'au personnel de l'accueil, du secrétariat, de la laverie et de l'animalerie pour leur aide au quotidien.

Je remercie l'ensemble de l'équipe Transduction du Signal et Neuropharmacologie Développementale avec qui j'ai travaillé quotidiennement au cours de ces quatre années de thèse. Un grand merci au Dr Héléne Faure pour toute son aide technique et mon

apprentissage à la pharmacologie. Merci également pour les moments que nous avons partagés ensemble en congrès. Merci au Dr Elisabeth Traiffort avec qui j'ai partagé mes deux premières années de thèse. Merci également au Dr Tatiana Gorojankina pour notre travail collaboratif. Merci aux Drs Hermine Roudaut et Julien Ferent, anciens étudiants en thèse au laboratoire, avec qui ce fut un plaisir de travailler et de passer des soirées à l'extérieur du laboratoire ! Vous étiez mes deux modèles et j'espère briller autant que vous deux ! Merci aux différents étudiants et post-doctorants avec qui j'ai eu l'occasion de travailler au laboratoire, Loïc, Lucille, Laetitia, Andreina, Mathieu, Laurent, Linda et Payel. Je vous souhaite à tous une belle carrière scientifique.

Merci à mes amis qui ont suivi cette thèse de près depuis maintenant quatre ans. Merci de vous être intéressés à mon sujet de thèse, vous étiez mes meilleurs cobayes pour mes essais de vulgarisation scientifique !

Pour finir, je voudrais remercier mes parents de m'avoir donné cette fibre scientifique et de m'avoir soutenue tout au long de mes études. Merci à mon frère, Jérémy, mon plus grand fan ! Merci de croire que je suis le petit cerveau de la famille, il va falloir m'appeler Docteur maintenant ! Merci à tous les membres de ma famille pour leur soutien. Enfin, merci à Nicolas, qui est arrivé au milieu de cette thèse pour mon plus grand bonheur. Merci pour tout, tu es mon moteur à chaque instant. Mon doctorat se termine et la suite nous l'écrivons ensemble.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

7TM	7 transmembrane domain ou 7 domaines transmembranaires
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par l'AMP
AP	Alcaline phosphatase
ATO	Arsenic trioxide
BC	Bodipy-cyclopamine
BCC	Basal cell-carcinoma ou carcinome basocellulaire
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
BMP	Bone morphogenetic protein ou protéine morphogène de l'os
BO	Bulbe olfactif
Boc	Brother-of-Cdo
Boi	Brother-of-Ihog
Cdo	Cam-related/down-regulated by oncogenes
CE ₅₀	Concentration efficace à 50 %
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50 %
CK1	Casein kinase 1 ou kinase caséine 1
CRD	Cystein rich domain ou domaine riche en cystéine
CSC	Cellule souche cancéreuse
Dhcr7	7-déhydrocholestérol réductase
Dhh	Desert Hedgehog
Disp	Dispatched
DRAL	Downregulated in rhabdomyosarcoma LIM-domain protein
ECD	Extracellular domain ou domaine extracellulaire
ECL	Extracellular loop ou boucle extracellulaire
EGF	Epidermal growth factor ou facteur de croissance de l'épiderme
EGL	External granule cell layer ou couche granulaire externe
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
FDA	Food and drug Administration ou agence américaine de contrôle des aliments et médicaments
FGF	Fibroblast Growth Factor ou facteur de croissance des fibroblastes
FNIII	Fibronectine de type III
FRET	Fluorescence resonance energy transfer ou transfert d'énergie par résonance de type Förster
Fzd	Frizzled
GAG	Glycosaminoglycane
Gas1	Growth arrest specific gene 1
GCP	Granular cell precursor ou précurseurs des cellules granulaires
GD	Gyrus dentelé
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor ou facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales
GDP	Guanosine diphosphate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein ou acide protéique fibrillaire glial
GFP	Green fluorescent protein ou protéine fluorescente verte
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRK2	G-protein coupled receptor kinase 2

GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 β
GTP	Guanosine triphosphate
Hh	Hedgehog
Hh-C	Fragment Hedgehog C-terminal
Hh-N	Fragment Hedgehog N-terminal
Hh-Np	Fragment Hedgehog N-terminal palmitoylé
Hip	Hedgehog Interacting Protein
HPE	Holoprosencéphalie
HSPG	Héparane sulfate protéoglycane
ICL	Intracellular loop ou boucle intracellulaire
IFT	Intraflagellar transport ou transport intraflagellaire
Ig	Immunoglobuline
IGL	Internal granule cell layer ou couche granulaire interne
Ihh	Indian Hedgehog
Ihog	Interference Hedgehog
Kif	Kinesin family ou famille de kinésine
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LPC	Lysolécithine
LRP2	Lipoprotéine basse densité 2
MB	Médulloblastome
NPC1	Niemann-Pick Type C1
OL	Oligodendrocyte
OL	Oligodendrocytes
OLP	Précurseurs oligodendrocytaires
OLP	Progéniteur oligodendrocytaire
PC	Purkinje cell ou cellule de Purkinje
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor ou facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PKA	Protéine kinase A
Ptc	Patched
PTX	Pertussis toxin ou toxine pertussique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RMS	Rhabdomyosarcome
RND	Résistance nodulation division
Shh	Sonic Hedgehog
Skn	Skinny
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrom ou syndrome de Smith-Lemli-Opitz
Smo	Smoothened
SSD	Sterol sensing domain ou domaine sensible aux stérols
Sufu	Suppressor of Fused
TM	Transmembranaire
UV	Ultraviolet
VL	Ventricules latéraux
vNTS	Noyau ventral du tractus solitaire
Wnt	Interaction of wingless
ZSG	Zone sous-granulaire
ZSV	Zone sous-ventriculaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 :	Maturation et sécrétion de la protéine Hedgehog.....	15
Figure 2 :	Structure cristallographique du récepteur Smoothened	24
Figure 3 :	Homologie structurale des ECD de 6 protéines différentes	27
Figure 4 :	Comparaison des structures 3D de RCPG de classe A, B et F	29
Figure 5 :	Signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G	33
Figure 6 :	Structure du cil primaire	38
Figure 7 :	Signalisation Hedgehog au cil primaire	40
Figure 8 :	Exemples de voies de signalisation Hedgehog non canoniques	42
Figure 9 :	Régulation des voies de signalisation Hedgehog non canoniques par les modulateurs de Smoothened	44
Figure 10 :	Rôle de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le développement du tube neural	49
Figure 11 :	Régulation des cellules précurseurs du cervelet par la voie de signalisation Sonic Hedgehog	55
Figure 12 :	Les aires de neurogenèse du cerveau adulte de rongeur	57
Figure 13 :	Mécanismes d'activation proposés de la signalisation Hedgehog dans les cancers	70
Figure 14 :	Structures des principales molécules agonistes du récepteur Smoothened	86
Figure 15 :	Structures de la cyclopropamine et de ses dérivés	90
Figure 16 :	Modèle d'activation du récepteur Smoothened chez les vertébrés	92
Figure 17 :	Structures des principaux antagonistes du récepteur Smoothened	95

Figure 18 : Mécanismes de résistance observés après le traitement de médulloblastomes ou de carcinomes basocellulaires par des inhibiteurs du récepteur Smoothened.....	98
Figure 19 : Cartographie et analyse de la poche de liaison de l'oxystérol dans le domaine amino-terminal du récepteur Smoothened de poisson-zèbre	109
Figure 20 : Structure cristallographique du récepteur Smoothened humain complexé à l'antagoniste LY2940680 (A) ou SANT-1 (B).....	111
Figure 21 : Les différents sites de liaison au niveau du domaine transmembranaire des modulateurs du récepteur Smoothened.....	113
Figure 22 : Structure cristallographique d'un homodimère du récepteur Smoothened (monomère A, jaune; monomère B, bleu)	115
Figure 23 : Structure cristallographique du récepteur adrénergique $\beta 2$ complexé à une protéine Gs (PDB ID 3SN6) illustrant les différentes stratégies disponibles pour l'étude structurale des RCPG.....	171
Figure 24 : Site de liaison du MRT-92 sur le récepteur Smoothened	175

TABLEAU

Tableau 1 : Comparaison des affinités des différents radioligands du récepteur Smoothened.....	83
---	----

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
I. Voie de signalisation Hedgehog	13
1. Les protéines Hedgehog.....	13
1.1 Maturation et synthèse.....	14
1.2 Sécrétion et transport.....	16
2. Réception du signal Hh.....	18
2.1 Patched	18
2.2 Les co-récepteurs : Cdo, Boc, Gas-1.....	21
2.3 Hedgehog Interacting Protein	23
3. Transduction du signal.....	25
3.1 Smoothened	25
3.2 Signalisation intracellulaire : voie canonique.....	35
3.3 Voies non canoniques.....	41
II. Rôle physiologique de la voie de signalisation Shh dans le système nerveux	48
1. Voie de signalisation Shh et développement du système nerveux central	48
1.1 Mise en place de la moelle épinière ventrale	48
1.2 Développement des oligodendrocytes.....	50
1.3 Guidage axonal	52
1.4 Régulation des cellules précurseurs du cervelet	53
2. Voie de signalisation Shh dans le cerveau adulte.....	54
2.1 Régulation de la maintenance des cellules souches	56
2.2 Contrôle des propriétés électrophysiologiques des neurones matures	62
III. Pathologies et applications thérapeutiques	63
1. Malformations congénitales	63
2. Cancers.....	65
2.1 Carcinome basocellulaire	65
2.2 Médulloblastome.....	67
2.3 Tumeurs Hh-dépendantes	68
2.4 Signalisation Hh et cellules souches tumorales	71
3. Ciliopathies	73
4. Maladies neurodégénératives	75
4.1 Maladie de Parkinson	75
4.2 Réparation des nerfs, démyélinisation, réparation des tissus	76
IV. Pharmacologie du récepteur Smoothened	80
1. Les principaux tests mettant en jeu la voie de signalisation Hh.....	80

2. Modulateurs du récepteur Smoothened	84
2.1 Les agonistes	84
2.2 Les antagonistes	89
3. Modulateurs d'autres composantes de la voie de signalisation Hh	102
3.1 Inhibiteurs de la protéine Shh	103
3.2 Inhibiteurs des facteurs de transcription Gli	103
4. Les différents sites de liaison des modulateurs de Smoothened	107
4.1 Le CRD	108
4.2 Le domaine transmembranaire	110
IV. Présentation du sujet de thèse	116
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	117
Résumé de l'article Hoch <i>et al.</i> , FASEB J, 2015	119
Résumé de l'article Gorjankina <i>et al.</i> , Mol Pharmacol, 2013	141
DISCUSSION	167
I. Identification d'un nouveau composé antagoniste, le MRT-92	169
1. Intérêt des techniques de cristallisation et de modélisation moléculaire pour la recherche de nouveaux ligands de Smo	169
2. Intérêt thérapeutique du composé MRT-92	172
II. [³H]MRT-92, un nouvel outil pharmacologique puissant	173
1. Étude des mutations résistantes du récepteur Smo	173
2. Identification de nouveaux modulateurs du récepteur Smo	174
III. Découverte du composé GSA-10	177
1. Le GSA-10, un nouvel antagoniste de la voie Hh canonique ?	177
2. Site de liaison du GSA-10 au récepteur Smoothened	178
IV. Conclusion et perspectives	181
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	183

INTRODUCTION

I. Voie de signalisation Hedgehog

1. Les protéines Hedgehog

Les protéines de la famille Hedgehog (Hh) sont des morphogènes qui interviennent dans la régulation de l'organogenèse au cours du développement embryonnaire. En fonction de leur concentration, elles jouent un rôle essentiel en particulier dans la mise en place du système nerveux. La protéine Hh a été découverte chez la drosophile, lors d'un criblage génétique visant à identifier les gènes impliqués dans le développement de la larve (Nusslein-Volhard *et al.*, 1980). La protéine Hh participe à l'élaboration de la polarité des segments embryonnaires et des disques imaginaux larvaires (Lee *et al.*, 1992). L'origine du nom de la protéine Hh provient de l'observation d'un changement du phénotype morphologique d'une larve mutante pour Hh, rappelant l'apparence d'un hérisson (*Hedgehog* en anglais). Des gènes orthologues de la famille Hh ont été identifiés dans plusieurs espèces telles que la souris (Echelard *et al.*, 1993), le poisson-zèbre (Krauss *et al.*, 1993), le poulet (Riddle *et al.*, 1993), le xénope (Ekker *et al.*, 1995) et l'Homme (Marigo *et al.*, 1995). Il existe trois protéines appartenant à la famille Hh chez les vertébrés : Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh). Bien qu'il s'agisse de trois gènes différents, les protéines correspondantes partagent les mêmes mécanismes de synthèse, de sécrétion et de transport jusqu'à leurs cibles (Gallet, 2011). Elles ont des effets physiologiques identiques mais des profils d'expression différents. Dhh est exprimée dans les gonades, plus particulièrement dans les cellules de Sertoli des testicules et des cellules de la granulosa au niveau des ovaires (Bitgood *et al.*, 1996 ; Yao *et al.*, 2002 ; Wijgerde *et al.*, 2005) ainsi que dans les cellules de Schwann qui assurent principalement l'isolation myélinique des axones du système nerveux périphérique des vertébrés (Bitgood *et al.*, 1995). Ihh est principalement

restreint à l'endoderme primitif, à l'intestin et aux chondrocytes au sein des zones de croissance osseuse (Vortkamp *et al.*, 1996 ; Dyer *et al.*, 2001 ; van den Brink, 2007). Shh est la protéine la plus largement exprimée, notamment au niveau du tube neural au cours de l'embryogenèse et dans la plupart des tissus épithéliaux chez l'adulte ; pour revue (Therond, 2012 ; Ruat *et al.*, 2015a).

1.1 Maturation et synthèse

Les protéines Hh subissent un processus de maturation pour être libérées hors de la cellule sous leurs formes actives (**Figure 1**). Elles sont synthétisées sous la forme d'un précurseur de 45 kDa qui va subir plusieurs modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique (RE) ; (Chen *et al.*, 2011a). Après une première hydrolyse de l'extrémité N-terminale correspondant au peptide signal, le précurseur subit une deuxième hydrolyse liée à l'activité autoprotéolytique de la partie C-terminale qui confère au précurseur sa propriété d'intéine (protéine intron qui présente une activité enzymatique lui permettant de faire son propre épissage) (Lee *et al.*, 1994 ; Porter *et al.*, 1996a). L'hydrolyse libère des peptides N- (Hh-N) et C- (Hh-C) terminaux de 19 et 25 kDa, respectivement. Le peptide Hh-C est rapidement transporté hors du RE pour être dégradé par le protéasome (Chen *et al.*, 2011a) alors que simultanément à la protéolyse, un groupement cholestérol est ajouté sur l'extrémité C-terminale de Hh-N (Porter *et al.*, 1996b). Le groupement cholestérol permet l'ancrage de la protéine précurseur à la membrane plasmique. Il a été montré *in vitro* que d'autres composés stéroïdiens peuvent remplacer le cholestérol lors de la maturation des protéines Hh (Cooper *et al.*, 1998). *In vivo*, il a été spéculé que d'autres stéroïdes endogènes peuvent se fixer en plus du cholestérol (Mann *et al.*, 2004).

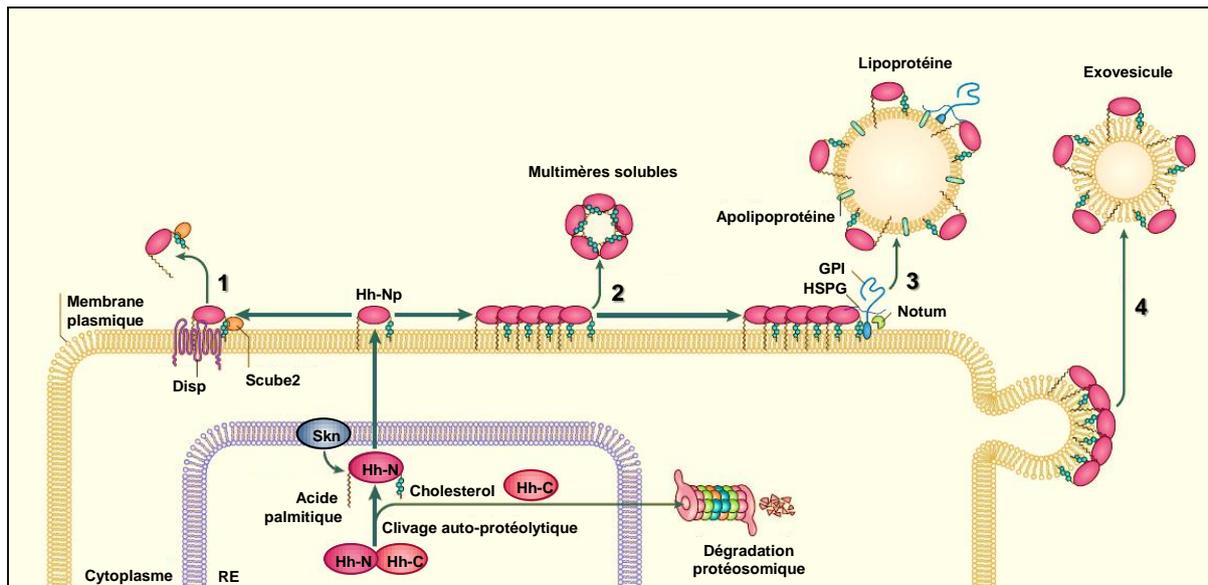


Figure 1 : Maturation et sécrétion de la protéine Hedgehog.

La maturation post-traductionnelle de la protéine Hedgehog (Hh) se déroule dans le réticulum endoplasmique (RE). Après l'hydrolyse du peptide signal, la partie C-terminale du précurseur (Hh-C) est libérée par autoprotéolyse et un groupement cholestérol est ajouté à l'extrémité C-terminale de Hh-N. L'acyltransférase Skinny hedgehog (Skn) ajoute enfin un acide palmitique à l'extrémité N-terminale de Hh-N alors que la protéine Hh-C est envoyée hors du RE pour être dégradée par le protéasome. (1) La protéine mature Hh-Np est sécrétée sous forme lipidique grâce à la protéine transmembranaire Dispatched (Disp), et à la protéine Scube2 qui se lie sur le groupement cholestérol de Hh-Np. (2) Les protéines Hh-Np sont capables de s'associer pour former des multimères solubles. (3) Les multimères peuvent également s'associer avec des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Les HSPG sont attachées à la membrane plasmique de la cellule par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et recrutent des lipoprotéines. Les protéines Hh-Np peuvent s'insérer aux lipoprotéines et la protéine Notum de type phospholipase-C permet la libération de Hh-Np en clivant l'ancre GPI de la membrane plasmique. (4) Alternativement, les protéines Hh-Np peuvent également être libérées à la surface d'exovésicules, d'après (Briscoe *and* Therond, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013).

La maturation de la protéine Hh prend fin avec l'addition d'un second groupement lipidique, un acide gras palmitique (Pepinsky *et al.*, 1998), sur la cystéine N-terminale de Hh-N grâce à l'activité de l'acyltransférase Hedgehog nommée Skn (Chen *et al.*, 2004a) ou Hhat (Buglino *et al.*, 2008) chez les vertébrés, et Ski chez la drosophile (Chamoun *et al.*, 2001). Cette modification confère à la protéine mature (Hh-Np) une activité 40 à 160 fois plus élevée que celle de la forme non palmitoylée (Buglino *et al.*, 2012). Ces modifications participent également à la réception et à l'amplitude du signal Hh car le groupement cholestérol permet l'ancrage du ligand à la membrane plasmique des cellules réceptrices et le groupement palmitate augmente l'internalisation de la protéine (Grover *et al.*, 2011).

1.2 Sécrétion et transport

Les caractéristiques lipophiles de Hh-Np, doublement lipidée, soulèvent des interrogations sur son potentiel de diffusion à travers un milieu extracellulaire hydrophile. Il existe des preuves expérimentales convaincantes en faveur de l'existence de plusieurs mécanismes de sécrétion et de transport de Hh-Np faisant intervenir d'autres protéines ; pour revue (Briscoe *et al.*, 2013).

La cellule productrice peut sécréter la protéine Hh-Np sous forme lipidique grâce à la protéine Dispatched (Disp), une protéine à 12 domaines transmembranaires (TM) qui présente un domaine senseur de stérols (SSD pour Sterol Sensing Domain) (Burke *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2002). Un SSD est aussi présent dans la protéine Patched (Ptc), le récepteur des protéines Hh-Np et la protéine Niemann-Pick Type C1 (NPC1) impliquée dans le transport du cholestérol (Burke *et al.*, 1999). Disp présente des homologies à la famille des transporteurs bactériens de type « Résistance, Nodulation, Division » (RND) qui utilisent un

gradient de protons pour transporter de petites molécules lipophiles à travers les bicouches membranaires (Ma *et al.*, 2002 ; Wong *et al.*, 2014). Disp et une glycoprotéine Scube2 se lient directement à des parties distinctes du groupement cholestérol de Hh-Np afin de protéger le groupement cholestérol de l'environnement aqueux, et de favoriser la libération de Hh-Np à la surface de la cellule (**Figure 1** ; (Creanga *et al.*, 2012 ; Tukachinsky *et al.*, 2012)).

Bien qu'étroitement associée à la membrane plasmique, la protéine Hh-Np est aussi capable d'agir à longue distance. Hh-Np se déplace par exemple de 50 μm dans le disque imaginal de l'aile chez la drosophile ou de 300 μm dans le bourgeon de membre chez le vertébré. Ces déplacements sont possibles grâce aux groupements cholestérol et palmitate qui favorisent l'association de Hh-Np avec des microdomaines membranaires riches en stérols et permettent la formation d'oligomères dont la structure, semblable aux micelles, facilite son action vers des cibles à longue distance (**Figure 1**). Les protéines Hh dépourvues de ces groupements ne sont pas capables de former des oligomères et d'agir à longue distance (Lewis *et al.*, 2001 ; Zeng *et al.*, 2001 ; Gallet *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004a ; Callejo *et al.*, 2006 ; Gallet *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2006 ; ; McLellan *et al.*, 2008). Par ailleurs, les oligomères peuvent s'associer avec des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Ces protéines sont attachées aux membranes plasmiques des cellules par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et semblent être responsables de la propagation de Hh-Np d'une cellule à l'autre. Les HSPG à la surface des cellules sécrétant Hh-Np recrutent des lipoprotéines en circulation afin de promouvoir leur association avec Hh-Np par des interactions entre leurs chaînes glycosaminoglycanes (GAG) (Panakova *et al.*, 2005 ; Eugster *et al.*, 2007). L'ancre GPI peut être clivée de la membrane plasmique par une protéine Notum de type phospholipase-C, permettant ainsi la libération et la propagation de

Hh-Np dans de grandes particules de lipoprotéines solubles (**Figure 1** ; (Sanders *et al.*, 2013)). Alternativement, la protéine Hh-Np peut également être libérée à la surface d'exovésicules. Chez la drosophile, les protéines du complexe ESCRT (pour endosomal sorting complex required for transport) sont nécessaires pour ce mode de sécrétion de la protéine Hh-Np dans le disque imaginal de l'aile (Matusek *et al.*, 2014) (**Figure 1** ; pour revue, (Therond, 2012)).

Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les mécanismes de sécrétion et de transport sont tissus-spécifiques ou s'ils reflètent la distance que doit parcourir la protéine Hh-Np jusqu'à sa cible.

2. Réception du signal Hh

La réception du signal Hh est assurée d'une part par le récepteur Ptc capable de lier le ligand Hh-Np et dont l'activité va réguler le récepteur Smoothened (Smo) par un mécanisme encore méconnu à ce jour, d'autre part le signal peut également être transmis par d'autres protéines membranaires capables d'interagir avec le ligand Hh-Np.

2.1 Patched

Le gène *Ptc* a initialement été identifié chez la drosophile (Hooper *et al.*, 1989 ; Ingham *et al.*, 1991 ; Capdevila *et al.*, 1994). Chez les mammifères, deux gènes homologues existent (*Ptc1* et *Ptc2* ; (Goodrich *et al.*, 1996 ; Carpenter *et al.*, 1998)). L'analyse des mutants pour chacun de ces gènes permet de comprendre leurs fonctions au sein de l'organisme et met en évidence des différences. Chez l'Homme, les mutations de *Ptc1* et *Ptc2*

sont associées au syndrome de Gorlin, un désordre autosomal dominant caractérisé par une prédisposition à l'apparition d'anomalies du développement et de tumeurs telles que des médulloblastomes (MB) au niveau cérébral, des carcinomes basocellulaires (BCC) au niveau de la peau ou encore des rhabdomyosarcomes (RMS) au niveau du muscle ((Hahn *et al.*, 1996) ; voir chapitre III). Les animaux hétérozygotes $Ptc1^{+/-}$ peuvent présenter des défauts développementaux de type polydactylie ou croissance anormale, ainsi que des médulloblastomes (Goodrich *et al.*, 1997). La mise en évidence de ces tumeurs a permis de caractériser *Ptc1* comme un gène suppresseur de tumeur. La mutation homozygote $Ptc1^{-/-}$ est létale au stade embryonnaire E9.5 et s'accompagne de défauts majeurs du développement des systèmes nerveux et cardiovasculaire. À l'inverse, les animaux $Ptc2^{-/-}$ sont viables et ne présentent pas de défaut développemental majeur. Cependant, lorsque des mutations de *Ptc1* et *Ptc2* sont associées, l'incidence des tumeurs est fortement accrue, suggérant un rôle de *Ptc2* dans la régulation de la prolifération cellulaire (Lee *et al.*, 2006). En accord avec cette hypothèse, l'inactivation de *Ptc2* chez le poisson-zèbre est associée à une prolifération cellulaire ectopique dans la couche nucléaire interne de la rétine contribuant à la dysplasie rétinienne observée chez le mutant (Bibliowicz *et al.*, 2011). La majorité des activités de Hh-Np passe donc par *Ptc1*, c'est pourquoi il est communément admis que l'abréviation Ptc fait référence à *Ptc1*.

2.1.1 Structure

Le récepteur Ptc est une protéine à 12 domaines TM possédant des domaines C- et N-terminaux, six boucles extracellulaires (ECL) et cinq boucles intracellulaires (ICL). La protéine Hh-Np se fixe au niveau des domaines extracellulaires de la première moitié du récepteur Ptc (Briscoe *et al.*, 2001) avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Marigo *et al.*,

1996 ; Stone *et al.*, 1996). Comme Disp, Ptc appartient à la superfamille des transporteurs « RND » et contient des résidus d'acides aspartiques dans son 4^e domaine TM qui semblent être importants pour l'échange de protons des perméases. Ptc possède également un domaine SSD. Le rôle de ce domaine est différent chez la drosophile et chez le mammifère. Des mutations du domaine SSD dans le 3^e et 6^e domaine TM de Ptc chez la drosophile altèrent totalement la fonction de la protéine (Strutt *et al.*, 2001) alors que les mutations correspondantes n'ont pas d'effets chez la souris (Johnson *et al.*, 2002). Toutefois, une mutation unique du SSD dans le 4^e domaine TM de Ptc est associée à un BCC chez un patient en accord avec l'effet de la mutation correspondante chez la drosophile qui engendre une activité dominante négative de Ptc (Hime *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que le SSD de Ptc est impliqué dans la régulation de Smo chez les vertébrés mais que, malgré l'homologie de séquence, le rôle de ces résidus spécifiques n'est pas le même chez la drosophile.

Le domaine C-ter de Ptc code pour des fonctions supplémentaires. Chez la drosophile, la délétion de la partie C-ter de Ptc affecte sa localisation et entraîne son accumulation aux membranes plasmiques. Chez les mammifères, la partie C-ter de Ptc sert au recrutement de la pro-caspase 9 et au déclenchement de l'apoptose en absence du ligand Hh (Mille *et al.*, 2009). La partie C-ter de Ptc contient également une séquence PPXY, qui permet la fixation de l'ubiquitine ligase Nedd4, et sa suppression rend le récepteur plus stable et à un niveau d'expression plus élevé dans la membrane plasmique. Différentes mutations de la partie C-ter du récepteur Ptc humain ont été identifiées dans des cancers (Lindstrom *et al.*, 2006).

2.1.2 Activité catalytique

Le mécanisme d'action par lequel Ptc inhibe Smo est à ce jour encore méconnu. La constatation que Ptc peut réprimer l'activation de Smo à des concentrations substoechiométriques, estimées à 1 pour 250, et le fait que Ptc et Smo ne soient pas systématiquement colocalisés à l'échelle de la cellule chez la drosophile (Denef *et al.*, 2000 ; Incardona *et al.*, 2002) ou que leurs profils d'expression ne soient pas superposables dans le cerveau de mammifère (Traiffort *et al.*, 1998) suggèrent fortement un mode d'action catalytique. Il a été proposé que Ptc puisse transporter une molécule qui régulerait l'activation de Smo. Le domaine SSD de Ptc pourrait être responsable d'un transport de composés stéroïdes de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule. Les travaux rapportant la régulation de Smo par des stéroïdes sont en accord avec cette hypothèse (Eaton, 2008 ; Wang *et al.*, 2010 ; Bidet *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012a). La vitamine D3 a également été proposée comme un régulateur négatif de l'activité de Smo (Bijlsma *et al.*, 2006) (voir chapitre IV). De plus, la notion de transporteur de stéroïdes pour la protéine Ptc a été proposée par l'observation d'une augmentation de l'efflux de cholestérol dans des cellules exprimant *Ptc1* (Bidet *et al.*, 2011). À ce jour, on ne sait toujours pas si la fonction de transporteur de stéroïdes de Ptc est impliquée dans la modulation du récepteur Smo.

2.2 Les corécepteurs : Cdo, Boc, Gas-1

La protéine Hh-Np ne se lie pas exclusivement à un seul récepteur. En effet, elle est capable de se lier à d'autres protéines de surface pour favoriser l'activation de la signalisation Hh ; pour revue (Beachy *et al.*, 2010). Ces corécepteurs forment des complexes multimoléculaires distincts avec Ptc et sont nécessaires pour une liaison de haute affinité avec

Hh-Np. Ils comprennent les protéines Cdo (Cam-related/down-Regulated by oncogenes) et Boc (Brother-of-Cdo) dont les orthologues chez la drosophile sont Ihog (Interférence Hedgehog) et Boi (Brother-of-Ihog), ainsi que la glycoprotéine Gas1 (Growth arrest specific 1). Cdo, Boc, Ihog et Boi sont des protéines comportant des domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig) et fibronectine de type III (FNIII), un domaine TM et une partie C-terminale intracellulaire, alors que Gas1 est une protéine liée à une GPI avec un domaine extracellulaire homologue aux récepteurs des facteurs neurotrophiques dérivés des cellules gliales (GDNF). Cdo et Ihog interagissent avec la protéine Hh-Np via leur domaine FNIII. Cependant, la cristallisation du complexe ligand/récepteur a permis de montrer deux modes de liaison de la protéine Hh-Np différents chez la drosophile et chez les vertébrés. Cdo fixe la protéine Hh-Np au niveau de son troisième domaine FNIII et son affinité est accrue en présence de calcium, alors que Ihog se fixe au niveau du site de liaison de l'héparine et du premier motif FNIII (McLellan *et al.*, 2008). Gas1, Cdo et Boc lient également Ptc pour former un complexe de récepteurs multimoléculaires qui facilite la transduction de la voie Hh. Des études chez la drosophile ont permis de montrer qu'Ihog serait inclus dans un complexe Ptc/Ihog/Hh dont la formation serait nécessaire à l'activation de la voie Hh faisant d'Ihog non seulement un corécepteur de Ptc, mais aussi un composant indispensable à la transduction du signal (Zheng *et al.*, 2010). En plus du récepteur Ptc, les co-récepteurs ont un rôle important pour l'activation de la signalisation Hh.

La voie de signalisation Hh est aussi régulée par les HSPG : ils facilitent et stabilisent l'interaction entre les protéines Hh-Np et Ptc ou Cdo/Boc, et prolongent ainsi la durée de l'activité signalisatrice du morphogène. Un domaine Cardin-Weintraub conservé sur les protéines Hh a été identifié comme responsable de l'interaction Hh/HSPG (Rubin *et al.*, 2002). Dans le cortex cérébelleux, cette interaction serait responsable de réponses spécifiques

en particulier de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires (GCP), alors qu'elle n'influencerait pas la différenciation cellulaire (Chan *et al.*, 2009). De plus, l'héparine est nécessaire pour la dimérisation de Ihog et pour son interaction à haute affinité avec Hh-Np chez la drosophile (McLellan *et al.*, 2006). Néanmoins, il n'y a pas de modèle clair pour expliquer comment les glycanes régulent la protéine Hh-Np. Il a été montré que certains types de glycanes favorisent l'interaction Hh-Ptc et la signalisation Hh, tandis que d'autres entrent en concurrence avec Ptc et inhibent la signalisation Hh (Yan *et al.*, 2009 ; Williams *et al.*, 2010 ; Yan *et al.*, 2010). Ainsi, la fonction spécifique de chaque HSPG reste à être précisément déterminée.

Enfin, la protéine Hh-Np est capable de se lier à la protéine apparentée au récepteur de la lipoprotéine basse densité 2 (LRP2), également connue sous le nom de mégaline et nécessaire pour la voie de signalisation Hh dans l'épithélium du cerveau antérieur. La mégaline pourrait être impliquée dans l'internalisation de Ptc (Christ *et al.*, 2012).

2.3 Hedgehog Interacting Protein

La protéine Hedgehog Interacting Protein (Hip) est un autre récepteur capable de lier la protéine Hh-Np avec une affinité de l'ordre du nanomolaire pour moduler négativement la voie de signalisation Hh (Chuang *et al.*, 1999). Comme Ptc, Hip est transcriptionnellement induit lors de l'activation de la voie Hh. Initialement identifiée chez l'embryon de souris, Hip ne possède aucun orthologue chez la drosophile. Sa structure contient un domaine N-terminal riche en cystéines (CRD), une région d'hélices- β , des motifs du type de ceux identifiés dans le facteur de croissance épidermique (EGF) et un domaine C-terminal hydrophobe qui permet sa fixation à la membrane cellulaire ; pour revue (Beachy *et al.*, 2010). Une forme soluble de

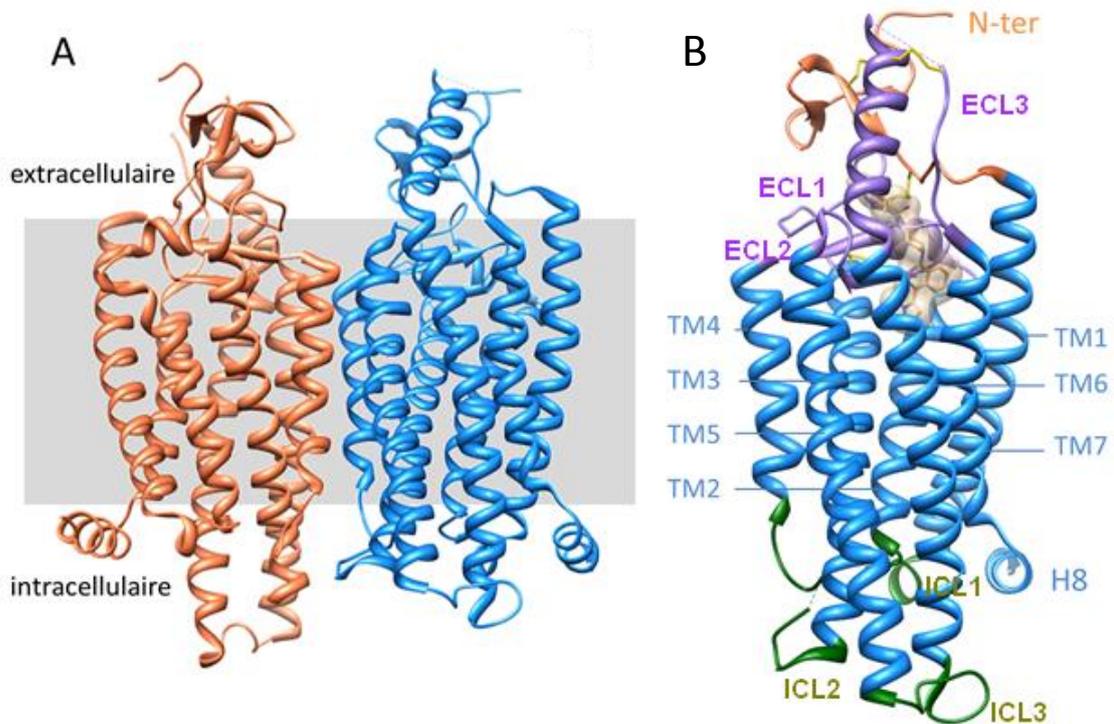


Figure 2 : Structure cristallographique du récepteur Smoothened.

A. Structure cristallographique du dimère du récepteur Smoothened humain (hSmo). Le monomère A est représenté en bleu et le monomère B en orange. Les contours d'une membrane cellulaire sont représentés en gris. B. Structure du monomère : hSmo présente une structure prototypique d'un récepteur couplé aux protéines G à sept hélices transmembranaires (TM1-7, bleu), un domaine amino-terminal extramembranaire (orange), trois boucles extracellulaires (ECL1-3, violet), trois boucles intracellulaires (ICL1-3, vert), et une huitième hélice (cyan) carboxy-terminale. Pour des raisons d'ingénierie moléculaire, la partie amino-terminale a été partiellement tronquée afin de favoriser la cristallisation de la protéine dans un environnement lipidique. L'anticancéreux LY2940680 est représenté au niveau de sa poche de liaison (surface jaune transparente) localisée au niveau de la face externe des 7 TM. hSmo montre néanmoins une très grande particularité dans la structure 3D des segments extracellulaires, notamment un réseau de quatre ponts disulfures (bâtons jaunes) contribuant à rigidifier la structure du récepteur et à tapisser le haut du site de reconnaissance des antagonistes, d'après (Ruat, Hoch et al, Med Sci, 2013).

Hip a aussi été mise en évidence dans le système nerveux de rongeurs adultes (Coulombe *et al.*, 2004). La cristallisation de Hip seule ou complexée à Hh-Np a permis de montrer que les sites d'interaction de Hip et Cdo avec Hh étaient identiques (Bishop *et al.*, 2009).

3. Transduction du signal

3.1 Smoothened

La liaison de la protéine Hh-Np au récepteur Ptc entraîne la levée de l'activité inhibitrice que Ptc exerce sur le récepteur Smo. Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont permis d'améliorer les techniques de cristallisation des RCPG et d'augmenter le nombre d'élucidation de structures tridimensionnelles des protéines TM. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la troisième ICL du récepteur $\beta 2$ adrénergique a grandement contribué à améliorer la stabilité de ce récepteur et a permis sa cristallisation (Rasmussen *et al.*, 2007 ; Day *et al.*, 2007). Le remplacement de la troisième ICL par le lysozyme T4 a également permis d'augmenter la stabilité de ce récepteur (Rosenbaum *et al.*, 2007). L'utilisation de cette stratégie a conduit à la cristallisation de nombreux autres RCPG ; pour revue (Milic *et al.*, 2015). La première cristallisation de Smo a confirmé son appartenance à la famille des RCPG, et plus particulièrement à la classe F des RCPG (**Figure 2**), comme le récepteur Frizzled (Fzd) de la voie de signalisation des protéines d'interaction à Wingless (Wnt) (Wang *et al.*, 2013a) ; et pour revue (Ruat *et al.*, 2013). Smo possède trois principaux domaines, le domaine extracellulaire (ECD ou partie N-terminale), le domaine TM et le domaine intracellulaire (partie C-terminale).

3.1.1 Partie N-terminale

La partie N-terminale de Smo se compose d'un CRD et d'un long domaine de liaison extracellulaire. La structure du CRD n'a pas totalement été élucidée lors de la cristallisation du récepteur Smo humain car 190 acides aminés ont été clivés et remplacés par une protéine BRIL permettant la stabilisation du récepteur lors de sa cristallisation (Wang *et al.*, 2013a). Néanmoins, des interactions ont été mises en évidence entre le domaine de liaison de l'ECD et les ECL du domaine TM par un réseau de ponts disulfures et de liaisons hydrogène. Il existe ainsi un pont entre les cystéines C193 et C213 présentes dans la partie aminotermine ; un deuxième entre les cystéines C217 et C295, entre l'ECD et l'ECL1 ; un troisième pont reliant les cystéines C314 et C390 localisées au niveau de l'ECL1 et de l'ECL2, respectivement ; et enfin, un quatrième pont entre les cystéines C490 et C507 situées dans l'ECL3. Les résidus cystéines qui forment les ponts disulfures et maintiennent la liaison entre l'ECD et les ECL du récepteur Smo sont hautement conservés dans le récepteur Fzd. La cristallisation d'une partie du CRD du récepteur Smo de poisson-zèbre a permis de mettre en évidence un domaine globulaire compact, contenant quatre hélices alpha et deux courtes boucles bêta, et très ressemblant à celui du récepteur Fzd (**Figure 3** ; (Nachtergaele *et al.*, 2013)).

3.1.2 Domaine transmembranaire

Le domaine TM de Smo est composé de sept hélices hydrophobes TM connectées par trois ECL et trois ICL. Il contient le site de liaison des principaux antagonistes de Smo actuellement en phase clinique (**Figure 2** ; voir chapitre IV). Le domaine TM de Smo, et de tous les récepteurs Fzd, présente une homologie de séquence

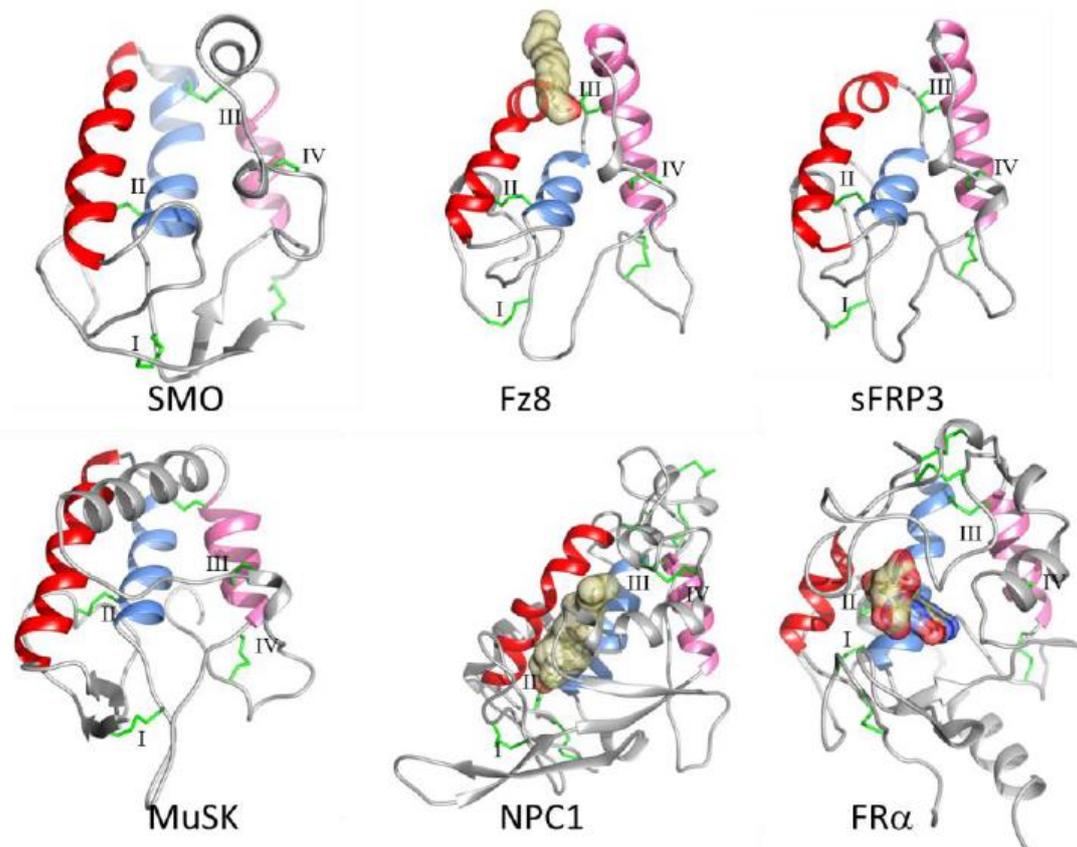


Figure 3 : Homologie structurale des ECD de six protéines différentes.

Les protéines Smoothened (Smo, PDB ID 4C7A), Frizzled 8 (Fz8, PDB ID 4F0A), la protéine 3 apparentée à Frizzled (sFRP3, PDB ID 1IJX), la kinase spécifique du muscle (MuSK, PDB ID 3HKL), la protéine de Niemann-Pick C1 (NPC1, PDB ID 3GKI), et le récepteur du folate α (FR α , PDB ID 4LRH) possèdent une homologie structurale de leur ECD. Trois hélices (α -1, rouge ; α -2, bleue ; α -3 ; rose) délimitent la cavité (surface jaune transparente) où le ligand (représenté en bâton) se fixe. Un ensemble de quatre ponts disulfures (I-IV) est conservé et rigidifie la structure du domaine ECD, d'après (Rognan *and* Mus-Veteau, *Topics in Medicinal Chemistry*, 2015).

assez faible avec les domaines TM des RCPG de la classe A : il ne possède pas, par exemple, de motif D[E]RY rencontré dans l'hélice III de ces derniers. Cependant, la comparaison de la structure cristallographique de Smo avec celle des récepteurs de la classe A, précédemment déterminée, fait apparaître une conservation spatiale relativement élevée, comme l'orientation de l'hélice VIII parallèle à la surface intracellulaire de la membrane plasmique. Il existe pourtant des différences notables qui concernent notamment les résidus proline impliqués dans l'activation des récepteurs de la classe A (Katritch *et al.*, 2013) et localisés dans les hélices V, VI et VII (P^{5.50}, P^{6.50} et P^{7.50}) (**Figure 4**). L'absence de ces résidus à ces positions dans le domaine TM de Smo suggère que le mouvement de ces hélices, lors de l'activation, est le résultat de contraintes mettant en jeu d'autres acides aminés qui pourraient être des résidus glycine présents dans ces hélices.

Smo présente également des ECL particulièrement longues comparées à celles des RCPG de la classe A. Avec le domaine connectant l'ECD au domaine TM, les boucles ECL forment un chapeau recouvrant le site de liaison de l'antagoniste. L'ECL1 est partagée en deux segments distincts délimités par un pont disulfure, alors que l'ECL2 est positionnée à l'intérieur de la cavité formée par les sept domaines TM (7TM) et interagit directement avec l'antagoniste, participant très largement à la poche de liaison. En accord avec cette hypothèse, des résistances liées à des mutations dans l'ECL2 du récepteur Smo de rongeur ont été observées après des traitements par un inhibiteur de Smo, le composé LDE225 (voir chapitre IV). L'ECL3, la plus longue des trois boucles, forme une protrusion à partir des 7TM dans l'espace extracellulaire. L'hélice du TM6 semble ainsi se prolonger, alors qu'un pont disulfure pourrait participer à la rigidité de la structure. L'ECL3 interagit aussi directement avec plusieurs résidus de l'ECD. L'intégrité de la structure formée par les ECL1-3 est vraisemblablement essentielle pour maintenir Smo dans une conformation inactive.

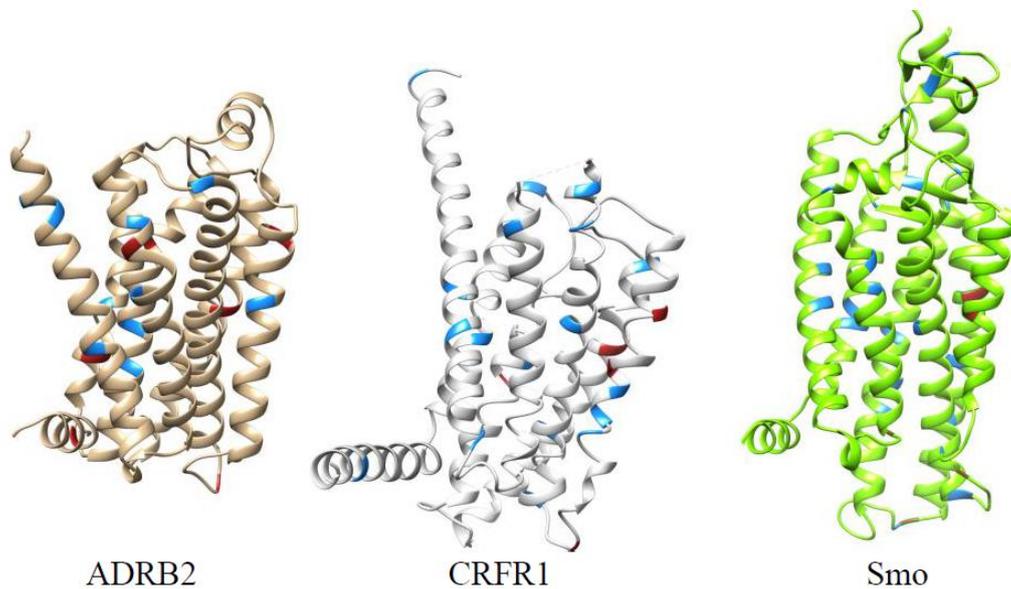


Figure 4 : Comparaison des structures 3D de RCPG de classe A, B et F.

Le récepteur humain β_2 adrénergique est un RCPG de classe A (ADRB2, PDB ID 2RH1, marron), le récepteur 1 de l'hormone de libération de la corticotropine est un RCPG de classe B (CRFR1, PDB ID 4K5Y, blanc), et le récepteur Smoothened est un RCPG de la classe F (Smo, PDB ID 4JKV, vert). Bien qu'il y ait une conservation spatiale élevée entre ces trois classes de récepteurs, il existe des différences notables concernant la position des résidus proline et glycine représentés en rouge et bleu, respectivement, d'après (Rognan *and* Mus-Veteau, *Topics in Medicinal Chemistry*, 2015).

3.1.3 Partie C-ter

La partie C-terminale du récepteur Smo est longue et possède à son commencement une hélice (nommée H8) participant à l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique. D'autres rôles ont également été décrits pour cette hélice comme la liaison du ligand (Ahn *et al.*, 2010), le couplage aux protéines G (Delos Santos *et al.*, 2006), la phosphorylation du récepteur (Awwad *et al.*, 2010), le recrutement de la β -arrestine (Kirchberg *et al.*, 2011) et l'internalisation du récepteur (Aratake *et al.*, 2012). Lorsque la voie de signalisation Hh est inactive, le domaine C-terminal de Smo est ubiquitinilé ce qui entraîne l'internalisation du récepteur par endocytose (Li *et al.*, 2012).

Lorsque la voie est activée, il a été montré qu'une dé-ubiquitine USP8 est induite et réduit l'ubiquitination de Smo (Xia *et al.*, 2012). La phosphorylation du domaine C-terminal de Smo par la protéine kinase 2 associé à un RCPG (GRK2) et la protéine kinase caséine 1 (CK1) est ensuite requise pour l'activation de Smo, son interaction avec la β -arrestine et sa translocation dans le cil primaire (Chen *et al.*, 2004b ; Kovacs *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011b). GRK2 phosphoryle de nombreux RCPG au niveau de leurs domaines C-terminaux lorsqu'ils acquièrent leurs formes actives. GRK2 est recrutée par la sous-unité $G\beta\gamma$ dissociée de la protéine G hétérotrimérique (Chen *et al.*, 2010), supportant l'idée que Smo se couple à une protéine G lors de son activation (voir partie 3.1.5). Une étude élégante démontre que les sites de phosphorylation de GRK2 et CK1 sont conservés entre la drosophile et les vertébrés (Chen *et al.*, 2011b).

3.1.4 Le récepteur Smo forme un dimère

Le récepteur Smo cristallise sous forme d'un dimère asymétrique (**Figure 2**), bien que la différence entre les deux protomères soit faible, avec des interfaces mettant en jeu les hélices IV et V, ce qui a été aussi observé pour le récepteur CXCR4 (Wu *et al.*, 2010). De nombreux RCPG s'associent pour former des dimères, voire des oligomères. Ces études, très souvent réalisées dans des cellules eucaryotes surexprimant ces récepteurs, sont particulièrement nombreuses et ont permis de mieux appréhender le rôle de chaque protomère lors de l'activation ou de l'inactivation de ces récepteurs, comme dans le cas des récepteurs de la classe C des RCPG (Ruat *et al.*, 2004 ; Kniazeff *et al.*, 2012). Les données concernant l'existence physiologique et le rôle fonctionnel de ces dimères sont cependant relativement peu nombreuses. Des études avec le récepteur Smo dont la partie ECD a été clivée (Smo Δ ECD) ont été réalisées chez la drosophile (Zhao *et al.*, 2007 ; Rana *et al.*, 2013) et les vertébrés (Aanstad *et al.*, 2009 ; Myers *et al.*, 2013 ; Nachtergaele *et al.*, 2013 ; Nedelcu *et al.*, 2013). Chez la drosophile, le récepteur Smo Δ ECD est inactif et ne parvient pas à se dimériser suggérant que l'ECD gouverne la dimérisation. Chez les vertébrés, le récepteur Smo Δ ECD est actif et accumulé au niveau du cil primaire, suggérant que l'ECD réprime la translocation du récepteur dans le cil primaire (voir partie 3.2.3). La coexpression du récepteur Ptc inhibe l'accumulation de Smo Δ ECD dans le cil, suggérant que la répression de Smo par Ptc n'intervient pas au niveau de l'ECD. De plus, le récepteur Smo Δ ECD reste sensible au composé de synthèse agoniste SAG qui se lie au domaine TM, suggérant que l'ECD n'est pas requis pour la liaison et la réponse à cet agoniste (Nachtergaele *et al.*, 2013). Néanmoins, l'activation du récepteur Smo Δ ECD suite à l'ajout du ligand Hh est plus faible, suggérant que l'ECD est nécessaire pour que Smo soit pleinement activé en réponse à Hh.

L'ECD possède donc un rôle dans la localisation cellulaire du récepteur Smo et est essentiel pour la réponse au ligand Hh.

Des expériences de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET, fluorescence resonance energy transfer) ont également permis de mettre en évidence la proximité spatiale de deux récepteurs Smo (Shi *et al.*, 2011). La protéine Smo de vertébrés forme aussi des dimères en culture cellulaire. Il conviendra de déterminer si la formation de tels dimères, voire d'oligomères qui ont aussi été décrits (Zhao *et al.*, 2007 ; Shi *et al.*, 2013), participe aux phénomènes de coopérativité observés dans des expériences pharmacologiques (Hadden, 2013).

3.1.5 Couplage aux protéines G

Malgré le fait que Smo n'ait pas de ligand endogène, des travaux démontrent de façon évidente que Smo, comme tous les RCPG, active des protéines G hétérotrimériques, ce qui déclenche ensuite l'activation de seconds messagers (**Figure 5**) ; pour revue, (Riobo, 2015).

Lors de son activation, Smo est capable de stimuler l'échange de GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate) de tous les membres de la famille des protéines G inhibitrices (G_{i1-3} , G_0 et G_z). Lorsque Smo est inactif, sa partie C-terminale empêche partiellement l'interaction avec les protéines G_i , comme le démontre une étude où la délétion de la partie C-terminale de Smo augmente la liaison de $GTP\gamma[S^{35}]$. Cette étude suggère que, lors de son activation, Smo modifie sa conformation pour augmenter ses interactions avec les protéines G_i . Le couplage de Smo aux protéines G_i a été montré dans différents modèles *in vitro* chez la drosophile et chez les vertébrés (Riobo, 2015).

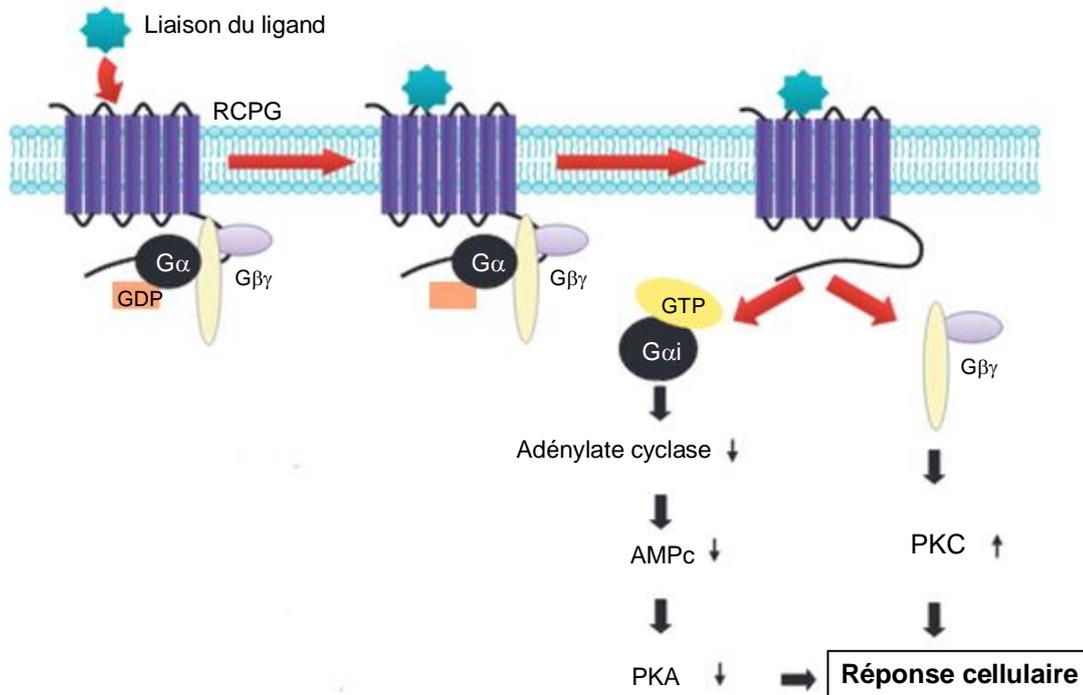


Figure 5 : Signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G.

Suite à l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) par la liaison d'un ligand, le RCPG recrute et active une protéine G hétérotrimérique en catalysant l'échange GDP/GTP au niveau de sa sous-unité α . Ceci conduit à la dissociation de la protéine G. Dans le cas des protéines G_i , la sous-unité α_i réprime l'enzyme adénylate cyclase et donc la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), conduisant à la répression de l'activité enzymatique de la protéine kinase A (PKA). Les autres sous-unités ($\beta\gamma$) peuvent également réguler des cascades de signalisations secondaires, comme celle conduisant à l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui régule diverses réponses cellulaires, d'après (Miyano *et al.*, J Pharmacol Sci, 2014).

L'utilisation de la toxine pertussique (PTX) a permis de démontrer que l'activation de la transcription des gènes *Gli* dans les cellules fibroblastiques NIH3T3, mésenchymateuses C3H10T1/2 ou dans les cardiomyocytes est sensible à l'inhibition des protéines Gi (Shen *et al.*, 2013). En effet, l'activité ADN-ribosyl transférase de la PTX utilise la sous-unité α de la protéine Gi comme substrat ce qui empêche son interaction avec le RCPG. Dans d'autres types de cellules, comme les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), le couplage Smo-Gi n'est pas essentiel pour la voie Hh canonique et la raison reste encore inexpliquée (Polizio *et al.*, 2011a). Dans les cellules embryonnaires S2 de drosophile, la délétion des protéines Gi par l'utilisation de siRNA a permis de montrer que le couplage Smo-Gi est impliqué dans l'activation de la voie de signalisation Hh chez les invertébrés (Ogden *et al.*, 2008). De plus, l'observation d'une diminution des taux intracellulaires d'AMPc après l'activation de la voie de signalisation Hh dans ces cellules renforce l'idée d'un couplage de Smo avec une protéine Gi (Ogden *et al.*, 2008). *In vivo*, une protéine Gi constitutivement active est capable d'induire de manière ectopique l'activation de la voie de signalisation Hh (Ogden *et al.*, 2008).

En revanche, chez les vertébrés, l'existence du couplage Smo-Gi reste encore discutable *in vivo*. En effet, bien que l'injection de PTX dans des embryons de poisson-zèbre induise une cyclopie, une absence de spécification ventrale du cerveau antérieur et une expansion du sclérotome caractéristiques des animaux *Shh*^{-/-}, le résultat reste difficile à interpréter (Hammerschmidt *et al.*, 1998). En revanche, l'utilisation de la PTX et de siRNA dirigés contre les protéines $G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$ et $G_{\alpha i3}$ a permis de montrer que le couplage de Smo-Gi est nécessaire pour la prolifération des GCP du cervelet de raton (Barzi *et al.*, 2011). De plus, l'expression de protéines $G_{\alpha i2}$ et $G_{\alpha i3}$ constitutivement actives potentialise la prolifération des GCP induite par la voie de signalisation Hh (Barzi *et al.*, 2011). À l'inverse, l'injection de

PTX ne modifie pas la spécification de cellules induites par la voie de signalisation Hh dans le tube neural de poulet, suggérant que les protéines Gi ne sont pas nécessaires à la signalisation Hh (Low *et al.*, 2008). Il faut noter que le système nerveux exprime la protéine G_z insensible à la PTX puisqu'elle ne possède pas de résidu cystéine dans son domaine N-terminal nécessaire à l'ADP-ribosylation de la PTX. Cette protéine appartient à la famille des protéines Gi et pourrait être à l'origine de ces résultats discordants. Par conséquent, le mécanisme précis du couplage de Smo à une protéine Gi reste donc ambigu chez les vertébrés.

Par ailleurs, le récepteur Smo de vertébrés peut également se lier à d'autres protéines G hétérotrimériques telles que G₁₂ ou G₁₅ (Kasai *et al.*, 2004 ; Masdeu *et al.*, 2006). Cependant, ces couplages ne sont pas observés dans tous les modèles utilisés. Ainsi, le couplage entre le récepteur Smo et les protéines G₁₂ et G₁₅ n'est pas observé dans les cellules NIH3T3. Néanmoins, les sous-unités α des protéines G₁₃, et dans une moindre mesure G_q et G₁₂, sont capables de réguler l'activité des facteurs de transcription Gli, suggérant ainsi un mécanisme de régulation indépendant de Smo (Douglas *et al.*, 2011). Le couplage artificiel de Smo avec la sous-unité G α 15 a pu être mis en évidence dans les cellules HEK293 par une augmentation de l'accumulation d'inositol phosphate suivie par l'incorporation d'inositol tritié ([³H]inositol) (Masdeu *et al.*, 2006). Ce couplage artificiel de Smo avec la sous-unité G α 15 s'est par ailleurs révélé être un très bon outil pour le criblage de petites molécules agonistes ou agonistes inverses de Smo (Masdeu *et al.*, 2006 ; Manetti *et al.*, 2010).

3.2 Signalisation intracellulaire : voie canonique

La voie de signalisation Hh dite « canonique » est considérée comme active lorsque l'inhibition que Ptc exerce sur Smo est levée suite à la fixation de Hh-Np sur Ptc et conduit à

une cascade de signalisations intracellulaires mettant notamment en jeu, chez les vertébrés, les facteurs de transcription Gli (Gli1, Gli2, Gli3) ; pour revue, (Ruiz i Altaba *et al.*, 2007).

3.2.1 Les facteurs de transcription Gli

Les trois facteurs de transcription Gli possèdent cinq domaines à doigts de zinc leur permettant de se lier à l'ADN ainsi qu'un domaine transactivateur en C-terminal, mais seuls Gli2 et Gli3 ont un domaine répresseur en N-terminal qui peut être libéré par autoprotéolyse. Après translocation dans le noyau, les facteurs de transcription Gli se lient via leurs domaines à doigts de zinc à des séquences spécifiques, appelées « élément répondant à Gli » pour induire ou réprimer la transcription de gènes spécifiques de la prolifération et de la différenciation cellulaire ; pour revue, (Ruiz i Altaba *et al.*, 2007). L'activation transcriptionnelle est essentiellement liée à l'activité de Gli2 alors que la répression transcriptionnelle est principalement liée à Gli3. En effet, en absence du ligand Hh-Np, Gli2 et Gli3 sont phosphorylés et ubiquitinylés pour être adressés au protéasome où ils sont clivés sous leur forme répressive dans le cas de Gli3 (GliR), soit complètement dégradés dans le cas de Gli2 (Ruiz i Altaba *et al.*, 2007). De façon intéressante, les facteurs de transcription Gli possèdent un signal de localisation nucléaire et un signal d'exportation nucléaire dans leur séquence. Le traitement protéolytique que subit Gli3 élimine son signal d'exportation nucléaire, ce qui renforce sa rétention dans le noyau (Hatayama *et al.*, 2012). En présence de Hh-Np, Gli2 et Gli3 ne sont pas clivés. La forme longue de Gli2 est un activateur transcriptionnel, tandis que la forme longue de Gli3 est très rapidement dégradée par le protéasome (Wen *et al.*, 2010). Contrairement à Gli2 et Gli3, Gli1 n'est pas clivé et fonctionne comme un activateur transcriptionnel permettant d'amplifier le niveau de

signalisation Hh. Gli1 est une cible transcriptionnelle de la voie Hh canonique utilisée pour suivre le niveau d'activation de cette voie.

3.2.2 *Le cil primaire*

Le cil primaire est une fine protrusion d'environ 1-5 μm de longueur présente à la surface de la majorité des cellules chez les vertébrés (**Figure 6**) (Bettencourt-Dias *et al.*, 2011 ; Louvi *et al.*, 2011). Il est constitué d'une membrane ciliaire entourant un axonème composé de neuf paires de microtubules (structure 9+0) contrairement au cil motile qui possède un doublet supplémentaire. Le cil primaire n'est présent à la surface des cellules qu'en phase de quiescence puisque les centrioles qui composent le corps basal de l'axonème sont nécessaires à la division cellulaire.

Cette structure sert d'antenne à la cellule et permet de capter de nombreux signaux extérieurs en regroupant des récepteurs membranaires. C'est le corps basal qui agit comme une zone d'ancrage pour un grand nombre de protéines péricentriolaires. Les fibres de transition, situées entre le corps basal et l'axonème, créent une barrière perméable entre le cil et le reste de la cellule. Le long de l'axonème est mise en place une machinerie permettant le transport bidirectionnel de complexes protéiques. Ce système de transport intraflagellaire (IFT) est possible notamment grâce à des protéines motrices, nommées kinésines pour le transport antérograde et dynéines pour le transport rétrograde. Le cil primaire est le siège de différentes voies de signalisation dont les voies du développement Hh et Wnt et d'autres voies régulées par les facteurs de croissance dont, par exemple, les voies Notch et PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) ; pour revue, (Ruat *et al.*, 2012 ; Fry *et al.*, 2014).

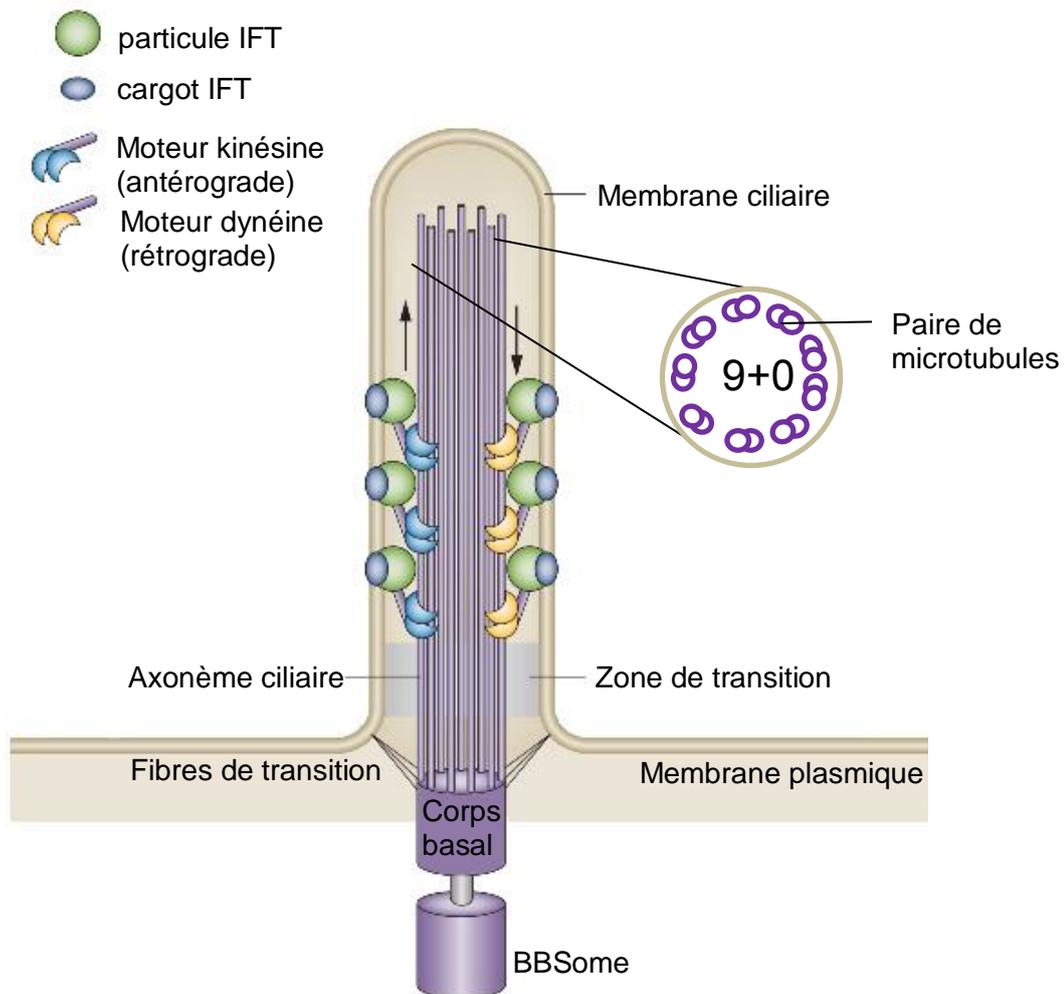


Figure 6 : Structure du cil primaire.

Le cil primaire est composé d'un axonème ciliaire formé de neuf doublets de microtubules (structure 9+0), d'une membrane ciliaire et d'un corps basal. Les fibres de transition forment une barrière perméable entre le cil et le reste de la cellule. Les protéines cargo sont transportées par des particules IFT de haut en bas du cil grâce aux moteurs kinésine et dynéine qui se déplacent le long de l'axonème. Le BBSome régule le transport et l'assemblage des particules IFT sur l'axonème, adapté de (Valente *et al.*, Nat Rev Neurol, 2014).

3.2.3 Voie de signalisation Hedgehog au niveau du cil primaire

Smo, Ptc, les facteurs de transcription Gli et le régulateur négatif Suppressor of Fused (Sufu) ont été détectés dans le cil primaire (Corbit *et al.*, 2005 ; Haycraft *et al.*, 2005 ; Huangfu *et al.*, 2006 ; Rohatgi *et al.*, 2007). Shh a été identifié près de la base du cil primaire de progéniteurs neuronaux dans le tube neural de poulet en développement (Chamberlain *et al.*, 2008). En absence du ligand Hh-Np, Ptc est localisé à la base du cil primaire et inhibe la signalisation Hh en maintenant Smo hors du cil par un mécanisme encore inconnu (**Figure 7**). Les facteurs de transcription Gli forment un complexe avec la protéine kinésine Kif7. Le régulateur négatif Sufu se lie aux facteurs de transcription Gli et réprime leur translocation dans le noyau. Sufu se lie à l'extrémité N-terminale des facteurs de transcription Gli par une interaction avec son domaine C-terminal alors que son domaine N-terminal interagit avec la partie C-terminale des facteurs Gli. La liaison des deux sites est nécessaire pour la répression des facteurs Gli. En plus de cette activité de rétention des facteurs Gli, Sufu favorise leur phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase glycogène synthase (GSK3 β). L'activité constitutive de GPR161, un RCPG qui induit une augmentation d'AMPc au cil primaire, conduit également à l'activation de la PKA. Les facteurs de transcription Gli sont phosphorylés par ces kinases, ubiquitinylés puis clivés par le protéasome sous leurs formes répressives (GliR). Les facteurs GliR inhibent la transcription des gènes cibles de la voie Hh en se liant à l'ADN dans le noyau.

La liaison de Hh-Np à Ptc entraîne simultanément la translocation de Ptc au cytoplasme et la translocation de Smo dans le cil (**Figure 7**). La translocation de Smo au cil nécessite la β -arrestine qui favorise l'interaction de Smo avec la protéine kinésine Kif7 et régule donc l'entrée du récepteur dans l'organelle (Kovacs *et al.*, 2008).

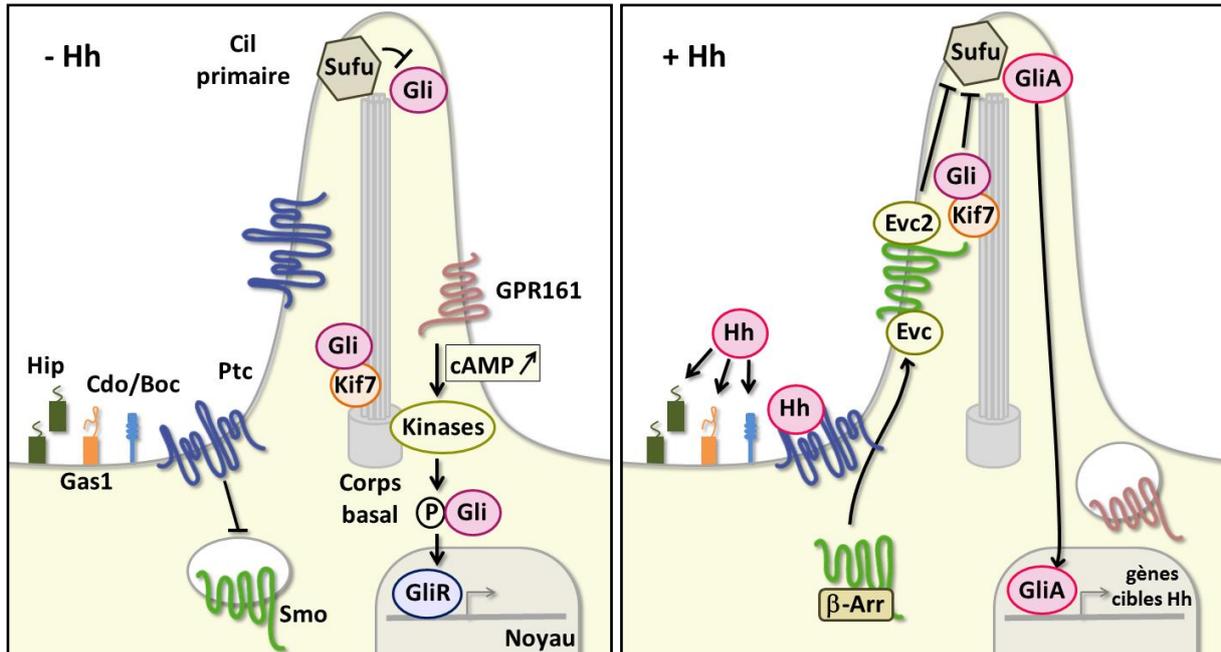


Figure 7 : Signalisation Hedgehog au cil primaire.

En absence du ligand Hh (-Hh), le récepteur Patched (Ptc), localisé dans le cil primaire, inhibe le récepteur Smoothed (Smo) principalement localisé hors du cil, par un mécanisme inconnu. Les facteurs de transcription Gli forment un complexe avec la protéine de moteur antérograde de type-kinesine Kif7. Les facteurs de répression tels que la protéine Suppressor of Fused (Sufu) et les kinases dont la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase glycoène synthase 3 β favorisent respectivement l'hydrolyse et la phosphorylation des facteurs Gli. L'activité constitutive de GPR161, induit une augmentation d'AMPc au cil primaire qui permet l'activation de la PKA. Ces événements conduisent à la génération de formes répressives de facteurs Gli (GliR) et à l'inhibition des gènes cibles de la voie Hh. Hip, un régulateur négatif de la voie existant sous une forme soluble ou associé à la membrane, peut également lier Hh. Gas1, Cdo et Boc sont des protéines qui lient également Hh et sont considérées comme des régulateurs positifs de la voie Hh. En présence du ligand Hh (+ Hh), l'inhibition de Ptc sur Smo est levée. Smo est transloqué dans la membrane du cil primaire en interagissant avec le β -arrestine et en association avec le complexe Evc-Evc2. Smo permet l'inhibition de Sufu et la conversion des facteurs de transcription Gli sous leurs formes actives (GliA). GliA entre dans le noyau et active la transcription des gènes cibles de la voie Hh tels que *Ptc* et *Gli1*, d'après (Ruat, Hoch *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2014).

Il a été montré que Smo pouvait également rejoindre le cil primaire par un transport latéral (Milenkovic *et al.*, 2009). Smo est phosphorylé et activé par les protéines kinases GRK2 et CK1 (Chen *et al.*, 2011b). Kif7 permet le transport et la localisation de Smo au sommet du cil (Shi *et al.*, 2011). La découverte de l'interaction de Smo avec les protéines ciliaires Evc et Evc2 dans un compartiment bien défini en haut du cil, a permis de mettre en évidence que la formation de ce complexe est indispensable pour la dissociation du complexe Gli-Sufu, la phosphorylation des facteurs Gli et leur conversion en formes activatrices (GliA) (Yang *et al.*, 2012). Les protéines Evc et Evc2 ont été découvertes dans deux types de ciliopathies où l'absence de ces protéines est vraisemblablement responsable d'une absence de la voie de signalisation Hh (Dorn *et al.*, 2012). Après leur activation, les facteurs GliA entrent dans le noyau, qui est normalement accolé au corps basal (Hui *et al.*, 2011), et activent la transcription des gènes cibles de la voie Hh tels que *Ptc* et *Gli1* qui induisent les processus de prolifération et de différenciation cellulaire.

3.3 Voies non canoniques

Outre la voie Hh canonique décrite ci-dessus, des voies de signalisation Hh non canoniques ont été mises en évidence au niveau du cil primaire ou dans le cytoplasme, et induisent des réponses rapides et indépendantes de la transcription des gènes Gli (**Figure 8** et **Figure 9** ; pour revue, (Ruat *et al.*, 2014 ; Riobo, 2015)).

3.3.1 Voies Hedgehog non canoniques de type 1

Des activités de Ptc indépendantes de la répression de Smo ont récemment été décrites. Ptc a été identifié comme un récepteur à dépendance, permettant de contrôler la survie ou la

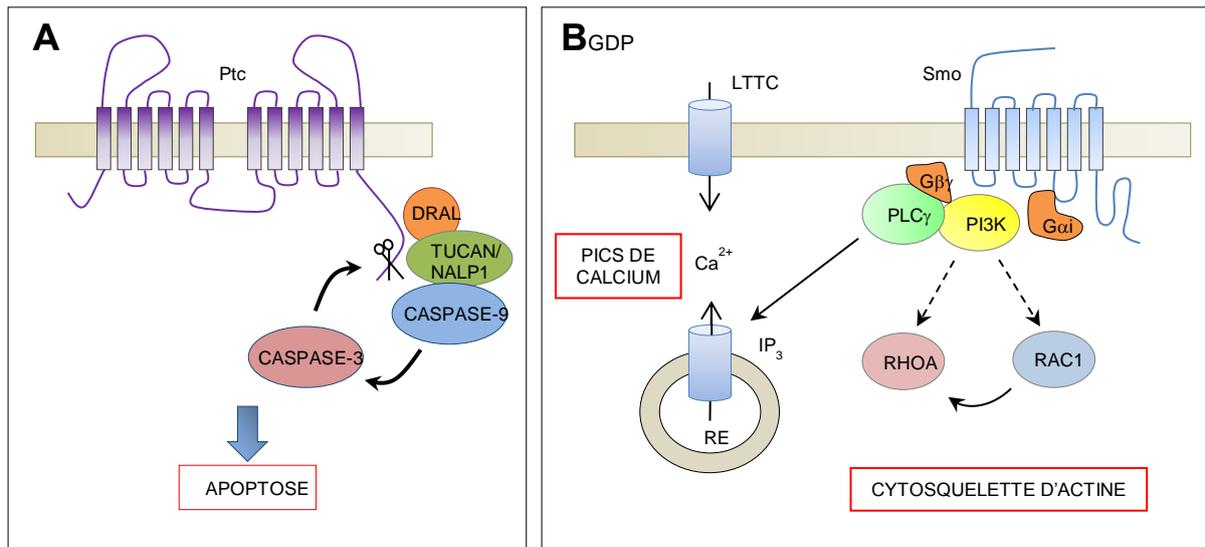


Figure 8 : Exemples de voies de signalisation Hedgehog non canoniques.

A. Signalisation Hedgehog (Hh) non canonique de type I. En l'absence du ligand Hh, Patched (Ptc) recrute un complexe pro-apoptotique qui comprend la protéine adaptatrice Dral, la protéine Tucan-1 et la caspase-9. L'activation de la caspase-9 est suivie par l'activation de la caspase-3 qui amplifie le signal de mort cellulaire en clivant une région régulatrice de l'apoptose de Ptc. B. Signalisation Hh non canonique de type II. L'activation de Smo conduit à la dissociation de la protéine Gi en sous-unités G α i et G β γ , et conduit à l'activation de la PI3K et des petites GTPases RhoA et Rac1 qui régulent le cytosquelette d'actine. La production de PI3K stimule la phospholipase C- γ (PLC- γ) et permet la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique (RE), d'après (Riobo, *Topics in Medicinal Chemistry*, 2015).

mort cellulaire en fonction de la présence ou non du ligand Hh-Np (Thibert *et al.*, 2003 ; Bredesen *et al.*, 2004). En absence des ligands Hh-Np, la surexpression de Ptc induit l'apoptose de cellules HEK293 en culture et de cellules neuroépithéliales du tube neural de poulet cultivées *ex vivo* (Thibert *et al.*, 2003). Cette activité est liée à la présence, sur la séquence C-terminale de Ptc, d'un motif clivable par les caspases, puis à la translocation nucléaire du fragment clivé qui modulerait alors les facteurs de transcription de la voie (**Figure 8**). Cette activité est indépendante des autres composantes de la voie Hh canonique. La surexpression de Smo n'a pas d'effet sur la mort cellulaire de ces cellules (Thibert *et al.*, 2003). En accord avec ces résultats, la présence de Hh-Np dans les cellules endothéliales permet la survie cellulaire et réduit l'activation de la caspase-3 (Chinchilla *et al.*, 2010). L'effet de Hh-Np sur la survie des cellules endothéliales est insensible aux inhibiteurs de Smo et ne peut être imité par des agonistes de Smo tels que le SAG, suggérant que l'inhibition de la fonction pro-apoptotique de Ptc est indépendante de Smo (Chinchilla *et al.*, 2010). D'autres études ont montré que Ptc induit l'apoptose par le recrutement d'un complexe pro-apoptotique impliquant la protéine DRAL (downregulated in rhabdomyosarcoma LIM-domain protein), la caspase-9 et la protéine TUCAN-1 (Mille *et al.*, 2009).

3.3.2 Voies *Hedgehog* non canoniques de type 2

L'activation de Smo peut également avoir un rôle indépendant de son effet sur l'activation des facteurs de transcription Gli. Plusieurs voies Hh non canoniques de type 2 ont été proposées et sont sensibles aux agonistes et antagonistes de Smo (**Figure 9**).

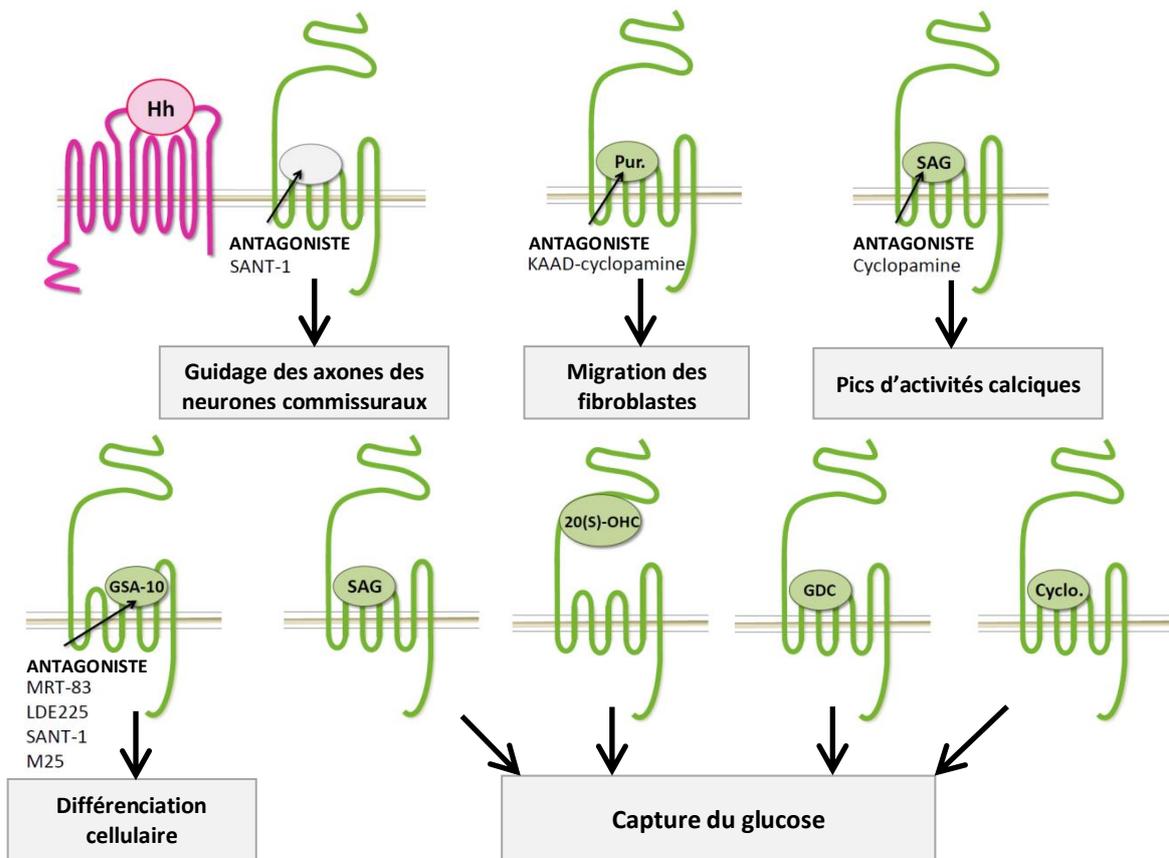


Figure 9 : Régulation des voies de signalisation Hedgehog non canoniques par les modulateurs de Smoothened.

Les protéines Hh et les ligands de Smo, le SAG, la Purmorphamine (Pur.), le GSA-10, le 20(S)-hydroxycholestérol (20(S)-OHC), le GDC-0449 (GDC) et la Cyclopamine (Cyclo.) induisent des réponses cellulaires par des voies de signalisation Hh non canoniques. La stimulation de la famille des Src kinases par les ligands Hh est impliquée dans l'attraction des axones des neurones commissuraux de la moelle épinière en quelques minutes, ce qui suggère un mécanisme non transcriptionnel (Yam *et al.*, 2009). La Pur. induit la migration de fibroblastes par de petites GTPases, Rac1 et RhoA (Polizio *et al.*, 2011). Le SAG stimule des pics d'activités calciques dans le cil primaire des neurones post-mitotiques de la moelle épinière en développement (Belgacem and Borodinsky, 2011 ; Belgacem and Borodinsky, 2015). Le GSA-10 stimule Smo pour induire la différenciation cellulaire par un mécanisme qui n'implique ni l'augmentation de la transcription des gènes *Ptc* et *Gli1*, ni la translocation de Smo dans le cil primaire (Gorojankina, Hoch *et al.*, 2013). Différents antagonistes de Smo sont capables de bloquer ces réponses cellulaires. Le SAG induit, par l'intermédiaire d'une protéine kinase activée par l'AMP (Ampk), dépendante du Ca^{2+} , et la voie des protéines Gai, une absorption rapide de glucose dépendante du cil primaire (Teperino *et al.*, 2012). Le 20(S)-OHC et deux antagonistes de la voie Hh canonique (le GDC et la Cyclo.) ont des propriétés agonistes envers cette réponse, d'après (Ruat, Hoch *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2014).

3.3.2.1 Régulation du cytosquelette d'actine

L'activation de Smo par l'inhibition de la répression exercée par Ptc, ou directe par un agoniste, induit un réarrangement majeur du cytosquelette d'actine dans des cellules endothéliales, des neurones, des cellules stellaires pancréatiques ou des fibroblastes en culture (Kanda *et al.*, 2003 ; Bijlsma *et al.*, 2007 ; Shinozaki *et al.*, 2008 ; Yam *et al.*, 2009 ; Chinchilla *et al.*, 2010 ; Polizio *et al.*, 2011a ; Polizio *et al.*, 2011b ; Bijlsma *et al.*, 2012 ; Yam *et al.*, 2012 ; Razumilava *et al.*, 2014). Les modifications du cytosquelette précèdent la motilité cellulaire, les changements morphologiques ou le guidage axonal. Dans les fibroblastes, Smo favorise la mobilité et la migration, à la fois aléatoire et directionnelle vers un gradient de Shh (Bijlsma *et al.*, 2007 ; Polizio *et al.*, 2011a ; Polizio *et al.*, 2011b ; Bijlsma *et al.*, 2012). La migration de fibroblastes en réponse à Shh est rapide et incompatible avec la mise en jeu d'une régulation transcriptionnelle. De plus, elle n'est pas inhibée par la forme répressive de Gli3. L'activation de Smo dans ces cellules engage des petites GTPases, Rac1 et RhoA par un mécanisme nécessitant les protéines Gi et PI-3K (Polizio *et al.*, 2011a ; Polizio *et al.*, 2011b) (**Figure 8** et **Figure 9**). En revanche, le cil primaire et la translocation de Smo dans le cil ne sont pas indispensables pour cette voie non canonique (Bijlsma *et al.*, 2012).

La modulation du cytosquelette d'actine par des ligands Hh a également été rapportée dans des cellules endothéliales en culture (Chinchilla *et al.*, 2010). Les trois ligands Hh induisent la formation de fibres de stress dans les cellules endothéliales et stimulent la tubulogénèse dans des cultures 3D via RhoA et Rac1 (Kanda *et al.*, 2003 ; Chinchilla *et al.*, 2010). Dans les cellules étoilées, Ihh améliore la migration cellulaire par une voie non canonique indépendante de *Gli1* (Shinozaki *et al.*, 2008). De plus, dans une lignée cellulaire

de cholangiocarcinome, caractérisée par une absence du cil primaire et par une réduction marquée de la signalisation Hh canonique, l'activation directe de Smo par la purmorphamine (un agoniste de Smo) induit un remodelage du cytosquelette d'actine avec la formation de filopodes et de lamellipodes (Razumilava *et al.*, 2014). Comme décrits pour les autres types cellulaires, la migration et le remodelage du cytosquelette d'actine des cellules de cholangiocarcinome sont sensibles à l'inhibition des protéines Gi (Razumilava *et al.*, 2014). Il a également été montré un rôle de Shh sur le guidage des axones des neurones commissuraux (qui sera décrit dans le chapitre II) mettant en jeu la voie de signalisation des Src kinases (**Figure 9**), de façon Smo-dépendante et selon une échelle de temps de l'ordre de la minute, c'est-à-dire également incompatible avec la mise en jeu d'une régulation transcriptionnelle (Charron *et al.*, 2005 ; Yam *et al.*, 2009).

3.3.2.2 Régulation des niveaux de calcium

La protéine Shh est capable de déclencher des pics d'activités calciques dans le cil primaire des neurones post-mitotiques de la moelle épinière en développement afin de réguler la différenciation neuronale (**Figure 8**). Cet effet peut être mimé ou bloqué respectivement par un agoniste ou un antagoniste de Smo (**Figure 9**). Cette activité est sensible à l'action de la PTX, indiquant la mise en jeu d'une protéine hétérotrimérique de type Gi (Belgacem *et al.*, 2011). Très récemment, il a été décrit que cette voie de signalisation Hh non canonique bloque la voie de signalisation Hh canonique. En effet, l'activité électrique inverse l'action de Shh sur les facteurs de transcription Gli au cours du développement de la moelle épinière (Belgacem *et al.*, 2015). L'inhibition de l'activité des facteurs Gli par Shh se produit à plusieurs niveaux. Shh induit une localisation cytosolique de Gli2 et, par le recrutement de la

protéine CREB et de la PKA, induit l'hydrolyse de Gli2 et Gli3 sous leurs formes répressives. Les facteurs GliR répriment ainsi la transcription de *Gli1*.

Le métabolisme cellulaire au niveau du muscle et du tissu adipeux, notamment la capture du glucose indépendante de l'insuline, a été relié à une activité du récepteur Smo. La réponse met en jeu une voie Hh non canonique associant le récepteur Smo, le calcium intracellulaire et la protéine kinase activée par l'AMP (Ampk) dans le cil primaire (Teperino *et al.*, 2012). Il a été montré que les agonistes mais également les antagonistes de Smo (dont la cyclopamine et le GDC-0449) induisant une translocation de Smo au niveau du cil primaire dans ce type cellulaire, permettaient une entrée de calcium et la capture de glucose (**Figure 9** ; (Teperino *et al.*, 2012)). La nouvelle fonction de certains inhibiteurs de la voie Hh canonique comme agonistes de ce type de signalisation non canonique est sans précédent et nécessite une caractérisation plus poussée. Néanmoins, ces effets pourraient expliquer certains effets secondaires des inhibiteurs de Smo utilisés en clinique pour le traitement de cancers, comme les spasmes musculaires et des amaigrissements extrêmes (Proctor *et al.*, 2014).

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation Hh non canonique induite par un agoniste de Smo, le GSA-10, qui a été découvert et caractérisé dans notre laboratoire (Gorojankina *et al.*, 2013). En effet, le GSA-10 induit la différenciation cellulaire des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 par un mécanisme qui n'implique ni l'augmentation de la transcription des gènes *Ptc* et *Gli1*, ni la translocation de Smo dans le cil primaire (**Figure 9**).

II. Rôle physiologique de la voie de signalisation Shh dans le système nerveux

La voie de signalisation Shh joue un rôle fondamental au cours de multiples étapes de l'embryogenèse, permettant le développement et la mise en place de nombreux organes et tissus. Dans ce chapitre, je décrirai le rôle physiologique de la voie de signalisation Shh dans le système nerveux en développement et chez l'adulte afin de mieux comprendre les applications thérapeutiques potentielles de la modulation de cette voie de signalisation.

1. Voie de signalisation Shh et développement du système nerveux central

1.1 Mise en place de la moelle épinière ventrale

La voie de signalisation Shh joue un rôle majeur dans la spécification des cellules du tube neural chez les vertébrés. Le tube neural est le tissu embryonnaire à l'origine de la moelle épinière adulte et à partir duquel différentes populations de neurones sont générées. Au cours du développement embryonnaire, la spécification cellulaire qui a lieu dans ce tissu est contrôlée par des profils d'expression de facteurs de transcription rigoureusement bien définis dans le temps et dans l'espace ; pour revue, (Dessaud *et al.*, 2008). Depuis le stade embryonnaire E9.5 jusqu'au stade E18.5, ces profils s'organisent sous l'influence des gradients de concentration de divers morphogènes. La protéine Shh transmet son signal à partir de la région la plus ventrale du tube neural. Shh est sécrétée au niveau de la notochorde et de la plaque du plancher et établit un gradient de concentration au travers de toute l'épaisseur du tube neural selon un axe dorso-ventral et équivalent sur les côtés gauche et droit de la moelle épinière en développement (**Figure 10** ; (Echelard *et al.*, 1993 ; Roelink *et al.*, 1994)).

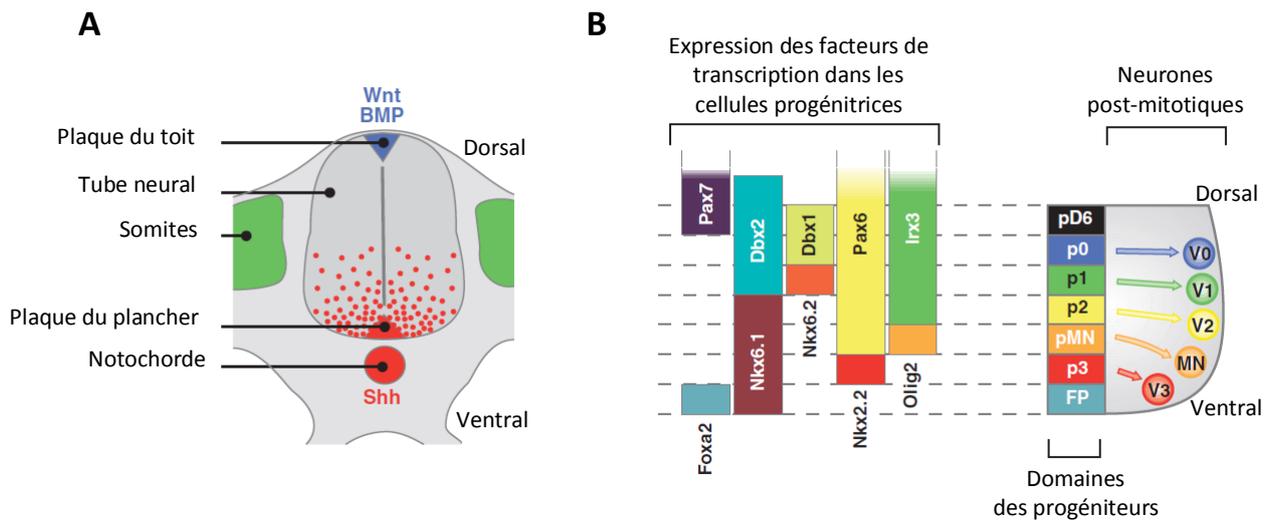


Figure 10 : Rôle de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans le développement du tube neural.

A. La protéine Shh (en rouge) est sécrétée par la notochorde et la plaque du plancher, et les protéines BMP et Wnt sont sécrétées par la plaque du toit (en bleu). La propagation de Shh permet l'établissement d'un gradient d'activité ventro-dorsal (points rouges). B. Le gradient de concentration de Shh contrôle l'identité et la position des progéniteurs neuraxiaux en fonction d'un ensemble de facteurs de transcription. Ceux-ci comprennent par exemple Pax7, Pax6 et Irx3, qui sont réprimés par la voie de signalisation Shh, et Dbx1, Dbx2, Nkx6.1, Olig2, Nkx2.2 et Foxa2, qui nécessitent la signalisation de Shh pour leur expression. La réponse différentielle de ces gènes à la voie de signalisation Shh établit des limites d'expression ventro-dorsales distinctes pour chaque facteur. L'expression combinatoire des facteurs de transcription définit des domaines de progéniteurs neuraxiaux (p0, p1, p2, pMN, p3) à l'origine de différentes populations d'interneurones ventraux et de motoneurones, d'après (Dessaud *et al.*, Development, 2008).

Le gradient de concentration de Shh a été visualisé grâce à l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le promoteur de Shh. Shh s'est révélé étroitement associé au corps basal du cil primaire (Chamberlain *et al.*, 2008). La réception du signal est médiée par les récepteurs Ptc et Hip qui modulent l'amplitude de la réponse en fonction de la concentration de ligand perçue, mais aussi de la durée d'exposition, ce qui permet de générer des populations cellulaires distinctes à partir du même tissu embryonnaire (Jeong *et al.*, 2005 ; Dessaud *et al.*, 2010). L'identité positionnelle et la différenciation cellulaire font intervenir les facteurs de transcription Gli qui permettent le contrôle de l'expression des gènes cibles de la voie. Les cibles de la voie de signalisation Shh sont des facteurs de transcription de la famille des protéines à homéodomaines subdivisées en deux groupes appelés protéines de type I (par exemple Pax6, Pax7, Irx3 ou Dbx1) et protéines de type II (Nkx2.2 et Nkx6.1). En fonction des niveaux d'expression de ces facteurs, Shh permet l'établissement de cinq domaines de progéniteurs (p0, p1, p2, pMN et p3) à l'origine de différentes populations d'interneurones ventraux et de motoneurones (**Figure 10**). La spécification de la partie ventrale du tube neural subit également l'influence des facteurs morphogènes dorsaux, notamment des protéines BMP (Bone Morphogenetic Proteins) et Wnt qui s'opposent à l'activité de Shh (Alvarez-Medina *et al.*, 2008).

1.2 Développement des oligodendrocytes

La voie de signalisation Shh est également impliquée dans la spécification et le développement ultérieur des oligodendrocytes (OL), les cellules gliales responsables de la myélinisation des axones ; pour revue, (Fuccillo *et al.*, 2006). Les progéniteurs oligodendrocytaires (OLP) sont générés dans le domaine des progéniteurs pMN du tube neural et l'aire entopédonculaire du télencéphale ventral (Poncet *et al.*, 1996 ; Pringle *et al.*,

1996 ; Orentas *et al.*, 1999). La production des OLP débute au stade E12.5 chez la souris. Dans le domaine des progéniteurs pMN, cette étape suit immédiatement la formation des motoneurones au stade E10.5. C'est le contrôle du niveau d'expression du ligand de la voie de signalisation Notch, Jagged2, par Shh, qui permet la production de deux types cellulaires différents à partir du domaine de progéniteurs pMN (Rabadan *et al.*, 2012). De plus, la sulfatase 1, un régulateur des HSPG, contrôle également cette étape de transition en activant la voie de signalisation Shh dans une sous-population des OLP pour favoriser leur différenciation cellulaire aux dépens des motoneurones (Touahri *et al.*, 2012). L'induction par Shh des gènes Olig1 et Olig2 codant pour des protéines de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix) est l'étape clef de la spécification oligodendrocytaire (Lu *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2000). Des souris doublement invalidées pour Olig1 et Olig2 ne possèdent pas d'OL au stade E18.5, indiquant que ces deux gènes sont nécessaires pour la formation des OL (Lu *et al.*, 2002 ; Zhou *et al.*, 2002). Les souris mutantes pour la protéine à homéodomaines Nkx2.1 perdent la totalité des marqueurs oligodendrocytaires et l'expression de Shh dans une grande partie du télencéphale, à l'exception de la région de l'amygdale qui continue à exprimer Shh avec cette mutation (Nery *et al.*, 2001 ; Tekki-Kessarar *et al.*, 2001). La surexpression de Shh à l'aide d'un rétrovirus permet une réapparition des cellules oligodendrocytaires, confirmant que Shh est suffisant pour induire leur spécification (Nery *et al.*, 2001). En accord avec le rôle de la voie de signalisation Shh dans l'oligodendrogenèse, l'étude de souris invalidées pour le récepteur Smo dans les précurseurs neuroépithéliaux exprimant la nestine au stade embryonnaire E12.5 montre une diminution significative du nombre d'OL au niveau ventral chez l'embryon, mais aussi une réduction de 30 % du niveau global de la myélinisation cérébrale au stade postnatal P15 (Machold *et al.*, 2003). Il a également été montré que la présence du facteur de croissance FGF (Fibroblast Growth Factor) était nécessaire pour l'action de Shh sur les OL. En effet, le FGF est capable d'induire la différenciation

oligodendrocytaire dans des cultures de néocortex indépendamment de la voie de signalisation Shh, mais Shh ne peut induire cette différenciation en absence de FGF (Gabay *et al.*, 2003 ; Kessarlis *et al.*, 2004).

1.3 Guidage axonal

Le guidage axonal permet aux axones en cours d'élongation de se diriger jusqu'à leur cible synaptique notamment grâce aux cônes de croissance. Le principe élémentaire du guidage axonal repose sur la chémoattraction et la chémorépulsion. Il a été montré que la voie de signalisation Shh participe au guidage axonal des neurones de la rétine et de la moelle épinière. Le rôle de la voie de signalisation Shh a d'abord été mis en évidence au niveau des neurones rétiniens qui traversent la ligne médiane au niveau du diencephale ventral où ils forment le chiasma optique (Trousse *et al.*, 2001). Des mutations des différents membres de la voie en aval de Shh perturbent la trajectoire des neurones rétiniens (Trousse *et al.*, 2001). Chez le poisson-zèbre, il a été montré que Shh limite l'expression de différentes protéines répulsives qui entravent le passage des axones rétiniens (Strahle *et al.*, 1997). Plus récemment, le corécepteur de Shh, Boc, s'est révélé être nécessaire à la ségrégation des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (Fabre *et al.*, 2010). Le morphogène Shh sécrété par la plaque du plancher a également été identifié comme un chémoattractant sur les axones des neurones commissuraux du tube neural (Charron *et al.*, 2003). L'invalidation spécifique de Smo, par des outils génétiques ou pharmacologiques, perturbe la trajectoire des axones en direction de la partie ventrale du tube neural, démontrant clairement que cet effet d'orientation est médié par un mécanisme Smo-dépendant. Des travaux ultérieurs chez des souris Boc^{-/-} ont permis de montrer que le corécepteur Boc est également requis pour l'activité chémoattractive de Shh (Okada *et al.*, 2006). Comme précédemment mentionné,

cette réponse implique un mécanisme de signalisation non canonique via l'activation de la voie des Src kinases (Yam *et al.*, 2009).

D'autres études ont suggéré que Shh possède également une activité chémoréulsive sur les axones post-commissuraux, immédiatement après leur traversée de la ligne médiane de la plaque du plancher, afin qu'ils progressent le long de l'axe longitudinal du tube neural (Bourikas *et al.*, 2005). Cette activité n'est pas médiée par les récepteurs Ptc et Smo, mais par la protéine Hip exprimée par les axones post-commissuraux dans une fenêtre de temps compatible avec l'activité observée. L'utilisation d'un ARN Hip interférant dans un explant de poulet empêche les axones post-commissuraux d'être redirigés le long de l'axe longitudinal (Bourikas *et al.*, 2005). Il a été montré que le changement de direction des axones post-commissuraux était lié à une régulation intrinsèque de l'expression de la protéine 14-3-3 par ces axones au niveau de la ligne médiane du tube neural (Yam *et al.*, 2012).

1.4 Régulation des cellules précurseurs du cervelet

Le cervelet est une partie de l'encéphale située sous le cerveau et en arrière du tronc cérébral. Il traite les informations qu'il reçoit de la moelle épinière et du cerveau nécessaires aux fonctions motrices, et permet notamment la coordination des mouvements et le maintien de l'équilibre.

La voie de signalisation Shh joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire et postnatal du cervelet. L'expression de Shh est détectable dès le stade embryonnaire E17 dans les cellules de Purkinje (PC) (Corrales *et al.*, 2004) et persiste au-delà de la première semaine de vie postnatale (Traiffort *et al.*, 1999). Au stade prénatal, Shh induit la différenciation des cellules de la glie de Bergmann, une population de cellules de

type astrogial entourant les PC. À la naissance, Shh permet l'établissement de la couche interne du cervelet (**Figure 11**). Les précurseurs des cellules granulaires (GCP), originaires de la lèvre rhombique à proximité de la zone ventriculaire, prolifèrent abondamment dans la couche granulaire externe (EGL) du cervelet en réponse aux signaux mitogènes provenant de Shh sécrétée par les PC (Wechsler-Reya *et al.*, 2001). L'expression de Ptc, Smo et des facteurs de transcription Gli1-3 a été détectée dans ces couches cellulaires (Dahmane *et al.*, 1999 ; Traiffort *et al.*, 1999 ; Wallace, 1999 ; Wechsler-Reya *et al.*, 1999). Après cette période de prolifération dépendante de Shh, les GCP deviennent insensibles aux signaux mitogéniques, quittent le cycle cellulaire, commencent à se différencier en neurones granulaires matures et migrent de la couche EGL à travers la couche des cellules de Purkinje pour former la couche granulaire interne (IGL).

Il a été suggéré que lorsque la voie de signalisation Shh est constitutivement activée, en raison de mutations oncogéniques dans les gènes de la voie, quelques GCP ne parviennent plus à quitter le cycle cellulaire au moment approprié et restent dans la couche EGL. Ainsi, la prolifération de ces GCP continue et peut conduire au développement de MB.

2. Voie de signalisation Shh dans le cerveau adulte

Dès 1998, l'identification par notre équipe de cellules exprimant les ARNm de Shh ou ceux des protéines membranaires Ptc, Smo et Hip dans de nombreuses structures cérébrales chez le rongeur adulte a suscité un intérêt considérable (Traiffort *et al.*, 1998), et de nouvelles fonctions de la voie de signalisation Shh dans le système nerveux central adulte sont apparues progressivement ; pour revue (Ruat *et al.*, 2015a).

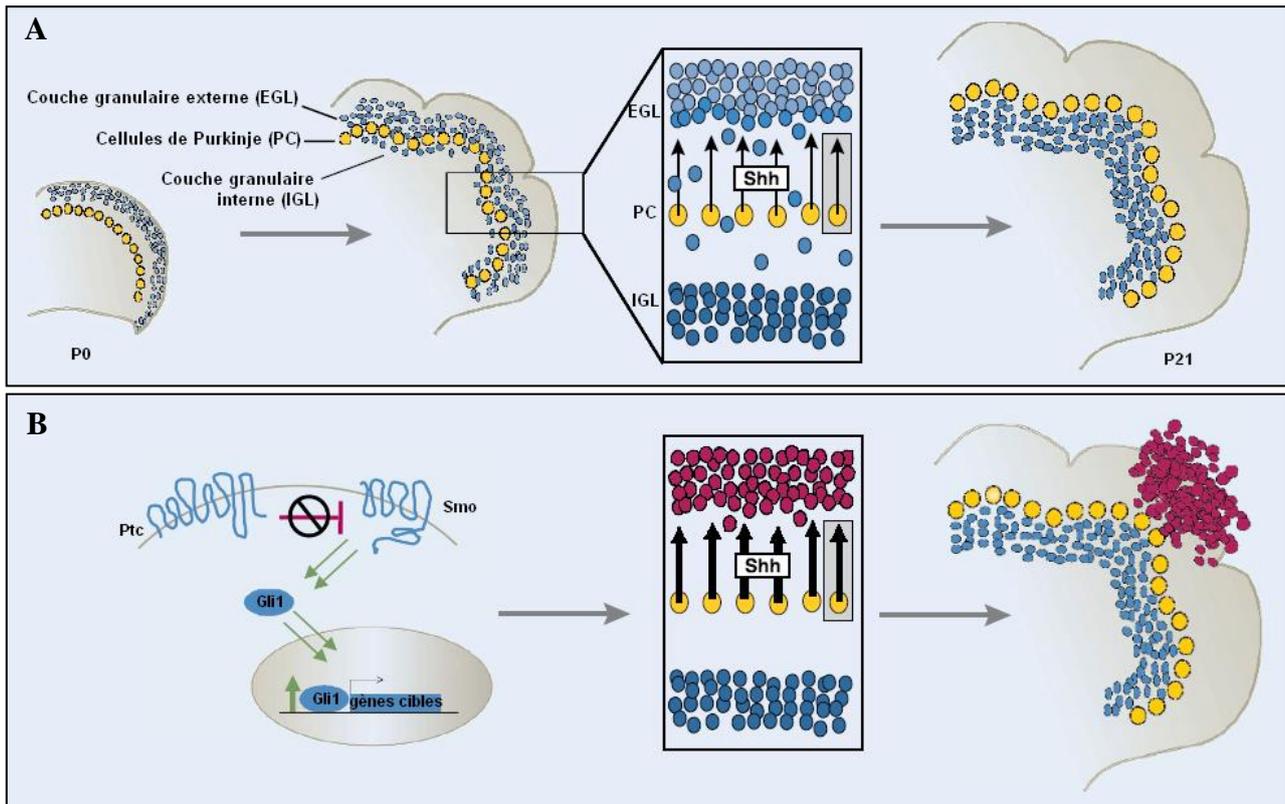


Figure 11 : Régulation des cellules précurseurs du cervelet par la voie de signalisation Sonic Hedgehog.

A. La protéine Shh sécrétée par les cellules de Purkinje (PC) induit la prolifération des précurseurs des cellules granulaires (GCP) dans la couche germinative externe (EGL). Après cette période de prolifération, les GCP deviennent insensibles aux signaux mitogéniques, quittent le cycle cellulaire, se différencient, et migrent pour former la couche granulaire interne (IGL) (P21, chez la souris). B. Un médulloblastome peut survenir lorsqu'un GCP ne parvient pas à sortir du cycle cellulaire et qu'il continue de proliférer dans l'EGL. Des mutations somatiques des différentes composantes de la voie Shh, telles que Ptc et Smo peuvent contribuer à l'apparition de médulloblastomes sporadiques et des mutations germinales du gène Ptc sont associées au syndrome de Gorlin, d'après (Romer *and* Curran, Cancer Res, 2005).

2.1 Régulation de la maintenance des cellules souches

Les découvertes de ces dernières années ont permis de démontrer que la voie de signalisation Shh participe à la mise en place et au maintien des niches neurogéniques adultes et contrôle la prolifération des précurseurs neuronaux ou gliaux dans plusieurs zones du cerveau ; pour revue (Ruat *et al.*, 2015a). Les deux aires de neurogèneses adultes sont la zone sous-ventriculaire (ZSV) des ventricules latéraux (VL) et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe (**Figure 12**). Dans des conditions pathologiques définies, les cellules nouvellement générées dans ces aires peuvent migrer vers une zone lésée (Silva-Vargas *et al.*, 2013). De plus, la modification des propriétés des cellules souches représente un espoir pour le traitement des maladies neurodégénératives. Il est donc crucial de mieux comprendre les facteurs qui contrôlent leur prolifération, leur différenciation et leur migration et de développer des outils tels que des molécules de synthèse permettant de contrôler leur activité.

2.1.1 Zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux

La ZSV qui borde les VL est constituée de plusieurs types cellulaires : les cellules souches de nature astrogliale à division lente sont par définition capables de s'autorenouveler mais aussi de donner naissance à des précurseurs transitoires à amplication rapide qui représentent les progéniteurs des neuroblastes. Ces derniers migrent le long du courant de migration rostrale pour atteindre le bulbe olfactif (BO) où ils se différencient en neurones fonctionnels et s'intègrent au réseau local (**Figure 12**).

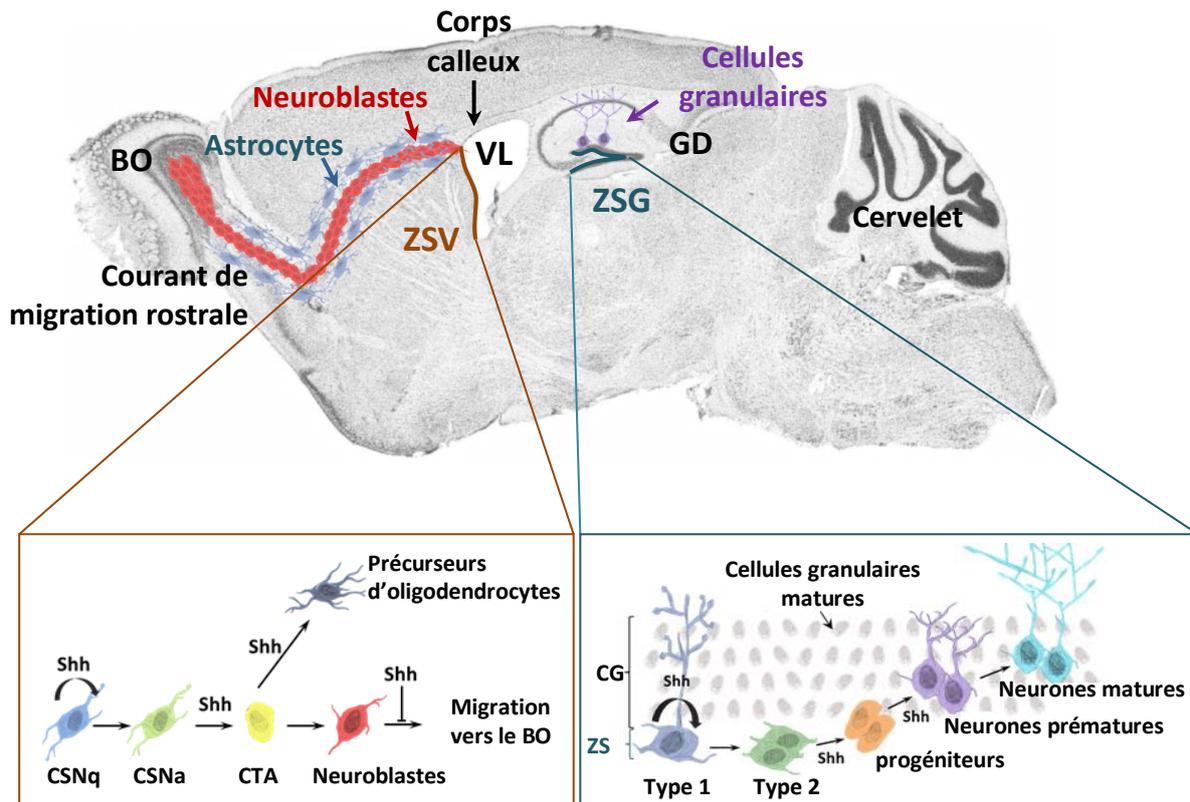


Figure 12 : Les aires de neurogénèse du cerveau adulte de rongeur.

La zone sous-ventriculaire (ZSV), qui borde les ventricules latéraux (VL), se compose de cellules souches neurales (CSN) capables de s'autorenouveler et dites quiescentes (CSNq), ou de CSN actives (CSNa) donnant naissance aux cellules transitoires à amplification rapide (CTA) qui produisent elles-mêmes les précurseurs neuraux (neuroblastes) qui migrent le long du courant de migration rostrale jusqu'au bulbe olfactif (BO), où les neuroblastes se différencient et s'intègrent dans les circuits neuronaux impliqués dans l'olfaction. Shh peut également réguler le nombre de précurseurs d'oligodendrocytes dérivées de la ZSV. Dans la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe, les CSN radiales (type 1) se divisent de façon asymétrique et donnent naissance aux CSN non-radiales (type 2) qui produisent elles-mêmes les progéniteurs neuraux. Les progéniteurs se différencient en cellules matures qui intègrent la couche granulaire (CG) et sont impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. Coupe saggitale d'un cerveau de rongeur adulte au niveau des aires de neurogénèse, d'après (Ruat *et al.*, *Topics in Medicinal Chemistry*, 2015).

Différentes études portant sur l'identification et la distribution des différentes composantes de la voie de signalisation Shh, comme Ptc et Smo (Traiffort *et al.*, 1999 ; Charytoniuk *et al.*, 2002 ; Angot *et al.*, 2008) ainsi que les facteurs de transcription Gli1-3 (Ahn *et al.*, 2005 ; Ihrle *et al.*, 2011 ; Petrova *et al.*, 2013), dans les cellules de la ZSV ont permis de confirmer un rôle de la voie de signalisation Shh dans cette aire de neurogenèse. L'induction d'une transcription rapide de *Ptc* dans la ZSV après une injection directe de la protéine Shh active dans le VL de rat et de souris, a été le premier argument en faveur de l'hypothèse que la voie de signalisation Shh reste activable dans le cerveau adulte (Charytoniuk *et al.*, 2002). La transcription de *Ptc* est inhibée par l'injection directe d'un antagoniste de Smo indiquant un rôle crucial de Smo dans cette aire de neurogenèse (Roudaut *et al.*, 2011). Ces données confirment la présence de cellules sensibles à la protéine Shh. Cependant, l'activation pharmacologique de la signalisation Shh par l'administration d'un agoniste de Smo, le SAG, chez la souris adulte, augmente le nombre de cellules en prolifération dans la ZSV et l'expression de *Gli1* dans ces cellules (Machold *et al.*, 2003). À l'inverse, le blocage pharmacologique de la voie de signalisation Shh par une injection systémique de cyclopamine, un antagoniste Smo, entraîne une diminution de l'expression de *Gli1* et *Gli3*, et de la prolifération cellulaire dans la ZSV (Palma *et al.*, 2005). Cependant, ces résultats ont été remis en question puisqu'ils n'ont pas été reproduits après une injection directe de la cyclopamine dans le VL de rats adultes (Banerjee *et al.*, 2005). Néanmoins, la protéine Shh augmente le nombre et module la prolifération et la balance entre l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches de la ZSV en neurosphères (Lai *et al.*, 2003 ; Machold *et al.*, 2003 ; Palma *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données suggère différents modes de régulation par la voie de signalisation Shh *in vitro* et *in vivo*.

L'invalidation conditionnelle du récepteur Smo dans les progéniteurs neuroépithéliaux Nestine⁺ au stade E12.5, puis chez l'adulte démontre que le signal transmis via Smo est non seulement indispensable pour la mise en place de la ZSV (Balordi *et al.*, 2007a) mais également nécessaire au maintien de cette aire de neurogenèse chez l'adulte (Balordi *et al.*, 2007b). En effet, en l'absence de Smo, la ZSV est incapable de se régénérer après destruction des cellules à prolifération rapide induite par l'administration d'un agent antimitotique. La modulation de Smo dans la ZSV peut également contribuer à la génération de multiples sous-types d'interneurones dans le BO (Brill *et al.*, 2009).

Par ailleurs, notre équipe a montré que Shh possède une activité chémoattractive sur les neuroblastes migrants de la ZSV. Shh régule la sortie de neuroblastes en dehors de la ZSV et le nombre de neurones générés dans le BO. Cette activité est modulée par le récepteur Smo, puisque le blocage pharmacologique de ce récepteur par un antagoniste inhibe la chémoattraction de Shh observée *in vitro* (Angot *et al.*, 2008).

L'activation génétique de la voie de signalisation Shh dans les cellules souches neurales adultes a récemment été réalisée par inactivation conditionnelle de *Ptc* dans les cellules exprimant le transporteur de glutamate spécifique des astrocytes (GLAST). Cette activation résulte probablement de la suppression de l'effet inhibiteur que *Ptc* exerce sur Smo, et conduit à une expansion des cellules souches neurales et à une diminution de leur descendance directe, avec une très forte diminution de la neurogenèse. L'activation de Smo dans les cellules souches de la ZSV peut moduler la division symétrique de ces cellules par un processus impliquant la voie de signalisation Notch (Ferent *et al.*, 2014). De façon intéressante, l'activation de la voie de signalisation Shh augmente la division asymétrique des cellules souches sans favoriser la formation d'une tumeur. L'activation de la voie de

signalisation Shh dans la ZSV de ces souris influe sur le devenir des précurseurs dérivés de la ZSV. Ils peuvent préférentiellement se différencier en OL et intégrer le corps calleux ou en neurones dopaminergiques dans le BO (**Figure 12**, (Ferent *et al.*, 2014)). La spécification de précurseurs neuraux peut être d'un grand intérêt dans un contexte thérapeutique (maladies démyélinisantes, maladie de Parkinson). Par conséquent, il est important d'étudier si des petites molécules de synthèse agonistes ou antagonistes de Smo, ou si un ligand endogène, encore non identifié, peuvent moduler les cellules souches *in vivo*.

2.1.2 Zone sous-granulaire du gyrus dentelé

La seconde aire de neurogenèse du cerveau adulte est la ZSG du GD de l'hippocampe. Son organisation est comparable à celle décrite pour la ZSV. Cependant, les neuroblastes nouvellement formés mûrent et s'intègrent localement dans le réseau neuronal de la couche granulaire du GD (**Figure 12**). Il a été proposé que différents rôles de l'hippocampe, comme la mémoire à long terme ou l'humeur puissent être modulés par la neurogenèse hippocampique (Pereira Dias *et al.*, 2014). Ainsi, la modulation de la voie de signalisation Shh qui gouverne la neurogenèse hippocampique pourrait avoir des répercussions sur les fonctions cognitives et les symptômes dépressifs.

La voie de signalisation Shh a été identifiée comme régulatrice des cellules souches adultes de l'hippocampe suite à l'observation d'une augmentation de la prolifération de ces cellules après une surexpression de Shh par un adénovirus (Lai *et al.*, 2003 ; Banerjee *et al.*, 2005) ou de l'administration d'un agoniste de Smo (Machold *et al.*, 2003). Le cil primaire a ensuite été proposé comme essentiel dans l'expansion et la mise en place des progéniteurs de l'hippocampe adulte. L'invalidation conditionnelle de Smo dans les précurseurs neuraux

astrogliaux exprimant le marqueur GFAP (Glial fibrillary acidic protein) induit un défaut majeur dans la neurogenèse hippocampique avec notamment une atrophie du GD, une prolifération nettement réduite des progéniteurs et quelques rares neurones nouvellement formés (Breunig *et al.*, 2008 ; Han *et al.*, 2008). Ce phénotype est proche de celui observé chez des souris invalidées pour le gène de la kinésine Kif3a dans les cellules GFAP⁺, qui présentent un défaut de ciliogenèse, une altération de la voie de signalisation Shh dans les précurseurs de neurones granulaires et une absence d'astrocytes radiaires, qui fonctionnent comme les cellules souches de la ZSG. Par ailleurs, l'expression de la forme constitutivement active de Smo, SmoM2, sous le promoteur GFAP des cellules souches astrogliales adultes, provoque une expansion significative du GD. Dans ces cellules, SmoM2 est localisé dans le cil primaire, en accord avec les études de sa localisation cellulaire dans des fibroblastes (Rohatgi *et al.*, 2009), alors que cet effet n'est pas observé lorsque la kinésine Kif3a est mutée. Ces données démontrent le rôle critique de la voie de signalisation Shh via le cil primaire dans l'expansion et l'établissement des précurseurs des cellules granulaires du GD adulte. Une étude a montré que l'ablation des cils primaires dans les cellules GFAP⁺ engendrait des troubles de la mémoire spatiale suggérant un lien entre les déficits cognitifs observés dans les ciliopathies et la ciliogenèse des cellules progénitrices de l'hippocampe adulte (Amador-Arjona *et al.*, 2011).

Parmi les facteurs de transcription Gli, Gli1 est le seul requis pour l'autorenouvellement des cellules souches adultes de la ZSG. L'induction transcriptionnelle de *Gli1* dans ces cellules est associée à l'induction de gènes pro-apoptotiques impliqués dans le blocage de la transition G2-M au cours du cycle cellulaire (Galvin *et al.*, 2008). Cela pourrait être lié à la capacité unique de maintenance des cellules souches adultes au cours des cycles cellulaires.

2.2 Contrôle des propriétés électrophysiologiques des neurones matures

L'expression de Shh dans de nombreuses aires cérébrales a rapidement laissé penser que la protéine pouvait être impliquée dans des activités différentes de celles classiquement associées à un facteur de croissance. L'activité de Shh sur les neurones post-synaptiques a été montrée dans le noyau subthalamique (Bezard *et al.*, 2003) et dans le noyau ventral du tractus solitaire (vNTS, (Pascual *et al.*, 2005)). L'analyse électrophysiologique de tranches cérébrales contenant l'un ou l'autre de ces noyaux indique que des concentrations sub-nanomolaires de Shh sont capables d'induire en quelques minutes une inhibition de l'activité neuronale, suivie dans le vNTS de bouffées d'activité. Ces réponses sont bloquées dans le vNTS par l'anticorps monoclonal 5E1 dirigé contre Shh (Pascual *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que Shh peut induire la réapparition des activités électriques caractéristiques des neurones immatures du vNTS et pourrait ainsi être impliqué dans les processus d'acclimatation à l'hypoxie (Pascual *et al.*, 2005). Le déclenchement très rapide de ces activités est en faveur d'un mécanisme de signalisation non transcriptionnel. Plus récemment, il a été rapporté que Shh sécrété par les neurones dopaminergiques de la substance noire serait nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire et neurochimique des neurones dopaminergiques, cholinergiques et GABAergiques à décharges rapides du circuit nigro-striatal. L'altération du signal Shh à ce niveau semble donc pouvoir participer au déclenchement de la maladie de Parkinson (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2012).

III. Pathologies et applications thérapeutiques

La voie de signalisation Hh est impliquée dans des processus biologiques au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. La dérégulation de la voie peut donc conduire à différents types de pathologies comme des malformations congénitales ou des cancers. La régulation pharmacologique de la voie de signalisation Hh présente un intérêt thérapeutique majeur pour les traitements de ces cancers.

1. Malformations congénitales

Des mutations dans les gènes *Shh* ou *Gli3*, aboutissant à une activation inappropriée de la voie de signalisation Hh au cours du développement embryonnaire, ont été mises en cause dans des défauts de formation des membres. La polydactylie préaxiale, marquée par la présence d'un ou de plusieurs doigts supplémentaires, est une anomalie morphologique provenant d'une activation ectopique du signal Shh dans la partie antérieure du bourgeon des membres, pour revue (McMahon *et al.*, 2003). Cette pathologie est la malformation des membres la plus fréquente chez l'Homme et l'une des anomalies du développement les plus courantes avec une incidence de 15 naissances sur 10 000.

À l'inverse, d'autres malformations congénitales sont associées à une signalisation Hh déficitaire. La plus fréquente, et néanmoins rare (1 cas pour 16 000 naissances) est l'holoprosencéphalie (HPE), une malformation cérébrale affectant à la fois le cerveau et le visage. La malformation vient d'une division incomplète du prosencéphale entre le 18^e et le 28^e jour de l'embryon. Diverses anomalies faciales peuvent être observées telles qu'une cyclopie, un proboscis, une fente palatine, une incisive médiane unique ou un rapprochement

excessif des deux yeux ; pour revue (Gongal *et al.*, 2011). L'HPE est causée à la fois par des expositions à des agents tératogènes comme l'alcool ou les acides rétinoïques ou par des anomalies génétiques, par exemple de la voie de signalisation Hh dans 50 % des cas. En effet, 64 mutations du gène *Shh* ont été associées à l'HPE, de même que des mutations de *Ptc* et de *Gli2*. L'analyse par mutagenèse dirigée des protéines Shh-N et Shh-C a permis de montrer que la majorité des mutations identifiées dans des cas d'HPE induisent une activité réduite du polypeptide biologiquement actif Shh-Np (Traiffort *et al.*, 2004).

Une perte de la voie de signalisation Shh au début du développement entraîne également l'apparition de colobomes oculaires, une malformation congénitale due à une fermeture anormale de la fissure ventrale de l'œil ; pour revue (Gongal *et al.*, 2011). L'atteinte peut être variable allant de la simple encoche à l'absence de tissu rétinien sur une grande partie de l'œil, entraînant une réduction de l'acuité visuelle ou des pertes de champ de vision.

Deux autres syndromes présentent un grand nombre de caractéristiques des pathologies associées à une voie de signalisation Hh anormale au cours de l'embryogenèse. Il s'agit du syndrome VACTERL (Vertebral anomalies, Anal atresia, Cardiac Malformations, Tracheo-Eosophageal fistula, Renal et Limb malformations) qui est un ensemble de malformations congénitales ; pour revue (Shaw-Smith, 2010) dans lequel des mutations de *Shh* ont été identifiées et du syndrome de Smith Lemli-Opitz (SLOS) caractérisé par des anomalies congénitales multiples, des déficits intellectuels et des troubles comportementaux. Des mutations du gène codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase (*Dhcr7*), importante dans la dernière étape de la biosynthèse du cholestérol, ont été identifiées dans le SLOS ; pour revue (Porter *et al.*, 2011). L'importance du rôle du cholestérol pour la synthèse, le

transport et la réception du ligand de la voie de signalisation Hh suggère que le cholestérol peut affecter la voie avec différents mécanismes dans ce syndrome. La démonstration du rôle de *Ptc* dans la régulation des concentrations intracellulaires de cholestérol est en accord avec les défauts de la voie de signalisation Hh observés dans le SLOS (Bidet *et al.*, 2011). De plus, les effets des oxystérols et de la vitamine D3 récemment mis en jeu dans la voie de signalisation Hh ont confirmé l'importance de l'enzyme *Dhcr7* dans la régulation de cette voie ; pour revue (McMahon *et al.*, 2003 ; Porter&Herman, 2011).

2. Cancers

2.1 Carcinome basocellulaire

Le BCC, une tumeur liée à la prolifération non contrôlée de kératinocytes, est considéré comme la tumeur cutanée la plus répandue chez l'Homme. Il y a environ 2 millions de personnes nouvellement atteintes chaque année dans le monde ; pour revue (Athar *et al.*, 2014). Les BCC sont principalement excisés par chirurgie ou traités par radiothérapie si la taille ou l'emplacement de la tumeur ne permet pas la chirurgie. Actuellement, la recherche sur les BCC vise à identifier de nouveaux traitements plus ciblés et moins radicaux.

L'implication de la voie de signalisation Hh dans le développement de BCC a initialement été identifiée par l'association d'une mutation inactivatrice du gène *Ptc* à un syndrome autosomal dominant, le syndrome de Gorlin (Hahn *et al.*, 1996 ; Johnson *et al.*, 1996). Ce syndrome engendre le développement de multiples BCC. Les patients présentent également d'importantes malformations squelettiques et ont une susceptibilité accrue à développer des MB et des RMS (Epstein, 2008). Les BCC peuvent également apparaître de façon sporadique suite à des expositions trop importantes au soleil ou aux rayonnements

ultraviolets (UV). Dans 70 % des cas une mutation inhibitrice du gène *Ptc* a été identifiée (Epstein, 2008), 10 % sont associés à une mutation activatrice du gène *Smo* (Reifenberger *et al.*, 1998 ; Xie *et al.*, 1998 ; Lam *et al.*, 1999), et d'autres sont plus rarement associés à une mutation inhibitrice des gènes *Sufu* (Reifenberger *et al.*, 2005), *Gli1* (Dahmane *et al.*, 1997) ou *Gli2* (Sheng *et al.*, 2002).

Les souris hétérozygotes *Ptc*^{+/-} sont un bon modèle animal du syndrome de Gorlin. Elles présentent les caractéristiques essentielles de la maladie dont une grande susceptibilité au développement de modèles de BCC et de MB (Goodrich *et al.*, 1997 ; Hahn *et al.*, 1998). Ces souris développent des modèles de BCC suite à une exposition aux UV ou aux radiations ionisantes contrairement aux souris contrôles qui ne développent jamais ce type de tumeurs même après une exposition à l'agent cancérigène ; pour revue (Li *et al.*, 2011).

L'origine cellulaire des BCC varie en fonction du gène muté. En effet, les cellules de l'épiderme interfolliculaire sont impliquées dans le développement des carcinomes liés à la surexpression de *Smo* (Youssef *et al.*, 2010) alors que les cellules souches du follicule pileux sont à l'origine des carcinomes liés aux mutations inhibitrices de *Ptc* (Wang *et al.*, 2011) ou de *Gli2* (Grachtchouk *et al.*, 2011). Le rôle du cil primaire dépend également de la nature du gène muté. En effet, des études récentes montrent que la délétion conditionnelle des allèles *Kif3a* et *Ift188*, requis pour la ciliogenèse, diminue la formation de BCC induite par l'expression de la forme constitutivement active de *Smo*, *SmoM2*, dans les kératinocytes murins, mais potentialise la tumorigenèse induite par une mutation activatrice du gène *Gli2* (Wong *et al.*, 2009). Le cil est donc un élément important à considérer dans le traitement des BCC.

2.2 Médulloblastome

Le MB est une tumeur de la région postérieure de l'encéphale et représente la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez l'enfant bien qu'elle n'affecte qu'une naissance sur 10 000 chaque année en France ; pour revues (Fellay *et al.*, 2011 ; Hatten *et al.*, 2011 ; Ng *et al.*, 2011). Les enfants malades développent généralement ces tumeurs avant l'âge de 10 ans. Ils sont traités par chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie qui provoquent par la suite des troubles cognitifs importants. De nouvelles stratégies thérapeutiques moins invasives sont nécessaires pour limiter ces effets indésirables.

Les MB ont été classés en quatre sous-groupes suivant leur origine moléculaire ; pour revue (Adamski *et al.*, 2014). Plus de 30 % des MB présentent une signature Hh qui indique une activation de la voie et sont associés à une inactivation des gènes *Ptc* ou *Sufu* ou à une mutation de gain de fonction du gène *Smo* (Thompson *et al.*, 2006 ; Kool *et al.*, 2008 ; Northcott *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2012). Comme mentionné précédemment, les MB dépendants de la signalisation Hh proviendraient d'une prolifération anormale des GCP dans la couche EGL du cervelet. Il a été montré que l'inactivation de *Ptc* dans les GCP induit l'apparition de MB (Yang *et al.*, 2008). Le deuxième sous-groupe de MB est associé à la dérégulation de la signalisation Wnt et représente 10 % des MB (pour revue ; Adamski *et al.*, 2014). Le troisième sous-groupe n'est pas associé à la dérégulation dominante d'une voie de signalisation mais une amplification du gène MYC est observée (Northcott *et al.*, 2012). Dans le quatrième sous-groupe, qui représente la majorité des MB, une amplification des gènes NMYC et CDK6 est observée (Northcott *et al.*, 2012 et pour revue ; Adamski *et al.*, 2014).

Historiquement, la recherche sur les médulloblastomes était confinée à l'utilisation de lignées cellulaires et de xénogreffes, mais l'essor des modèles murins a conduit au développement de modèles de tumeurs cérébrales dont les MB liés à une activation de la voie Hh. Comme mentionné précédemment, les souris $Ptc^{+/-}$ sont un modèle de MB. La fréquence d'apparition de ces tumeurs atteint jusqu'à 25 % suivant le fond génétique des souris (Goodrich *et al.*, 1997 ; Hahn *et al.*, 1998 ; Wetmore *et al.*, 2000). Leur incidence atteint 100 % avec un développement beaucoup plus précoce lorsque les animaux sont également déficients pour le gène p53 (Wetmore *et al.*, 2001) ou lorsqu'ils sont irradiés (Pazzaglia *et al.*, 2002). Le développement du MB est vraisemblablement lié à plusieurs événements dont la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs *Ptc* et *p53*, mais aussi l'altération des gènes requis pour la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (Frappart *et al.*, 2009). D'autres modèles murins de MB ont été développés. Des formes activatrices de Smo, initialement décrites dans les BCC (Reifenberger *et al.*, 1998 ; Xie *et al.*, 1998), ont été introduites sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription Neurod2 (Hallahan *et al.*, 2004 ; Hatton *et al.*, 2008). Ces modèles permettent une meilleure compréhension des processus tumorigéniques et sont utilisés pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Plus récemment, le corécepteur Boc s'est également révélé être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement des MB. Une étude démontre que lorsque Boc est inactivé, le nombre de tumeurs de stade précoce ou avancé est réduit de 66 % (Mille *et al.*, 2014).

2.3 Tumeurs Hh-dépendantes

Un nombre croissant de tumeurs sont associées à une activation constitutive de la voie de signalisation Hh. Ce sont des tumeurs dites dépendantes du ligand, par opposition à celles

dérivant d'une mutation d'une composante de la voie (**Figure 13A**). L'apparition de ces tumeurs pourrait être consécutive à la réactivation incontrôlée de la voie de signalisation Hh au cours d'un processus de réparations des tissus ; pour revue (Beachy *et al.*, 2004). Une augmentation du niveau d'expression des gènes cibles de la voie tels que *Ptc* et *Gli1* ou encore des ligands Hh a été détectée dans les tumeurs de divers tissus, y compris les poumons (Watkins *et al.*, 2003 ; Yuan *et al.*, 2007), le tractus digestif (Berman *et al.*, 2003), le colon (Varnat *et al.*, 2009), le pancréas (Berman *et al.*, 2003 ; Thayer *et al.*, 2003), la prostate (Karhadkar *et al.*, 2004 ; Sanchez *et al.*, 2004), le sein (Kubo *et al.*, 2004 ; Mukherjee *et al.*, 2006), le foie (Sicklick *et al.*, 2006), les ovaires (Chen *et al.*, 2007), les mélanocytes (Stecca *et al.*, 2007) et les cellules hématopoïétiques (Zhao *et al.*, 2009). La suractivation de la voie entraîne également des tumeurs au cerveau telles que les gliomes (Clement *et al.*, 2007 ; Monje *et al.*, 2011), les glioblastomes (Bar *et al.*, 2007) les astrocytomes (Rush *et al.*, 2010) et les neuroblastomes (Mao *et al.*, 2009).

Plusieurs modèles d'activation de la voie de signalisation Hh dans ces tumeurs ont été proposés ; pour revue (Amakye *et al.*, 2013). Dans le modèle autocrine (**Figure 13B**), la cellule tumorale sécrète le ligand Shh pour son usage (ou pour les cellules tumorales voisines). La voie de signalisation Hh stimulerait ainsi la prolifération et la survie des cellules à l'origine de la croissance tumorale. La pertinence de ce mécanisme n'est pas clairement comprise. En effet, les concentrations micromolaires de cyclopamine nécessaires pour l'inhibition de la prolifération de cellules de MB en culture sont plus de 300 fois supérieures à celles requises pour inhiber la signalisation Hh dans des fibroblastes exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur Gli (Romer *et al.*, 2004). De plus, l'inhibition de la croissance de lignées cellulaires de cancer du sein est indépendante de l'inhibition des cibles

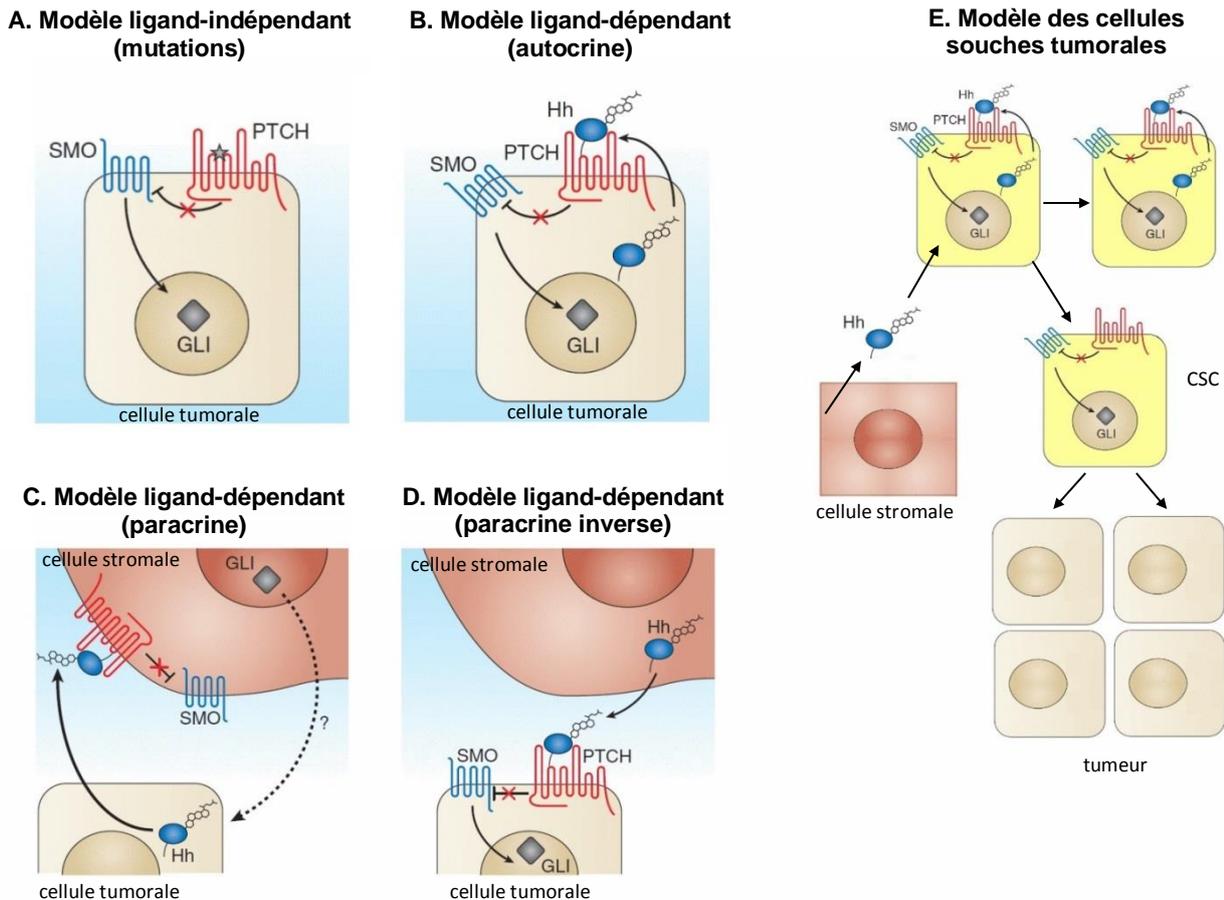


Figure 13 : Mécanismes d'activation proposés de la signalisation Hedgehog dans les cancers.

A. L'activation de la signalisation Hedgehog (Hh) peut être indépendante du ligand Hh à la suite de mutations de perte de fonction des régulateurs négatifs Patched (PTCH, étoile) ou Suppressor of Fused ou de mutations de gain de fonction du régulateur positif Smoothened (SMO). B. L'activation autocrine se produit lorsque le ligand Hh, produit par la cellule tumorale, active la signalisation Hh dans la même cellule. C. L'activation paracrine se produit lorsque le ligand Hh, produit par la tumeur, active la signalisation Hh dans le stroma environnant. Le stroma de la tumeur stimule ensuite la croissance tumorale. D. L'activation paracrine-inverse se produit lorsque le ligand Hh, produit par le stroma environnant, active la signalisation Hh dans la tumeur. E. La signalisation Hh n'est active que dans les cellules présumées souches et appartenant à la tumeur, d'après (Amakye *et al.*, Nat Med, 2013 ; Scales *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2009).

transcriptionnelles de la voie Hh, *Gli1* et *Ptc*, suggérant que la cyclopamine a une cible indépendante de la voie de signalisation Hh à de hautes concentrations (Zhang *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces constatations ouvre la possibilité d'un second modèle d'activation de la voie de signalisation Hh dans ces tumeurs.

Dans le modèle paracrine, la cellule tumorale sécrète le ligand Shh et les cellules du stroma expriment le système de réception/transduction du signal (**Figure 13C**). L'activation de la voie de signalisation Hh dans les cellules environnantes va induire la libération de facteurs trophiques qui vont agir en retour sur les cellules tumorales favorisant ainsi leur multiplication et/ou leur différenciation. Dans le modèle paracrine inverse, ce sont les cellules stromales qui sécrètent le ligand Shh, qui agit sur les cellules tumorales réceptrices et favorise leur expansion (**Figure 13D**).

2.4 Signalisation Hh et cellules souches tumorales

Les tumeurs sont constituées de plusieurs populations distinctes de cellules : une majorité de cellules tumorales différenciées qui caractérisent le phénotype de la maladie et une seconde population de cellules plus rares, les cellules souches cancéreuses (CSC), capables d'autorenouvellement et pluripotentes (capacité de se diviser de manière asymétrique et de se différencier), permettant donc de générer tous les types cellulaires retrouvés dans la tumeur (**Figure 13E**). Les CSC ont la particularité d'être résistantes à la chimiothérapie et aux radiations car leur croissance est lente et elles sont considérées comme étant la cause des rechutes dans les traitements anticancéreux, ce qui en fait une cible thérapeutique majeure. La voie de signalisation Hh contrôlerait le maintien des CSC ; pour revue (Merchant *et al.*, 2010).

La voie de signalisation Hh a été montrée comme régulant l'autorenouveaulement des CSC épithéliales du sein (Liu *et al.*, 2006) et de myélomes multiples (Daniel *et al.*, 2006), ainsi que la maintenance des CSC de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) (Dierks *et al.*, 2008 ; Zhao *et al.*, 2009). Dans un modèle murin de LMC, les cellules souches invalidées pour l'expression de Smo perdent leur capacité à former des tumeurs alors que l'expression du transgène SmoM2 favorise la tumorigenèse (Peacock *et al.*, 2007 ; Dierks *et al.*, 2008). De plus, des antagonistes de Smo tels que la cyclopamine ou l'anticorps 5E1 qui cible la protéine Shh, inhibent la croissance des CSC de LMC *in vitro* et *in vivo*, et le délai avant une rechute à la fin du traitement est amélioré. L'activation de la voie de signalisation Hh a également été identifiée dans les CSC de glioblastome, et une inhibition de la voie par la cyclopamine ou des siRNA dirigés contre des composants de la voie, réduirait le potentiel tumorigène des CSC (Bar *et al.*, 2007 ; Clement *et al.*, 2007). La voie de signalisation Hh apparaît donc être une cible thérapeutique prometteuse pour réduire ces tumeurs, de préférence en combinaison avec d'autres agents ou rayonnements pour éliminer la plus grande partie de la tumeur différenciée. De plus, la voie de signalisation Hh régule positivement l'expression de protéines transporteuses à la surface des CSC, leur permettant d'exporter les drogues dans le milieu extracellulaire et donc de résister à l'absorption de médicaments cytotoxiques (Sims-Mourtada *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été montré que Ptc pouvait également permettre d'exporter des drogues cytotoxiques telles que la doxorubicine, le méthotrexate, le témozolomide, ou le 5-fluorouracile dans le milieu extracellulaire, et donc de contribuer à la résistance des tumeurs (Bidet *et al.*, 2012). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation Hh est donc une stratégie thérapeutique pertinente pour bloquer l'effet de ces transporteurs. Récemment, l'utilisation de petites molécules extraites d'éponges méditerranéennes a permis d'inhiber le transport de la doxorubicine par Ptc dans une culture *in vitro* de cellules de mélanome (Fiorini *et al.*, 2015).

En plus de la formation de tumeurs, l'activation de la voie de signalisation Hh dans les CSC induit le développement de métastases des tumeurs solides (Mani *et al.*, 2008). Les formes activatrices des facteurs de transcription Gli induisent l'expression de SNAIL, une protéine à doigts de zinc se liant aux protéines E-cadhérine engendrant ainsi la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses mobiles, un processus requis pour la migration des cellules tumorales et la formation de métastases. Dans les carcinomes du côlon, la voie de signalisation Hh a été trouvée préférentiellement activée dans les CSC comme en témoigne l'expression élevée des gènes *Gli1*, *Gli2*, *Ptc*, et *Hip* dans ces cellules (Varnat *et al.*, 2009). De plus, le gène SNAIL est fortement exprimé. L'utilisation de la cyclopamine ou de siRNA dirigés contre Smo, Gli1 ou Gli2 permet une diminution de la prolifération et induit l'apoptose des CSC. *In vivo*, la cyclopamine ou des shRNA dirigés contre Smo empêche la formation de métastases.

Plus récemment, le facteur de transcription Nanog a été impliqué dans le processus tumorigénique des MB. Dans les cellules souches, son activation serait induite par la fixation des facteurs de transcription Gli1 et Gli2 sur des séquences cis-régulatrices spécifiques et participerait à l'autorenouvellement de ces cellules (Po *et al.*, 2010).

3. Ciliopathies

Des études récentes ont étudié le lien entre le dysfonctionnement des cils primaires et la voie de signalisation Hh dans les ciliopathies humaines dont les signes cliniques variés peuvent inclure des kystes rénaux, une dégénérescence de la rétine, une polydactylie, des retards mentaux ou une obésité. Des modèles de souris de ces maladies ont été développés (Simpson *et al.*, 2009). Plusieurs composants de la machinerie IFT de souris nécessaires pour

l'assemblage et l'entretien des cils ont été rapportés par un criblage de mutants comme essentiels pour la ventralisation des cellules Shh-dépendantes dans le tube neural. Ils comprennent les composants du complexe IFTB, dont l'IFT172, l'IFT88 et l'IFT dédié au moteur rétrograde DYNC2H1. La perturbation du moteur kinésine-2 (observée chez des embryons sans Kif3a) se traduit également par des défauts semblables dans la structure des neurones Shh-dépendants (Huangfu *et al.*, 2003 ; Huangfu *et al.*, 2005 ; May *et al.*, 2005). D'après des études génétiques, les protéines IFT agissent probablement en aval de Ptc et de Smo, et en aval des facteurs de transcription Gli (Huangfu & Anderson, 2005). Les formes répressives ou activatrices des facteurs de transcription Gli dépendent des protéines IFT. En effet, la perte de la voie de signalisation Hh dans le tube neural de souris mutantes pour les protéines IFT comme IFT88 semble liée à l'absence des formes activatrices des facteurs de transcription Gli dans le cil primaire. Des mutations de différentes protéines du corps basal indiquent également que le cil est nécessaire pour la signalisation Hh. Par exemple, la mutation du gène *Talpid3* codant pour une protéine centrosomale chez le poussin entraîne l'apparition d'un cil primaire dont la structure est perturbée, modifie la signalisation Hh et est associée à des anomalies du développement Hh-dépendantes (Davey *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2009). D'autres modèles de souris mutantes pour les gènes *Ofd1*, *Ftm* ou *Msk1*, et présentant un défaut ou l'absence de cils primaires, possèdent des défauts de la signalisation Hh (Goetz *et al.*, 2010).

De récentes études génétiques de mutations de gènes dans les ciliopathies et dans plusieurs maladies humaines ont identifié d'autres protéines impliquées dans la fonction du cil ; pour revue (Ruat *et al.*, 2012). Ces mutations affectent la signalisation Hh et sont associées aux défauts de développement qui sont également observés dans les modèles animaux. Par exemple, une mutation du gène de la kinésine Kif7 induit un défaut d'acétylation de la tubuline et une mauvaise dynamique du réseau de microtubules du cil

primaire (Dafinger *et al.*, 2011). Cette mutation entraîne une polydactylie, des défauts cérébraux et une fente palatine associés à un défaut d'hydrolyse du facteur de transcription Gli3 (Putoux *et al.*, 2011).

4. Maladies neurodégénératives

Des liens ont été établis entre la voie de signalisation Hh et des maladies neurodégénératives. La modulation pharmacologique de cette voie pourrait représenter une approche thérapeutique pour traiter certaines de ces maladies ; pour revue, (Hadden, 2013 ; Ruat *et al.*, 2014).

4.1 Maladie de Parkinson

L'activation de la voie de signalisation Shh pourrait représenter une approche thérapeutique potentielle pour la maladie de Parkinson, afin de pallier la perte des neurones dopaminergiques de la substance noire. En effet, l'injection du fragment actif de Shh dans des modèles de rongeurs ou de primates de la maladie de Parkinson augmente l'activité de la tyrosine hydroxylase des neurones de la substance noire, préserve les axones dopaminergiques dans le striatum, et est associée à l'amélioration des fonctions locomotrices (Dass *et al.*, 2002 ; Tsuboi *et al.*, 2002). Récemment, un modèle de souris, où le gène de Shh a été délété au niveau des neurones dopaminergiques a été établi. On observe chez les souris adultes une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques, cholinergiques, et GABAergiques du circuit mésostriatal, qui induit un déséquilibre de la neurotransmission cholinergique et dopaminergique et des troubles moteurs importants. La régulation pharmacologique de la voie de signalisation Hh par injection de modulateurs de Smo, comme

la cyclopamine ou le SAG, a conduit à la modulation des neurones cholinergiques, à l'expression de GDNF, et au maintien des neurones cholinergiques et GABAergiques dans le striatum (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2012). Ces travaux ouvrent la voie pour développer des traitements potentiels avec des modulateurs de Smo pour pallier une partie des défauts physiologiques de la maladie de Parkinson.

D'autre part, Shh est également capable d'induire la différenciation spécifique de neurones post-mitotiques en neurones cholinergiques *in vitro*, ce qui pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer caractérisée par des troubles cognitifs associés à la perte de neurones cholinergiques (Reilly *et al.*, 2002).

4.2 Réparation des nerfs, démyélinisation, réparation des tissus

Plusieurs données suggèrent également que la régulation pharmacologique de la voie de signalisation Hh pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour la réparation nerveuse ou le traitement des maladies de la myéline.

4.2.1 Astrocytes

Il a été proposé que la régulation de Smo puisse être impliquée dans la cicatrisation gliale qui se produit après divers types de blessures impliquant l'activation de la microglie et d'autres types de cellules gliales (Dimou *et al.*, 2014). Outre que dans les cellules souches neurales adultes, la voie de signalisation Hh est active dans certaines populations d'astrocytes matures du parenchyme. La suppression de Smo dans ces astrocytes induit une astrogliose (Garcia *et al.*, 2010). Il a été proposé que lors d'une lésion cérébrale, les astrocytes situés à proximité de la lésion soient activés, puis qu'ils acquièrent des propriétés de cellules souches

mettant en jeu la voie de signalisation Hh, et commencent à proliférer après l'addition d'un agoniste de Smo (Sirko *et al.*, 2013). Il a également été montré que ces astrocytes pouvaient donner naissance à des neurones suite à une lésion cérébrale (Guo *et al.*, 2014). La poursuite de ces travaux permettra de comprendre les effets de modulateurs de la voie de signalisation Hh et représente un intérêt thérapeutique très important pour le traitement des lésions cérébrales.

4.2.2 Oligodendrocytes

Les OL sont responsables de la formation de la gaine de myéline, qui est nécessaire pour la transmission rapide des signaux et la survie neuronale. La démyélinisation se produit dans plusieurs maladies cérébrales telles que la sclérose en plaques, mais également après un traumatisme, une ischémie, une infection virale ou dans les maladies neurodégénératives (Edgar *et al.*, 2012). Après la mort des OL, la remyélinisation spontanée se produit à travers la génération d'OL provenant de deux sources principales : les OLP du parenchyme (Dawson *et al.*, 2003) et les progéniteurs dérivés de la ZSV (Menn *et al.*, 2006 ; Ferent *et al.*, 2013). Ainsi, en réponse à une démyélinisation, les OLP sont recrutés au site de la lésion, ils migrent, prolifèrent et se différencient.

Au cours du développement, la protéine Shh est requise pour la spécification d'une première vague d'OLP originaires des régions ventrales de la moelle épinière et du cerveau antérieur. Chez l'adulte, la sécrétion de Shh dans le cerveau est suivie d'une augmentation du nombre d'OLP et de cellules plus différenciées exprimant l'antigène neuronal et glial NG2 et l'isoforme de la protéine protéolipidique DM20, à la fois dans le cortex cérébral et le corps calleux (Loulier *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que la voie de signalisation Hh module

la lignée d'OLP. Cependant, l'activation de Smo par une injection directe de l'agoniste SAG dans le corps calleux de souris adultes, entraîne une augmentation de cellules NG2 positives. Cet effet sur la prolifération cellulaire peut être dû à la voie canonique ou une voie non canonique de la signalisation Hh (Mierzwa *et al.*, 2014).

L'activation de la voie de signalisation Hh dans un modèle de souris de démyélinisation focale est également en accord avec ces données (Ferent *et al.*, 2013). Dans ce modèle, l'injection de lysophosphatidylcholine (également appelée lysolécithine ou LPC) dans le corps calleux entraîne une dégénérescence rapide (trois à sept jours) de la plupart des OL à l'exception des OLP. Une remyélinisation complète est observée après 15 à 20 jours. L'injection d'un adénovirus de Shh dans le cerveau lésé est suivie par une augmentation du nombre d'OLP et d'OL myélinisants matures en raison de la survie, de la prolifération et de la différenciation cellulaire. De façon intéressante, l'astroglie et l'infiltration des macrophages sont réduites. Le blocage de la voie de signalisation Hh par son antagoniste physiologique Hip, se traduit par une diminution de la prolifération et de la différenciation des OLP, ce qui empêche en outre la réparation cellulaire (Ferent *et al.*, 2013). Ainsi, ces données indiquent un rôle positif de la voie de signalisation Hh au cours de la démyélinisation.

Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour comprendre le rôle complexe exercé par Smo dans la lésion, puisque ce récepteur est régulé positivement par les cellules de la microglie après la formation de la lésion, puis par les OLP et, dans une moindre mesure, par les astrocytes pendant la remyélinisation (Ferent *et al.*, 2013). La transcription du gène *Smo* est également régulée positivement dans les neurones des moteurs faciaux de rat adulte suite à une axotomie des nerfs faciaux (Akazawa *et al.*, 2004). Ces données démontrent le potentiel thérapeutique de la modulation de Smo pour la réparation nerveuse

ou le traitement des maladies de la myéline. En outre, ces travaux sont également nécessaires pour comprendre si l'activation de Smo peut protéger les lésions cérébrales induites par les glucocorticoïdes chez les souris néonatales ; ce qui pourrait être bénéfique lorsque ceux-ci sont administrés aux nouveau-nés en cas d'immaturation pulmonaire (Heine *et al.*, 2009).

IV. Pharmacologie du récepteur Smoothened

La modulation de la voie de signalisation Hh par des outils pharmacologiques s'est rapidement révélée prometteuse pour le traitement des cancers Hh-dépendants. Des molécules capables de réduire l'activité constitutive du récepteur Smo, ainsi que des molécules ayant pour cible Shh ou les facteurs de transcription Gli ont été développées ; pour revue, (Amakye *et al.*, 2013 ; Ruat *et al.*, 2015b). Des molécules capables d'activer le récepteur Smo ont également été développées et sont susceptibles d'avoir un intérêt pour le traitement des maladies neurodégénératives ; pour revue, (Hadden, 2014). D'un point de vue fondamental, la recherche a su tirer profit de ces outils afin de mieux caractériser les mécanismes d'action de la voie de signalisation Hh.

1. Les principaux tests mettant en jeu la voie de signalisation Hh

Une variété de tests biologiques a été élaborée et utilisée pour identifier, évaluer et optimiser les modulateurs de la voie de signalisation Hh ; pour revue (Peukert *et al.*, 2010). L'efficacité des composés testés est représentée par la concentration à laquelle 50 % de la réponse étudiée est induite par un agoniste (CE₅₀) ou inhibée par un antagoniste (CI₅₀).

Le test le plus couramment utilisé pour le criblage de nouvelles molécules ayant un effet sur la voie de signalisation Hh est le dosage de l'expression du gène *Gli* des cellules fibroblastiques de souris NIH3T3 (ou Shh-Light2) ou des cellules mésenchymateuses de souris C3H10T1/2 dans lesquelles un gène rapporteur de la luciférase Firefly placé sous le contrôle du promoteur Gli a été transfecté de façon stable (Taipale *et al.*, 2000). Si la voie de signalisation Hh est stimulée par un agoniste, la transcription du gène *Gli* sera induite et une augmentation de la luminescence sera observée. L'activité d'un antagoniste peut être évaluée

après stimulation par le ligand Shh ou par un agoniste de Smo, et se mesure par la diminution de la luminescence. L'utilisation de deux concentrations différentes d'un agoniste et l'observation d'un décalage de la CI_{50} à une valeur supérieure avec la concentration de l'agoniste la plus élevée, ainsi qu'une courbe d'inhibition parallèle de l'antagoniste testé, se traduisent par un antagonisme compétitif où l'agoniste et l'antagoniste partagent le même site de liaison.

Un second test cellulaire utilise les cellules mésenchymateuses de souris C3H10T1/2 (Wu *et al.*, 2002). En présence d'un agoniste de la voie de signalisation Hh, les cellules C3H10T1/2 se différencient en ostéoblastes et expriment une enzyme spécifique, l'alkaline phosphatase (AP). Son activité enzymatique peut facilement être mesurée par colorimétrie et permet d'identifier et d'optimiser des modulateurs (agonistes ou antagonistes) de la voie de signalisation Hh.

Les tests sur les tissus sont utilisés pour évaluer des composés dans un environnement ressemblant plus étroitement aux conditions *in vivo*. Par exemple, les niveaux d'ARNm de *Gli1* sont mesurés dans des tissus synthétiques de peau humaine (Stanton *et al.*, 2009). Les effets des modulateurs de la voie Hh peuvent également être étudiés sur des explants de la région intermédiaire des plaques neurales de poussins, région dans laquelle la voie de signalisation Hh détermine le patron d'expression de différents facteurs de transcription (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002 ; Williams *et al.*, 2003). La robustesse des tests génétiques utilisant un rapporteur du gène *Gli* pour le criblage *in vitro* a été utilisée pour développer un modèle de poisson-zèbre permettant la détection de l'activité Hh *in vivo*. Dans ce modèle transgénique, le gène rapporteur *Gli* est lié au promoteur de la GFP. Lorsque la voie est

activée, la fluorescence est détectée et les effets des modulateurs de la voie Hh peuvent être évalués par une analyse phénotypique de la fluorescence (Yang *et al.*, 2009).

Enfin, des essais plus physiologiques ont été développés, avec par exemple des cultures de GCP de raton ou des cellules de MB de souris Ptc^{+/-} (Dessole *et al.*, 2009). Les inhibiteurs de la voie Hh sont évalués pour leur capacité à bloquer la prolifération de ces cellules, induite par la voie de signalisation Hh, et suivie par exemple par l'incorporation de thymidine tritiée. Un essai a également été développé chez des embryons Ptc^{LacZ/+} où l'activation de la voie de signalisation Hh entraîne une augmentation de l'expression de la β -galactosidase (Machold *et al.*, 2003).

L'ensemble des tests ci-dessus permettent de mesurer les effets inhibiteurs ou agonistes des composés sur la voie Hh, mais offrent peu ou pas d'informations sur la cible de ces composés. Des tests de liaison au récepteur Smo humain ou murin ont été développés à l'aide de la Bodipy-cyclopamine (BC), un dérivé fluorescent de la cyclopamine, un antagoniste naturel de Smo, pour évaluer si les effets des modulateurs de la voie de signalisation Hh sont médiés par une liaison directe au récepteur Smo (Sinha *et al.*, 2006). Des tests de liaison au récepteur Smo humain ou murin exprimés transitoirement dans des cellules épithéliales rénales HEK293 ont également été développés avec des radioligands tritiés (**Tableau 1**), comme le [³H]Hh-Ag1.5, le [³H]SAG, la [³H]cyclopamine ou le [³H]GDC-0449 pour démontrer une liaison directe des modulateurs à Smo (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002 ; Rominger *et al.*, 2009 ; Dijkgraaf *et al.*, 2011). Un test identifiant la localisation cellulaire du récepteur Smo par immunofluorescence a également été développé pour évaluer si les effets

Radioligand de Smo	K_d	Référence
[³H]Hh-Ag.1.5	2 nM	(Frank-Kamenetsky <i>et al.</i> , 2002)
[³H]SAG	1.7 – 5.9 nM	(Rominger <i>et al.</i> , 2009)
[³H]Cyclopamine	10 nM	(Rominger <i>et al.</i> , 2009)
[³H]GDC-0449	5 nM	(Dijkgraaf <i>et al.</i> , 2011)

Tableau 1 : Comparaison des affinités des différents radioligands du récepteur Smoothened.

des modulateurs de la voie de signalisation Hh induisent une localisation du récepteur Smo au niveau du cil primaire ou cytoplasmique (Rohatgi *et al.*, 2009).

Au-delà des tests *in vitro* qui permettent d'identifier les molécules capables de moduler la voie de signalisation Hh, des tests *in vivo* dans divers modèles animaux sont réalisés. Les effets des antagonistes sont évalués notamment dans des modèles animaux précliniques de cancers décrits dans le chapitre précédent. Les effets des agonistes sont évalués dans des tissus endommagés en étudiant des processus de réparation mettant en jeu les cellules souches (Sirko *et al.*, 2013 ; Mierzwa *et al.*, 2014).

2. Modulateurs du récepteur Smoothened

2.1. Les agonistes

2.1.1 Agonistes endogènes

Smo est un récepteur à sept domaines TM ayant la particularité d'être constitutivement actif et régulé par un récepteur à 12 domaines TM, Ptc ; pour revue (Hadden, 2014). Une des hypothèses permettant d'expliquer le mécanisme d'inhibition exercé par Ptc sur Smo serait que Ptc pourrait réduire la quantité de ligand endogène disponible pour moduler l'activité de Smo. Comme mentionné précédemment, une étude a fourni des preuves solides que Ptc régule la concentration de cholestérol intracellulaire de cellules Hh-dépendantes, en contribuant à l'efflux du cholestérol, et que cette activité peut être un facteur dans la prévention de l'accumulation de Smo à la membrane plasmique (Bidet *et al.*, 2011). Le cholestérol et ses dérivés ont donc été proposés comme des ligands potentiels naturels du récepteur Smo. En effet, la déplétion cellulaire génétique ou pharmacologique en stérols rend les cellules moins sensibles au ligand Shh (Cooper *et al.*, 2003 ; Corcoran *et al.*, 2006). De

plus, les 22(S)-, 24(S)-, 25(S)- et **20(S)-hydroxycholestérols** (20(S)-OHC, **Figure 14**) sont capables d'activer la voie de signalisation Hh contrairement au 7 β -hydroxycholestérol (Corcoran & Scott, 2006 ; Dwyer *et al.*, 2007 ; Nachtergaele *et al.*, 2012). Les mécanismes d'action par lesquels ces oxystérols activent la voie Hh ont été étudiés en détail et des travaux récents démontrent que les oxystérols se lient directement à Smo pour transmettre leurs effets (voir partie 4). En revanche, la vitamine D3, une hormone stéroïde, a été proposée comme un antagoniste de Smo (Bijlsma *et al.*, 2006 ; Tang *et al.*, 2011a). L'ensemble de ces données suggère que Smo peut être modulé par des petites molécules stéroïdiennes.

2.1.2 Agonistes synthétiques

La molécule **SAG** (Hh-Ag 1.3, **Figure 14**) a été découverte parmi une famille de benzothiophènes biaryliques (Hh-Ag 1.1 - Hh Ag 1.5) lors d'un criblage à haut débit basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par la protéine Shh. Dans ce modèle, SAG présente un CE₅₀ de 3 nM. Les premières études visant à déterminer le mode d'action de la molécule SAG ont été réalisées à l'aide d'un dérivé tritié du Hh-Ag 1.5 (³H]Hh-Ag 1.5) et ont démontré que le SAG inhibe la liaison du radioligand au récepteur Smo (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002). Des études similaires avec un dérivé photosensible du SAG radiomarqué à l'¹²⁵I (PA-SAG) ont démontré que ce dérivé se lie également sur Smo au niveau des domaines TM du récepteur. Ce dérivé inhibe aussi la liaison de la BC suggérant qu'il se fixe au même site que cet antagoniste (Chen *et al.*, 2002b).

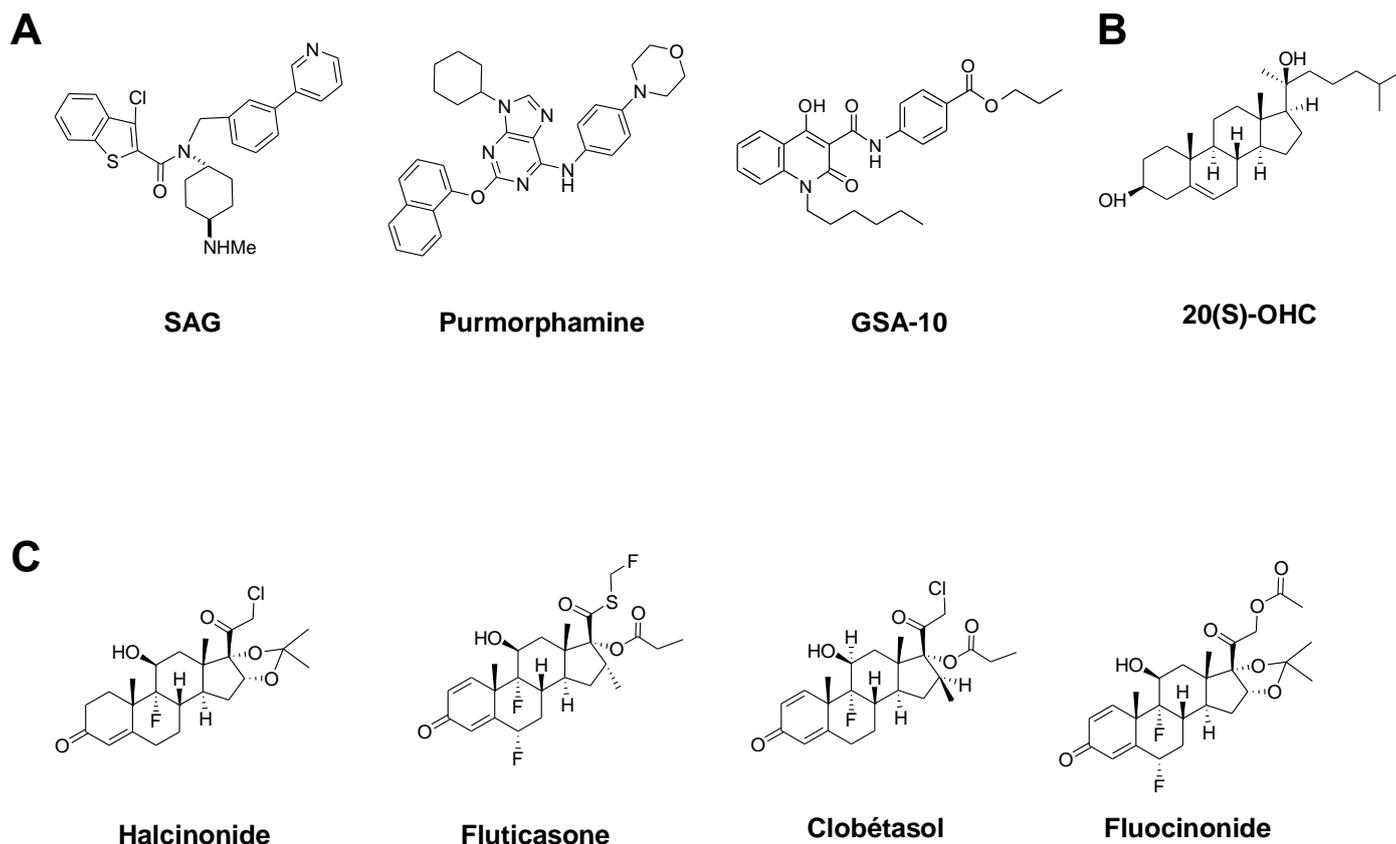


Figure 14 : Structures des principales molécules agonistes du récepteur Smoothened.

A. Structures du SAG, un dérivé de benziothiophène, de la Purmorphamine, un dérivé de purine et du GSA-10, un dérivé de quinolone. C. Structure du 20(S)-hydroxycholestérol (20(S)-OHC). D. Structures de dérivés glucocorticoïdes proposés comme agonistes de Smo, d'après (Hadden, ChemMedChem, 2014 ; Gorojankina, Hoch *et al.*, Mol Pharmacol, 2013).

Ces résultats corrèlent aujourd'hui avec les données cristallographiques du récepteur hSmo en présence du SAG (voir partie 4). Tout comme le ligand Shh, le SAG induit la prolifération des GCP du cervelet (Chen *et al.*, 2002b) et la translocation du récepteur Smo au niveau du cil primaire (Rohatgi *et al.*, 2009). Le SAG a la particularité de présenter une courbe d'activité biphasique. En effet, à partir de concentrations supérieures à 1 μM , le SAG inhiberait la voie Hh (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002). Il a été montré que cette perte d'activité n'est pas due à des effets cytotoxiques du composé. Ce dernier pourrait inhiber un composant cellulaire nécessaire pour l'activation de la voie Hh (Chen *et al.*, 2002b). Cependant, dans un modèle d'explant de tube neural de poulet, des concentrations croissantes de SAG (0.1 – 1 μM) miment de façon dose-dépendante l'effet de Shh sur la différenciation des cellules du tube neural (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002).

Depuis ces premières études, deux études de structure-activité ont permis de mieux comprendre les exigences structurales pour l'activation de la voie de signalisation Hh par cette classe d'agonistes, et ont conduit au développement de composés dérivés du SAG plus puissants et moins toxiques (Brunton *et al.*, 2009 ; Seifert *et al.*, 2012).

La **purmorphamine (Figure 14)** appartient à une deuxième famille chimique agoniste de Smo et a été découverte lors d'un criblage à haut débit basé sur l'induction de la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes mettant en jeu différentes voies de signalisation dont la voie Hh (Wu *et al.*, 2002). Cette molécule ostéogénique s'est ensuite révélée capable d'induire la transcription des gènes *Gli1*, *Gli2* et *Ptc* démontrant clairement que ses effets résultaient d'une activation de la voie Hh (Wu *et al.*, 2004). Une série d'expériences a permis d'identifier Smo comme étant la cible de la purmorphamine. En effet, la purmorphamine est inactive sur des cellules MEF Smo^{-/-} mais

restaure l'activité de la voie Hh sur des cellules MEF Ptc^{-/-}. De plus, la purmorphamine inhibe la liaison de la BC sur le récepteur Smo (Sinha & Chen, 2006). La purmorphamine a été utilisée dans plusieurs systèmes *in vitro* pour étudier le potentiel thérapeutique de l'activation de la voie Hh (Beloti *et al.*, 2005b ; Beloti *et al.*, 2005a ; Fontaine *et al.*, 2008). Une seule étude rapporte les effets neuroprotecteurs de la purmorphamine *in vivo* dans un modèle de souris d'ischémie cérébrale (Chechneva *et al.*, 2014). L'administration intraveineuse de 15 mg/kg de purmorphamine, six heures après l'ischémie cérébrale, réduit l'apoptose cellulaire et induit une augmentation du nombre de neuroblastes.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai contribué à la découverte du **GSA-10 (Figure 14)**, un nouvel agoniste de Smo (Gorojankina *et al.*, 2013). Comme mentionné précédemment, la caractérisation du GSA-10 a permis d'identifier que ce composé activait une voie de signalisation Hh non canonique.

Enfin, le criblage de molécules approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) et utilisées en clinique a permis d'identifier plusieurs **glucocorticoïdes synthétiques** comme agonistes potentiels de la voie de signalisation Hh et plus particulièrement du récepteur Smo. Ces composés sont capables de stabiliser la β -arrestine favorisant l'internalisation de Smo au sein de vésicules, mais aussi d'induire l'activité Gluciférase (CE₅₀ = 0.2-1.8 nM), la prolifération des GCP du cervelet et de potentialiser l'effet prolifératif de Shh sur ces cellules. Cependant, ces composés n'inhibent que partiellement la liaison de la BC (20 à 25 %) suggérant des sites d'interaction différents (Wang *et al.*, 2010). Initialement, **quatre glucocorticoïdes fluorés de synthèse (halcinonide, fluticasone, clobétasol et fluocinonide ; Figure 14)** ont été identifiés comme agonistes de Smo. Une seconde étude basée sur l'accumulation du récepteur Smo au niveau du cil primaire a mis en

évidence d'autres glucocorticoïdes, tels que la **fluocinolone** ou la **triamcinolone**, comme agonistes du récepteur Smo (Wang *et al.*, 2012a). Cependant parmi ce second criblage, deux glucocorticoïdes, le budénoside et le ciclésonide, ont des effets antagonistes suggérant que des composés ayant des structures chimiques très proches peuvent avoir des effets opposés.

2.2. Les antagonistes

2.2.1 Antagonistes naturels

La **cyclopamine** (Figure 15) et la **jervine** ont été les premières molécules antagonistes de la voie Hh découvertes par l'équipe de P. Beachy dans les années quatre-vingt-dix ; pour revue (Heretsch *et al.*, 2010). Ce sont des alcaloïdes naturels extraits du vétrate (*Veratrum Californicum*), une plante que l'on retrouve dans la plupart des massifs montagneux. Leur découverte vient de l'observation faite par des fermiers américains qui, dans les années cinquante, avait remarqué que les veaux nés d'une mère ayant ingéré cette plante présentaient des défauts sévères du développement du crâne et de la tête associés parfois à une cyclopie. Ces molécules possèdent des propriétés tératogènes rappelant le syndrome SLOS chez l'humain. Pour cette raison et pour leur similitude avec la structure chimique du cholestérol, ces molécules ont initialement été proposées comme des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol.

En 1998, les travaux de P. Beachy démontrent que la cyclopamine est un inhibiteur de la voie de signalisation Hh. Elle induit l'expression de marqueurs dorsaux (Pax7) et réprime celle de marqueurs ventraux (Isl1 et HNF3 β) dans des explants de tube neural d'embryons de poulet, en opposition avec les effets de Shh dans ce modèle (Cooper *et al.*, 1998 ; Incardona *et al.*, 1998).

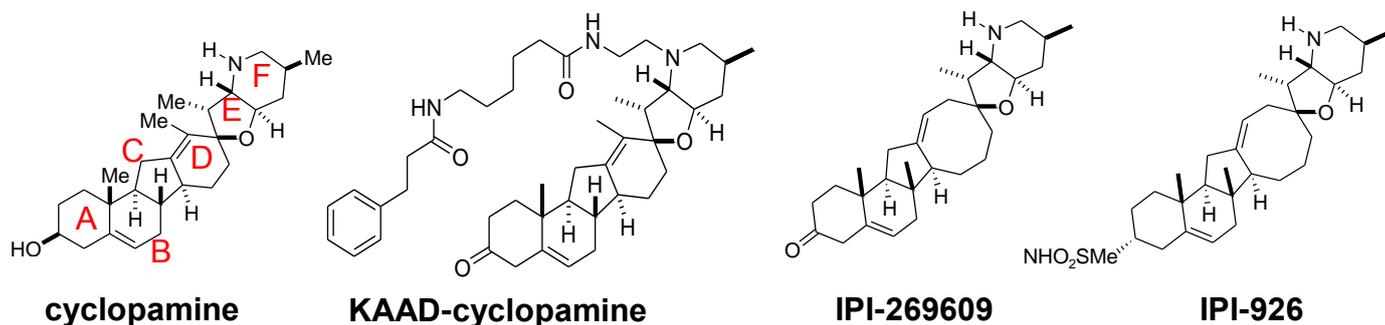


Figure 15 : Structures de la cyclopamine et de ses dérivés.

La cyclopamine est constituée de cinq cycles notés de A à F (rouge). L'addition d'une cétone en position 3 et d'un groupement N-aminoéthyl-aminocaproyl-dihydrocinnamoyl sur la cyclopamine conduit à la KAAD-cyclopamine. La dérivation du cycle D de la cyclopamine et l'addition d'une cétone en position 3 ont conduit à l'IPI-269609. La modification de la chaîne latérale du cycle A de l'IPI-269609 a conduit à la molécule IPI-926, qui a été utilisée en phases cliniques, d'après (Heretsch *et al.*, Bioorg Med Chem, 2010).

La cyclopamine inhibe l'activité Gli-luciférase des cellules NIH3T3 induite par le ligand Shh en empêchant la conversion de la forme inactive de Smo en sa forme active (Taipale *et al.*, 2000). L'interaction directe de la cyclopamine avec le récepteur Smo a été mise en évidence grâce à l'utilisation d'un dérivé de photo-affinité de la cyclopamine (PA-cyclopamine) et du dérivé fluorescent BC sur des cellules transfectées par le récepteur hSmo (Chen *et al.*, 2002a). Comparée aux autres antagonistes de Smo décrits, la cyclopamine induit la translocation du récepteur Smo dans le cil primaire des cellules de mammifères (**Figure 16**, (Rohatgi *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2009)). Étant la première molécule antagoniste de Smo, la cyclopamine a été largement utilisée *in vivo*. De nombreuses études ont rapporté son effet inhibiteur sur divers modèles de tumeurs du système nerveux central (Berman *et al.*, 2002 ; Romer *et al.*, 2005 ; Clement *et al.*, 2007), de la prostate (Karhadkar *et al.*, 2004), du colon (Varnat *et al.*, 2009) ou de la peau (Stecca *et al.*, 2007). Toutefois, ces effets ont été remis en question car ils pourraient être liés à ses actions sur d'autres voies de signalisation (Yauch *et al.*, 2008). Chez l'Homme, la cyclopamine a été testée par voie cutanée pour traiter des BCC mais la fréquence des applications nécessaires, et possiblement son manque d'efficacité, a conduit à l'interruption de son développement clinique (Tabs *et al.*, 2004). Les propriétés pharmacologiques et physico-chimiques de la cyclopamine, comme sa faible solubilité et son instabilité en milieu acide (Giannis *et al.*, 2009) ont incité plusieurs équipes à identifier des dérivés de meilleure affinité, plus stables et plus solubles.

2.2.2 Antagonistes semi-synthétiques

L'une des premières molécules inhibitrices semi-synthétiques fut la **KAAD-cyclopamine** (**Figure 15**), une molécule qui présente à la fois une affinité 10 à 20 fois meilleure que celle de la cyclopamine avec une CI_{50} de 20 nM pour inhiber l'activité Gli-luciférase de cellules Shh-light2, et une cytotoxicité réduite (Taipale *et al.*, 2000).

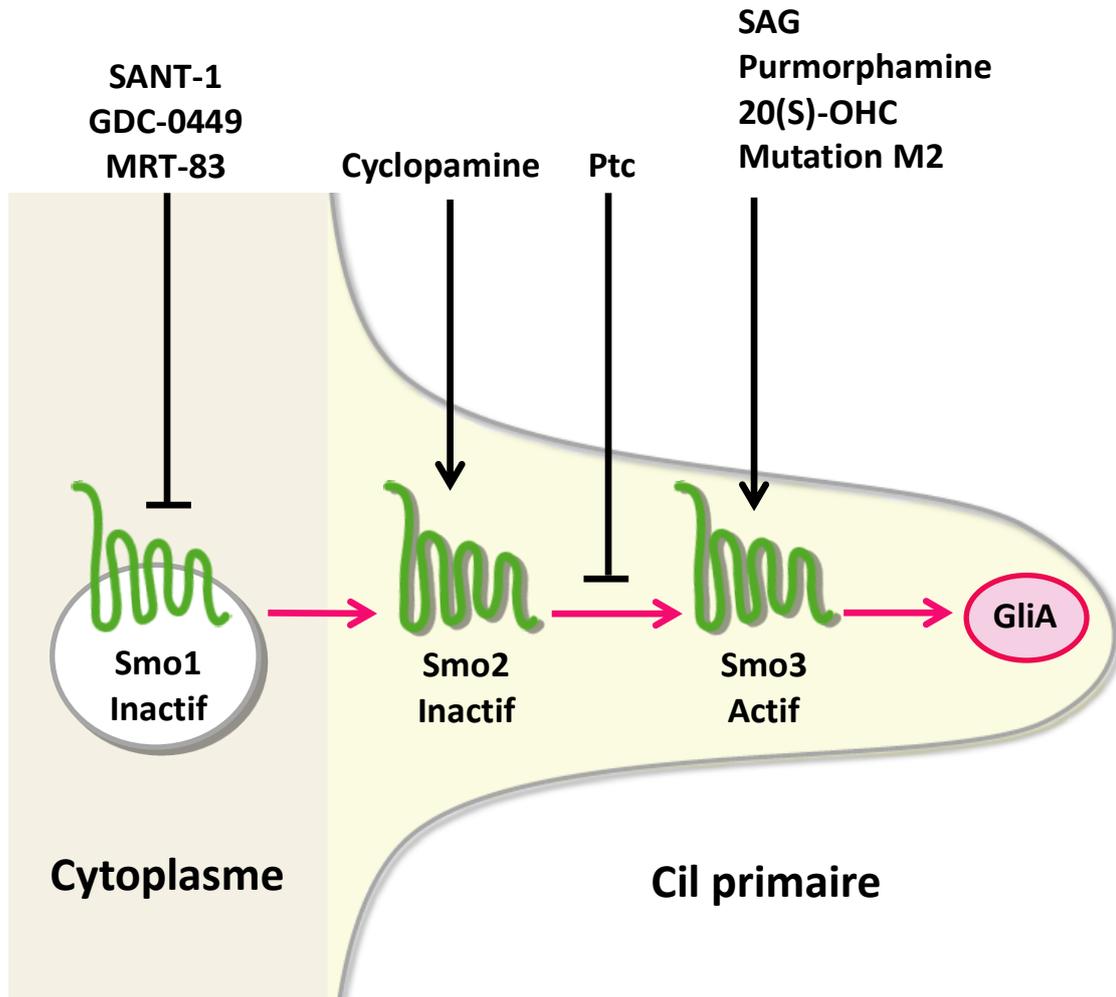


Figure 16 : Modèle d'activation du récepteur Smoothened chez les vertébrés.

L'activation complète du récepteur Smoothened (Smo) requiert deux étapes. Premièrement, Smo1 est transloqué dans le cil primaire dans une forme inactive (Smo2) puis est activé (Smo3). Smo3 peut activer la signalisation en aval conduisant à l'activation des facteurs de transcription Gli (GliA). Les composés SANT-1, GDC-0449 et MRT-83 bloquent la forme inactive de Smo1 au niveau du cytoplasme et inhibent sa translocation au cil primaire. La cyclopamine permet la translocation de la forme inactive Smo2 au cil primaire. Les composés agonistes SAG et 20(S)-hydroxycholestérol (20(S)-OHC) et la mutation M2, qui active constitutivement Smo, induisent la translocation de la forme active Smo3 qui induit l'activation des facteurs GliA, d'après (Ruat, Hoch *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2014).

L'**IPI-269609** et l'**IPI-926** (**Figure 15**) sont d'autres dérivés semi-synthétiques de la cycloamine développés par le laboratoire Infinity. Des modifications de structures ont permis d'obtenir une meilleure stabilité en milieu acide ainsi qu'une meilleure solubilité. L'IPI-269609 a été testé dans des modèles *in vitro* et *in vivo* pour bloquer la voie Hh. Il présente des effets semblables à la cycloamine. Il inhibe l'expression de la Gli-luciférase, diminue l'expression des gènes cibles *Gli1* et *Ptc* et empêche la migration cellulaire induite par Shh (Feldmann *et al.*, 2008). De plus, il inhibe le développement de tumeurs pancréatiques humaines dans un modèle de xénogreffes et empêche l'apparition de métastases (Feldmann *et al.*, 2008). Des études de structures-activités ont conduit au composé IPI-926 plus puissant et présentant une meilleure stabilité métabolique. Il inhibe la liaison de la BC avec une CI_{50} de 1.4 nM et a également montré une efficacité *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de tumeurs pulmonaires et pancréatiques (Tremblay *et al.*, 2009). Dans un modèle de cancer pancréatique hautement invasif, l'IPI-926 augmente la survie des animaux en bloquant la signalisation Hh dans le stroma environnant les cellules tumorales. Cet effet est retrouvé lorsqu'il est utilisé en combinaison avec la gemcitabine dans un modèle de tumeur résistante à ce produit. L'IPI-926 augmente également la néovascularisation de la tumeur, ce qui facilite la distribution de la gemcitabine aux cellules malignes (Olive *et al.*, 2009). L'IPI-926 a été inclus dans des essais cliniques de phase I et II pour le traitement de cancers du pancréas solides ou métastatiques et de BCC mais le manque d'efficacité du composé a conduit à l'arrêt de ces études (Williams, 2013).

2.2.3 Antagonistes de synthèse

Le **Cur61414** (**Figure 17**) est la première petite molécule de synthèse, inhibiteur de la voie Hh, découverte par le laboratoire Curis en 2003 (Williams *et al.*, 2003). Ce composé

inhibe la prolifération et induit l'apoptose de cellules tumorales dans différents modèles *in vitro* de BCC de souris $Ptc^{+/-}$. En 2005, des essais cliniques de phase 1 ont démarré pour le traitement topique de BCC humains, mais ont été interrompus un an plus tard, en raison de l'absence d'effets cliniques significatifs et de l'incapacité du produit à diminuer le niveau d'expression de *Gli1* dans les tissus atteints. Il a été proposé qu'une différence de pénétration de la molécule à travers la peau humaine et murine puisse expliquer ces différences. Les résultats d'une étude comparant les effets d'une formulation topique de Cur61414 sur un modèle murin de BCC et chez des patients atteints de BCC nodulaires ou superficiels confirment cette observation. Dans le modèle murin, le Cur61414 diminue les niveaux d'expression des gènes cibles de la voie, le volume tumoral et la prolifération des cellules de BCC alors qu'aucun effet n'est observé chez les patients (Tang *et al.*, 2011b).

En collaboration avec une équipe de St Jude's Children's Research Hospital à Memphis aux États-Unis, le laboratoire Curis a également développé le **HhAntag691 (Figure 17)**. Cet antagoniste diminue les niveaux d'expression des gènes cibles de la voie Hh, le volume tumoral et la prolifération des cellules de MB dans un modèle murin $Ptc^{+/-}$ $p53^{-/-}$ après son administration quotidienne à 100 mg/kg (Romer *et al.*, 2004).

Le **GDC-0449 (Vismodegib, Figure 17)** est un dérivé du HhAntag développé par le laboratoire Genentech. Actuellement, le GDC-0449 est inclus dans une cinquantaine d'essais cliniques pour le traitement de tumeurs Hh-dépendantes. À ce jour, il est l'unique inhibiteur du récepteur Smo approuvé par la FDA. Il a été mis sur le marché en janvier 2012 pour le traitement de BCC après des résultats très encourageants obtenus lors d'un essai clinique incluant 33 patients ayant des BCC localisés ou métastatiques (Von Hoff *et al.*, 2009).

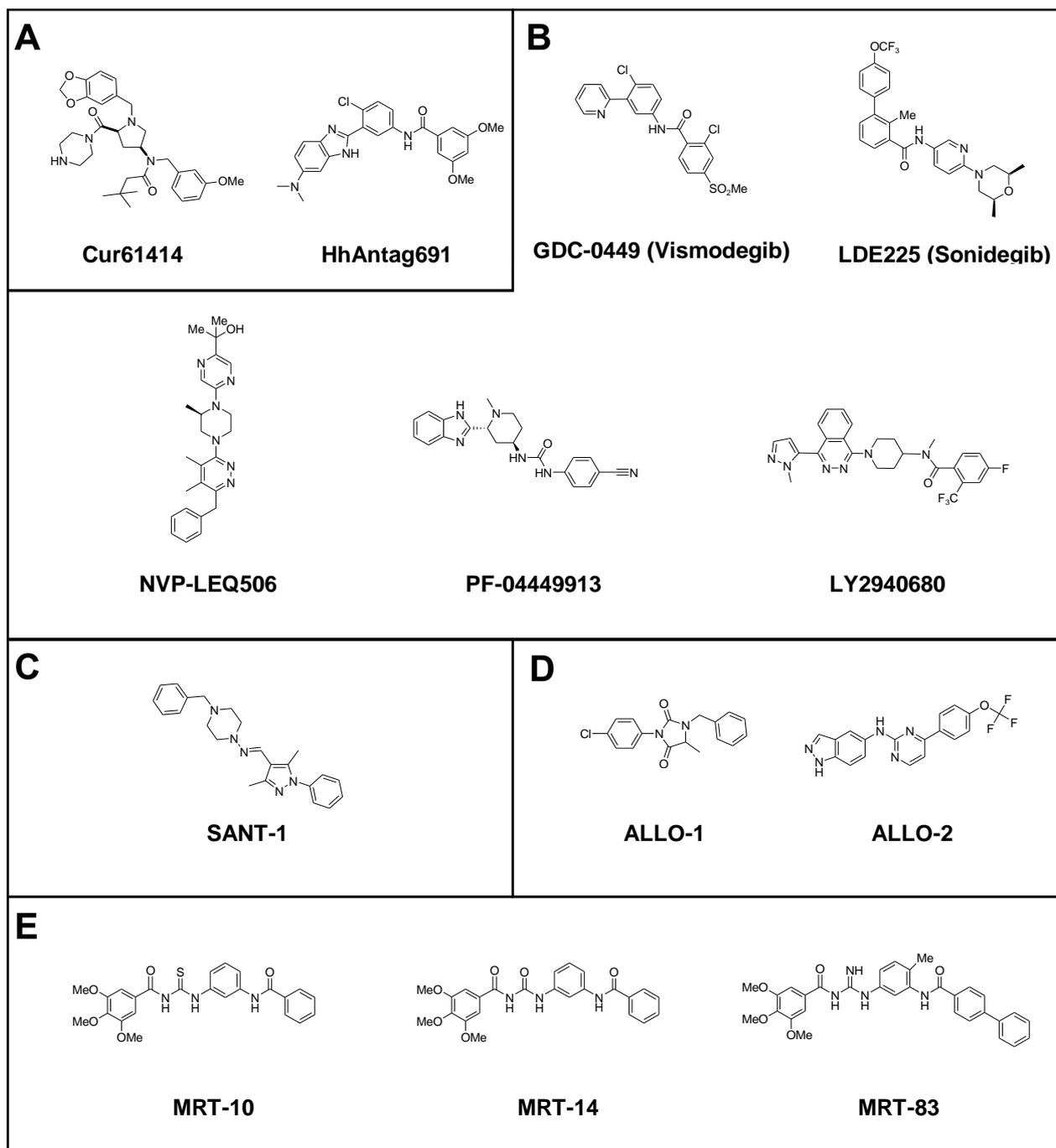


Figure 17 : Structures des principaux antagonistes du récepteur Smoothened.

A. Structures du composé Cur61414 et de son dérivé HhAntag691. B. Structure des composés GDC-0449, LDE225, LEQ-506, PF-04449913 et LY2940680 utilisés en clinique. C. Structures du composé SANT-1. D. Structures des composés ALLO-1 et ALLO-2 efficaces sur le récepteur Smo de souris résistante au GDC-0449 (mSmoD477G). E. Structures de l'acylthiourée MRT-10, l'acylurée MRT-14 et de l'acylguanidine MRT-83, d'après (Hoch *et al.*, *Faseb J*, 2015 ; Hadden, *Expert Opin Ther Pat*, 2013 ; Roudaut *et al.*, *Mol Pharmacol*, 2011 ; Tao *et al.*, *Chem Biol*, 2011 ; Manetti *et al.*, *Mol Pharmacol*, 2010).

In vitro, ce composé soluble et stable inhibe à très haute affinité l'activité Gli-luciférase induite par la protéine Shh dans les cellules Shh-light2 (CI₅₀ = 13 nM).

Malgré cette forte affinité, des résistances à ce traitement ont été observées (**Figure 18**). La première résistance a été observée chez un patient atteint d'une forme métastasée de médulloblastome réfractaire à de multiples thérapies et traitée par voie orale avec le GDC-0449 (Rudin *et al.*, 2009). Malgré une rapide régression de la tumeur et des symptômes associés, le patient a progressivement développé une résistance à la molécule qui s'est rapidement révélée associée à l'apparition d'une mutation ponctuelle transformant le résidu aspartate 473 de Smo en un résidu histidine (D473H) empêchant la liaison de la molécule sur Smo et la rendant inactive (Yauch *et al.*, 2009). Cette mutation a également été identifiée dans un modèle de MB murins traité par le GDC-0449. Par la suite, la société Genentech a identifié que la mutation du résidu glutamate 518 de Smo en un résidu lysine entraîne une résistance au composé GDC-0449 (Dijkgraaf *et al.*, 2011). Cependant, cette mutation n'a jusqu'à présent pas été identifiée chez un patient ou dans un modèle murin. Enfin, récemment des analyses de biopsies de BCC localisés ou métastatiques ont permis d'identifier de nouvelles mutations résistantes au GDC-0449 : H231R, T241M, W281C, V321M, I408V, L412F, A459V, F460L, C469Y, Q477E, S533N, W535L et Q635E (Atwood *et al.*, 2015 ; Sharpe *et al.*, 2015a). Ces mutations apparaissent sélectivement après un traitement au GDC-0449, à l'exception de la mutation W535L (mutation SmoM2) (Sharpe *et al.*, 2015a). Les acides aminés mutés peuvent être localisés dans le site de liaison du GDC-0449 et empêcher sa fixation, ou peuvent être localisés hors du site de liaison et entraîner une modification de la conformation de Smo conduisant à l'activation constitutive du récepteur. Des thérapies combinées avec d'autres antagonistes de Smo sont envisagées, cependant comme les principaux antagonistes de Smo actuellement en phase clinique partagent un

même site de liaison (voir partie 4), certaines mutations peuvent affecter l'efficacité de plusieurs antagonistes (Sharpe *et al.*, 2015a). L'administration d'inhibiteurs agissant en aval du récepteur Smo, notamment au niveau des protéines Gli (voir partie 3), est actuellement en étude pour contrecarrer ces apparitions de résistance (Hadden, 2015); et pour revue, (Pandolfi *et al.*, 2015).

Le **LDE225** (Sonidegib, **Figure 17**) est une molécule développée par la société Novartis, actuellement incluse dans une trentaine d'essais cliniques. Cette molécule a été découverte lors d'un criblage à haut débit de plusieurs banques de molécules basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par la protéine Shh (Pan *et al.*, 2010). Son affinité est de l'ordre du nanomolaire. Le LDE225 inhibe également la liaison de la BC sur les récepteurs Smo humains et murins ($CI_{50} = 8$ nM). Le LDE225 présente une bonne biodisponibilité et une faible clairance chez le rat, le chat, le chien et l'Homme. Son efficacité antitumorale a été démontrée sur un modèle d'allogreffes de MB murin. Son administration par voie orale (20 mg/kg/jour) réduit de 83 % le développement de la tumeur et de 100 % les taux d'expression du gène *Gli1*, ce qui démontre sa capacité à pénétrer la barrière hémato-encéphalique (Pan *et al.*, 2010).

Des processus de résistance sont également apparus chez la souris lors de traitements de MB par ce composé, faisant intervenir des mécanismes variables tels qu'une amplification chromosomique de *Gli2*, et plus rarement, des mutations ponctuelles du récepteur Smo qui conduisent à la réactivation de la signalisation Hh et de la croissance tumorale (**Figure 18**). Une régulation positive de la signalisation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) a également été mise en évidence.

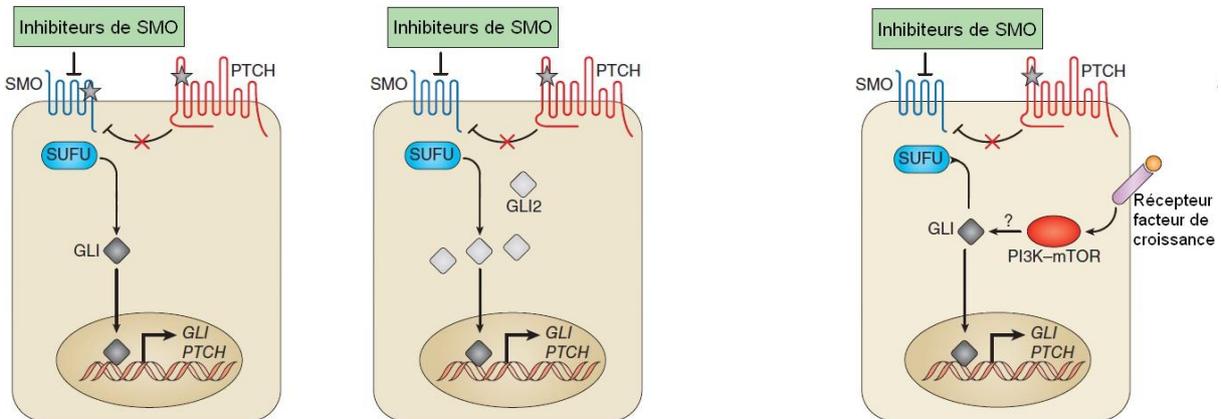
A. Mutations de Smo B. Amplification de Gli2 C. Augmentation de la signalisation PI3K


Figure 18 : Mécanismes de résistance observés après le traitement de médulloblastomes ou de carcinomes basocellulaires par des inhibiteurs du récepteur Smoothened.

A. Des mutations du récepteur Smoothened (Smo) ont été identifiées comme résistantes au traitement de médulloblastomes (MB) ou de carcinomes basocellulaires (BCC) par le GDC-0449 chez l'Homme (H231R, T241M, W281C, V321M, I408V, L412F, A459V, C469Y, F460L, D473H, Q477E, S533N, W535L, Q636E) et la souris (D477G) ou par le LDE225 chez la souris (N223D, L225R, D388N, S391N, G457S). Une étude de mutagenèse dirigée a également identifié la mutation du Smo humain E518K comme résistante au GDC-0449 B. Une amplification du gène *Gli2* a également été identifiée comme un mécanisme de résistance au traitement de MB murins par le GDC-0449 et le LDE225. C. L'augmentation de la signalisation PI3K est un autre mécanisme de résistance identifié lors du traitement de MB murins par le LDE225 dont l'origine et le lien avec la signalisation Hedgehog sont encore méconnus, d'après (Amakye *et al.*, Nat Med, 2013 ; Atwood *et al.*, Cancer Cell, 2015 ; Sharpe *et al.*, Cancer Cell, 2015).

Elle a permis de montrer l'efficacité de l'association d'un inhibiteur de la PI3K et du LDE225 afin de retarder le développement de la résistance (Buonamici *et al.*, 2010). L'efficacité du LDE225 pour le traitement de BCC a également été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*. Il inhibe la formation de tumeur ou induit une régression tumorale importante dans des cultures d'échantillons de peau issus de souris $Ptc^{+/-}$, et son application cutanée chez huit patients atteints du syndrome de Gorlin éradique totalement ou partiellement le développement de BCC (Skvara *et al.*, 2011). Ce composé est actuellement inclus dans des essais cliniques de phase I et II pour le traitement de tumeurs solides avancées, de BCC et de MB ; pour revue (Amakye *et al.*, 2013). Selon le type de tumeurs, le LDE225 est testé en combinaison avec d'autres molécules.

Le laboratoire Novartis a plus récemment développé un nouveau dérivé, le **NVP-LEQ506 (Figure 17)**, un inhibiteur de seconde génération possédant une meilleure solubilité et une forte affinité (Peukert *et al.*, 2013). Ce composé inhibe la liaison du [3 H]Hh.Ag 1.5 au récepteur Smo humain et murin ($CI_{50} = 2$ nM) et conserve son activité pour le récepteur mutant D473H. Son efficacité antitumorale a été démontrée dans un modèle d'allogreffes de MB murin (Peukert *et al.*, 2013). Malgré son fort potentiel thérapeutique, le composé n'a pas été inclus dans un essai clinique.

D'autres composés de différents laboratoires pharmaceutiques ont été développés au cours des dernières années. Le **BMS-833923** (Exelixis / Bristol-Myers Squibb), le **PF-044449913** (Pfizer) et le **LY2940680** (Eli Lilly) sont actuellement inclus dans des essais cliniques pour le traitement de tumeurs solides, de BCC ou de leucémies myéloïdes chroniques ; pour revues (**Figure 17**, (Amakye *et al.*, 2013 ; Pandolfi & Stecca, 2015)). Ces molécules ont été sélectionnées par des études de structure-activité mettant en jeu la

signalisation Hh et leur efficacité a été démontrée sur des modèles murins de tumeurs Hh-dépendantes.

Les composés **SANT-1 (Figure 17)**, **SANT-2**, **SANT-3** et **SANT-4** ont été découverts lors d'un criblage à haut débit basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par la protéine Shh. Ces composés présentent des CI_{50} comprises entre 20 et 200 nM (Chen *et al.*, 2002b). Ils se fixent au récepteur Smo au niveau du site de la BC puisqu'ils inhibent la liaison de ce ligand fluorescent. Cependant, ces composés ont des mécanismes d'action différents, par exemple SANT-1 et SANT-3 n'inhibent cette liaison que partiellement. De même SANT-3 ne bloque que partiellement l'activité constitutive du mutant oncogénique SmoA1 et contrairement à la cyclopamine, SANT-1 et SANT-2 bloquent l'activité du récepteur Smo en empêchant sa translocation au cil primaire (Rohatgi *et al.*, 2009). Les antagonistes SANT-1 et SANT-2 inhibent de façon allostérique la liaison du radioligand [3 H]SAG, mais de façon compétitive celle du radioligand [3 H]cyclopamine suggérant donc des spécificités d'interaction de ces deux composés avec Smo. Le déplacement compétitif de la [3 H]cyclopamine par SANT-1 ne reflète pas le déplacement partiel observé précédemment pour la BC suggérant des différences d'interaction de la [3 H]cyclopamine et de la BC avec le récepteur Smo (Rominger *et al.*, 2009). Ces résultats corrélerent aujourd'hui avec les données de la cristallisation du récepteur hSmo en présence de l'antagoniste SANT-1 (voir partie 4). Les composés SANT n'ont été utilisés que dans un nombre limité de modèles animaux *in vivo*. SANT-1, contrairement à SANT-2, est efficace pour empêcher le développement pileux chez la souris (Li *et al.*, 2010). Des dérivés du composé SANT-1 ont été développés en remplaçant la fonction hydrazone par une amine et ont conduit à des affinités comprises entre 100 et 200 nM pour le récepteur Smo. Ces dérivés sont capables d'inhiber le développement pileux de manière comparable au composé de

référence utilisé pour les pathologies liées à un dérèglement de la pilosité, l'eflornithine (Buttner *et al.*, 2009).

Enfin, les composés **ALLO-1** et **ALLO-2** (**Figure 17**) ont été découverts lors d'un criblage à haut débit basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par le composé SAG1.5. ALLO-1 et ALLO-2 présentent des CI_{50} de 50 et 6 nM, respectivement (Tao *et al.*, 2011). Leur efficacité antitumorale a été démontrée sur un modèle d'allogreffes de MB murin. Concernant leur site de liaison, ces composés inhibent la liaison de la BC. Cependant, ils n'inhibent pas la liaison du [3H]SAG1.5 à Smo et seul ALLO-2 inhibe la liaison de la [3H]cyclopamine à Smo. De plus, ALLO-1 et ALLO-2 inhibent l'activité Gli-luciférase et la prolifération cellulaire de cellules exprimant le récepteur Smo murin D477G résistant au GDC-0449 suggérant des sites de liaisons différents de ceux préalablement décrits pour ces deux composés.

Notre équipe a récemment identifié une nouvelle famille d'antagonistes de Smo, les composés MRT, dont le **MRT-10** et le **MRT-14** (**Figure 17**), grâce à un criblage virtuel à l'aide d'un modèle pharmacophorique des interactions de Smo avec des molécules précédemment identifiées comme capables de bloquer son activité (Manetti *et al.*, 2010). Une étude de structure-activité a permis de développer le composé **MRT-83** (**Figure 17**) qui est aussi puissant que le GDC-0449 pour bloquer Smo (Roudaut *et al.*, 2011). Au cours de mon travail de thèse, j'ai optimisé la structure chimique de nos composés MRT afin d'obtenir le **MRT-92**, l'un des plus puissants antagonistes de Smo connu à l'heure actuelle (Hoch *et al.*, 2015).

2.2.4 Autres molécules

Le criblage d'environ 2 400 molécules approuvées par la FDA ou ayant atteint un essai clinique de phase 1, basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par la protéine Shh, a permis d'identifier l'**itraconazole** comme un nouvel inhibiteur de la voie Hh. Cette petite molécule habituellement utilisée en tant qu'antifongique inhibe la signalisation Hh avec une affinité de 800 nM et empêche l'accumulation du récepteur Smo dans le cil primaire (Kim *et al.*, 2010b). L'utilisation de cellules délétées pour le gène *Ptc* révèle que l'itraconazole agit en aval de Ptc. L'itraconazole est un inhibiteur d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, mais le fait que des antifongiques de la même série n'inhibent pas la voie Hh permet d'exclure que l'effet observé sur la voie Hh soit la conséquence du blocage de la biosynthèse du cholestérol. L'effet antitumoral de l'itraconazole a été montré sur le développement de BCC dans un modèle murin et suggère que ce composé pourrait être testé en clinique, seul ou en combinaison avec d'autres thérapies, chez des patients atteints de tumeurs Hh-dépendantes. Au cours de mon travail de thèse, j'ai démontré que l'itraconazole se lie au récepteur Smo avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Hoch *et al.*, 2015).

3. Modulateurs d'autres composantes de la voie de signalisation Hh

En dehors des modulateurs du récepteur Smo, la voie de signalisation Hh peut également être modulée par des inhibiteurs, des produits naturels ou synthétiques en amont ou en aval de Smo.

3.1. Inhibiteurs de la protéine Shh

L'anticorps monoclonal de souris **5E1** reconnaît le ligand Shh et s'est révélé être un très bon outil pharmacologique pour bloquer la protéine Shh (Ericson *et al.*, 1996). Cet anticorps présente, *in vivo* sur des modèles de tumeurs dépendantes du ligand, une activité comparable aux antagonistes de Smo (Yauch *et al.*, 2008). Des études biochimiques, biophysiques et une analyse cristallographique d'un anticorps chimère murin:humain 5E1 démontrent que l'anticorps se fixe au niveau d'un site pseudo-actif de Shh qui se superpose en partie avec le site de liaison de l'antagoniste naturel de Shh, la protéine Hip (Maun *et al.*, 2010).

Lors d'un criblage d'une banque de 10 000 molécules naturelles ou synthétiques en vue de détecter des molécules capables d'interagir avec le ligand Shh, la petite molécule macrocyclique **Robotnikinin** a été identifiée. Sa liaison au ligand Shh a été démontrée par mesure de la résonance des plasmons de surface. La Robotnikinin bloque la signalisation Hh de façon dose-dépendante dans des lignées cellulaires, des cultures primaires de kératinocytes et dans un modèle synthétique de peau humaine et ne présente aucun effet cytotoxique (Stanton *et al.*, 2009). Des molécules analogues ont été développées mais leurs activités biologiques de l'ordre du micromolaire limitent leur intérêt pour le traitement de cancers Hh-dépendants (Peng *et al.*, 2009).

3.2 Inhibiteurs des facteurs de transcription Gli

Le développement de molécules capables de réguler la voie de signalisation Hh en aval de Smo pourrait être une alternative aux antagonistes de Smo dans le cas de tumeurs liées à

des mutations en aval de Smo ou encore à des mutations de Smo résistantes aux antagonistes disponibles. À ce jour, seulement quelques molécules agissant sur les protéines Gli ont été identifiées et leur utilisation est limitée à des études précliniques.

Les composés **GANT58** et **GANT61** ont été découverts lors d'un criblage à haut débit basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par le composé SAG et possèdent une CI_{50} d'environ 5 μ M (Lauth *et al.*, 2007). Ces composés agissent au niveau nucléaire et inhibent les fonctions transcriptionnelles de Gli. GANT61 interfère notamment avec la liaison de *Gli1* à l'ADN. Son administration sous-cutanée (25 mg/kg/jour pendant 18 jours) dans un modèle murin de xénogreffes de cancer de la prostate humain induit une régression du volume tumoral accompagné par une forte réduction de la transcription du gène de *Ptc*.

Un criblage de produits naturels et d'extraits de plantes a également identifié les physalines comme inhibiteurs de *Gli1*. La **Physaline F** et la **Physaline B** réduisent l'activité de *Gli1* avec une CI_{50} de 0.66 μ M et de 0.62 μ M, respectivement. Ces deux molécules réduisent également l'activité de *Gli2* avec une CI_{50} de 1.5 μ M et 1.4 μ M, respectivement. Ces deux composés sont cytotoxiques pour le développement de lignées cancéreuses du pancréas PANC1 (CI_{50} de 2.6 et 5.3 μ M), et induisent une diminution de la transcription des gènes *Gli1*, *Gli2* et *Ptc*. Cependant, il est possible que l'effet antagoniste soit indirect par un blocage de la voie PKC / MAPK (Hosoya *et al.*, 2008).

Quatre autres antagonistes des facteurs de transcription Gli (**HPI1-4**) ont été identifiés par criblage à haut débit (Hyman *et al.*, 2009). Chacun de ces composés inhibe la voie de signalisation Hh à de faibles concentrations micromolaires (CI_{50} =1-10 μ M). Ces composés

n'inhibent pas la liaison de la BC au récepteur Smo et l'utilisation de construction FLAG-Gli1 ou FLAG-Gli2 a permis de montrer qu'ils modulent la régulation, la stabilité, la localisation et la fonction des facteurs de transcription Gli. HPI-1 agit indépendamment du cil primaire, en inhibant probablement la modification post-traductionnelle de Gli ou l'interaction des facteurs Gli avec d'autres cofacteurs. HPI-2 et HPI-3 bloquent la conversion de la forme longue de Gli2 en sa forme activatrice. Enfin, HPI-4 interfère avec la ciliogenèse et inhibe donc indirectement l'activation des facteurs de transcription Gli normalement exprimés dans cette structure (Hyman *et al.*, 2009).

L'équipe de P. Beachy a montré que les dérivés de l'arsenic, dont l'**arsenic trioxide (ATO)**, sont de puissants inhibiteurs de l'activité Gli-luciférase ($CI_{50} = 0.7 \mu M$) et bloquent l'activation de la voie Hh induite par la forme SmoM2 ou par l'inactivation de *Sufu*. De plus, ATO bloque l'accumulation du facteur Gli2 dans le cil primaire et son administration sous-cutanée (2-10 mg/kg/jour pendant 23 jours) dans un modèle murin de xénogreffes de MB, résistants à l'antagoniste GDC-0449 (mutant murin D477G), induit une régression significative du volume tumoral (Kim *et al.*, 2010a). Une seconde étude propose une interaction directe entre l'ATO et Gli1 et montre qu'ATO abolit à la fois le développement de cellules issues de sarcomes humains dans un modèle de xénogreffes ainsi que celui de MB dans un modèle murin (Beauchamp *et al.*, 2011). Le mécanisme d'action des dérivés de l'arsenic dont ATO sur la voie Hh mérite d'être clarifié, néanmoins ces dérivés sont une alternative à considérer pour le traitement de cancers Hh-dépendants ne répondant pas aux antagonistes de Smo. De plus, ATO a déjà été utilisé en phase clinique pour le traitement de leucémies promyélocyaires aiguës ; pour revue (Watts *et al.*, 2014).

Le **pyrvinium**, un agent antiparasitaire approuvé par la FDA et utilisé dans le traitement des oxyures, a récemment été montré comme étant un inhibiteur de la voie Hh en agissant sur la stabilité des facteurs de transcription Gli. Le pyrvinium est capable d'inhiber l'activité du récepteur Smo résistant au GDC-0449 (D473H) et l'activité des protéines Gli résultant de la perte de Sufu, ainsi que de réduire la croissance tumorale dans un modèle d'allogreffes de MB murin (Li *et al.*, 2014).

La **Glabrescione B**, une isoflavone naturellement présente dans les graines de la plante *Derris glabrescens*, a été identifiée comme la première petite molécule capable de se lier au domaine dit à « doigt de zinc » de *Gli1* et d'interférer avec sa liaison à l'ADN. L'inhibition de l'activité de *Gli1* par Glabrescione B réduit la croissance *in vitro* et *in vivo* de BCC et MB Hh-dépendant ainsi que la capacité d'autorenouvellement et de clonogénicité des CSC (Infante *et al.*, 2015).

L'inhibition des protéines à bromodomaine (BET) est une nouvelle stratégie qui a récemment émergé pour cibler épigénétiquement l'inhibition de la voie Hh. La protéine BET Brd4 est un régulateur critique de la transcription de *Gli1* et *Gli2* puisqu'elle occupe leur promoteur. Il a été montré que **JQ1**, un inhibiteur de la protéine Brd4 permet de réduire la croissance tumorale de modèles d'allogreffes ou de culture de BCC et de MB dérivés de patients ayant une activation constitutive de la voie Hh ainsi que de MB murins sensibles ou résistants au GDC-0449. Néanmoins, les effets potentiellement toxiques des inhibiteurs de BET restent à élucider (Tang *et al.*, 2014).

D'autres composés peuvent inhiber la voie de signalisation Hh par des protéines et/ou des voies de signalisation qui modulent les facteurs de transcription Gli. Par exemple, la

forskoline inhibe la voie de signalisation Hh par l'activation de la PKA, qui à son tour est impliquée dans la phosphorylation des facteurs Gli2 et Gli3, conduisant à leurs formes répressives (Pan *et al.*, 2009). De façon similaire, l'**imiquimod**, un analogue nucléosidique de la famille des imidazoquinolines approuvé pour le traitement de BCC (Lacarrubba *et al.*, 2011), a été décrit comme un activateur de la phosphorylation des facteurs Gli médié par l'activation de la PKA (Wolff *et al.*, 2013). L'**eggmanone**, un inhibiteur de la phosphodiesterase 4 conduit également à l'activation de la PKA et a récemment été décrit comme un inhibiteur de la voie de signalisation Hh (Williams *et al.*, 2015). La voie de signalisation α PKC- λ a également été associée à l'activation des facteurs de transcription Gli. L'inhibiteur du peptide α PKC myristoylé (**PSI**) inhibe la phosphorylation et l'activation des facteurs de transcription Gli1 dans des modèles d'allogreffes de BCC murin sensibles ou résistants au GDC-0449 (Atwood *et al.*, 2013). Enfin, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation TNF- α /mTOR par la phosphorylation de la protéine S6K1 était corrélée avec une activation de la transcription de Gli1. La **rapamycine**, un inhibiteur de S6K1, permet l'inhibition de Gli1 dans des cellules d'adénocarcinome œsophagien (Wang *et al.*, 2012b).

L'ensemble de ces données suggèrent que l'inhibition des facteurs de transcription Gli représente un nouvel intérêt thérapeutique pour le traitement des tumeurs Hh-dépendantes et notamment pour celles résistantes aux antagonistes de Smo.

4. Les différents sites de liaison des modulateurs de Smoothed

Les récentes données cristallographiques du récepteur Smo en présence de différents modulateurs ont permis de mettre en évidence deux poches de liaison distinctes : une dans le

CRD extracellulaire et une dans le domaine 7TM ; pour revue (Ruat *et al.*, 2014 ; Rognan *et al.*, 2015 ; Sharpe *et al.*, 2015b).

4.1 Le CRD

Le fonctionnement classique des RCPG implique la liaison de ligands dans la région extracellulaire du récepteur qui induit des changements conformationnels du domaine TM et permet de moduler la signalisation en aval. Les ECD des membres de la famille des récepteurs Fzd possèdent la capacité de se lier à de petites molécules hydrophobes dans une poche formée par les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$. L'ECD du récepteur FZ8, qui est l'homologue de structure le plus proche de l'ECD de Smo, peut lier le ligand endogène Wnt sur deux sites différents (Dann *et al.*, 2001 ; Janda *et al.*, 2012). Le fragment palmitoylé de Wnt se lie dans une poche peu profonde de l'ECD de FZ8, appelé site 1 ; tandis que le site de liaison de Wnt, appelé site 2, est situé à l'extrémité opposée et implique des interactions protéine-protéine.

Récemment, des études ont permis de mettre en évidence que le CRD de Smo était le site de liaison des oxystérols (**Figure 19**) et notamment du 20(S)-OHC. Dans un premier temps, la liaison du 20(S)-OHC au récepteur Smo a été démontrée grâce à des techniques de chromatographie d'affinité (Nachtergaele *et al.*, 2012), puis l'utilisation de récepteurs Smo tronqués a permis de mettre en évidence que le CRD était nécessaire pour la liaison du 20(S)-OHC (Myers *et al.*, 2013 ; Nachtergaele *et al.*, 2013). À l'aide de la structure cristallographique du CRD de poisson-zèbre (de l'acide aminé 29 à 195) et d'études par mutagenèse dirigée, le site de liaison du 20(S)-OHC a été défini plus précisément au niveau du site 1 du CRD, la poche hydrophobe formée par les chaînes latérales des hélices du CRD, structurellement analogue au site 1 impliqué dans la liaison du fragment palmitoylé de Wnt

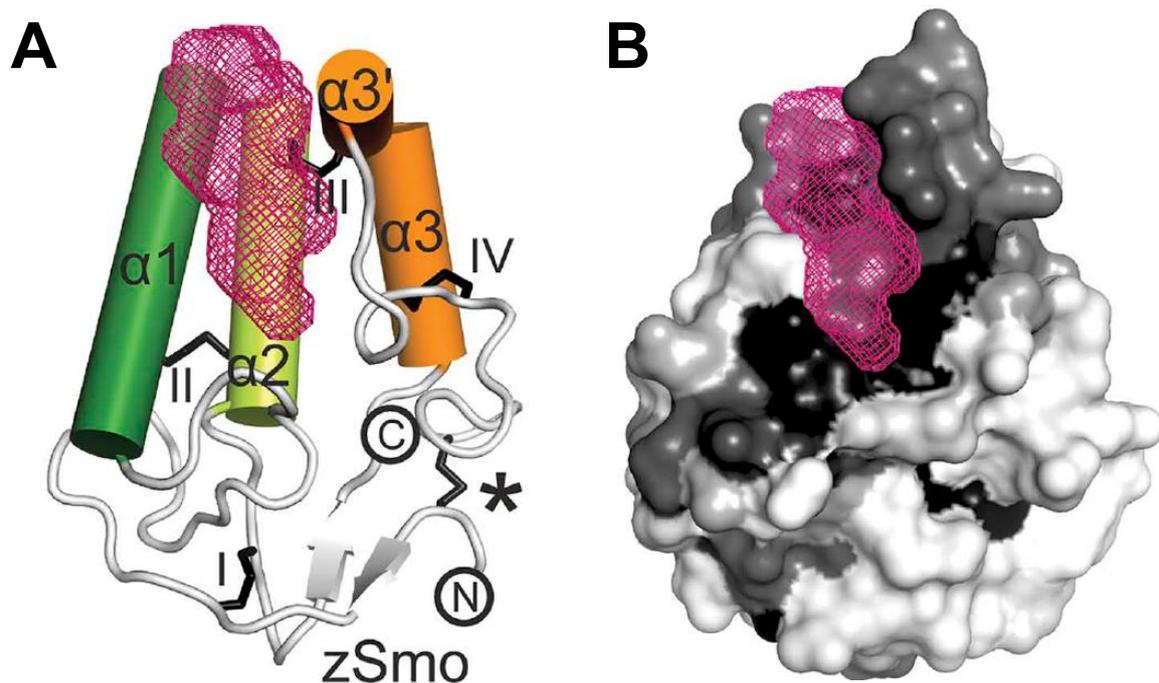


Figure 19 : Cartographie et analyse de la poche de liaison de l'oxystérol dans le domaine amino-terminal du récepteur Smoothened de poisson-zèbre.

A. Structure du domaine riche en cystéines (CRD) du récepteur Smoothened de poisson-zèbre (zSmo). Les hélices alpha sont représentées en formes cylindriques (α -1, α -3), les feuilletts bêta et les spirales sont représentés en gris. Les cinq ponts disulfures sont représentés en bâtons noirs (I-V). Les résidus N- et C-terminaux sont entourés. La poche de liaison de l'oxystérol est représentée en violet. B. La surface du CRD de zSmo est représentée en fonction du niveau de conservation des résidus (de non conservé, blanc, au plus conservé, noir) sur la base d'alignements de séquences d'acides aminés de plus de 80 protéines Smo de vertébrés, d'après (Nachtergaele *et al.*, eLife, 2013).

sur Fz8. Ce site de liaison représente une cible pour l'élaboration d'inhibiteurs de la voie Hh comme le démontre l'utilisation du 22-NHC, un composé structurellement analogue au cholestérol contenant une amine dans sa chaîne latérale qui se lie au niveau du CRD et inhibe la signalisation Hh (Nedelcu *et al.*, 2013).

Une autre étude structurale et d'expression du récepteur Smo a démontré que le glucocorticoïde budénoside interagit avec les résidus du site 1 du CRD pour inhiber le récepteur Smo (Rana *et al.*, 2013), suggérant un site de liaison commun entre les glucocorticoïdes et les oxystérols dans le domaine extracellulaire de Smo.

4.2 Le domaine transmembranaire

Les données cristallographiques du récepteur hSmo associé à différentes molécules comme le LY2940680, la cyclopamine, le SANT-1 ou le SAG1.5 ont mis en évidence deux sites distincts dans le domaine TM (Wang *et al.*, 2013b ; Wang *et al.*, 2014 ; Weierstall *et al.*, 2014). En effet, la cyclopamine, le LY2940680 et le SAG1.5 se lient principalement aux résidus des ECL de Smo (site 1) alors que le SANT-1 pénètre plus profondément dans la cavité et se lie principalement aux résidus du domaine TM (site 2).

Il a été montré que l'ouverture plus ou moins profonde de cette poche de liaison réside de l'état de rotation du résidu leucine 325 du domaine TM3 (**Figure 20**, (Wang *et al.*, 2014)). La chaîne latérale de la leucine 325 dépasse dans la cavité du domaine TM quand le site 2 est inoccupé mais se tourne hors de la cavité en présence du composé SANT-1.

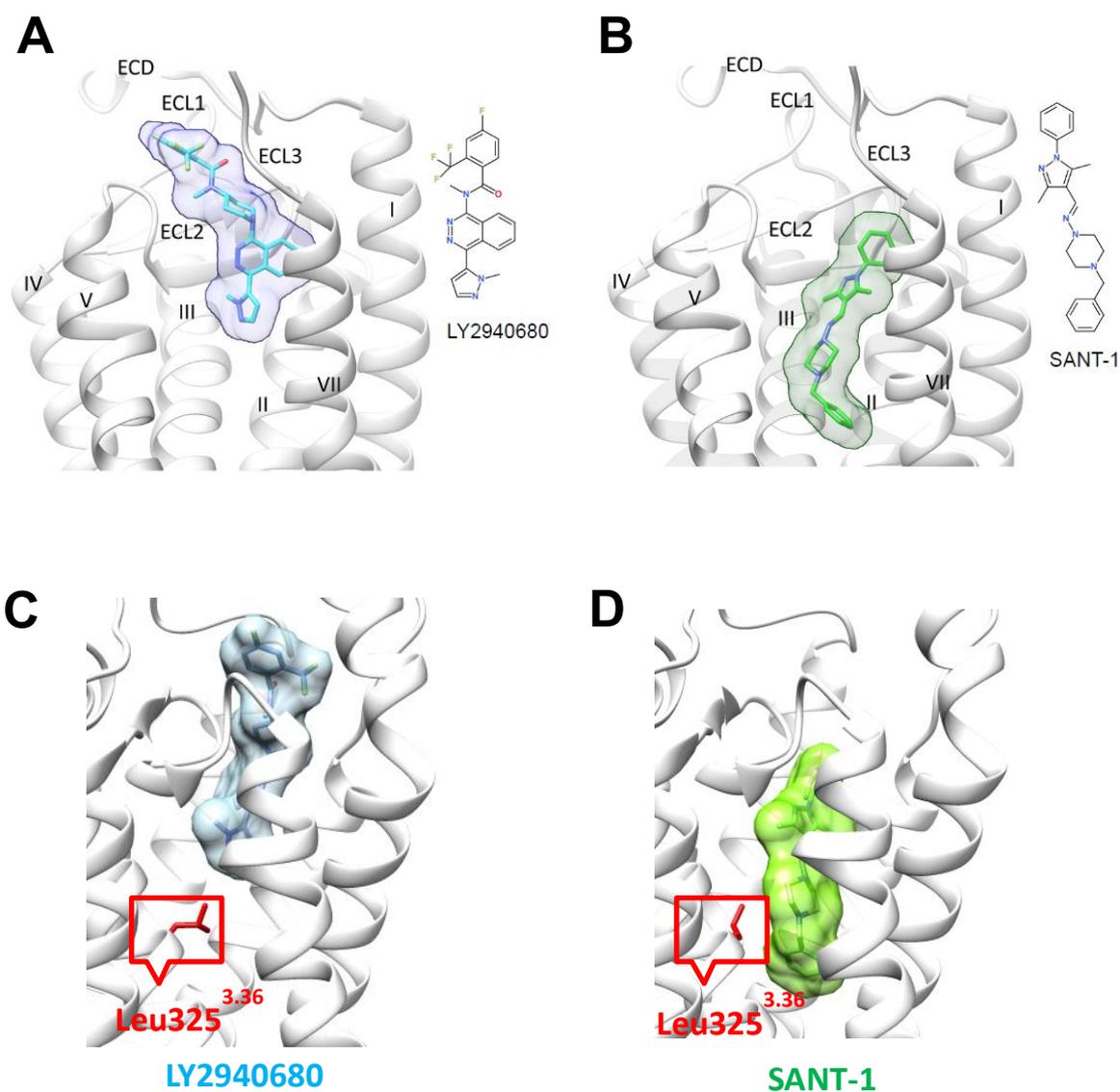


Figure 20 : Structure cristallographique du récepteur Smoothed humain complexé à l'antagoniste LY2940680 (A) ou SANT-1 (B).

La cavité dans laquelle le ligand se lie est représentée en bleu et vert, respectivement. Un agrandissement sur le site de liaison du LY2940680 (C) et du SANT-1 (D) identifie le rôle crucial de la Leu325^{3.36} dont l'état rotamérique influence le volume de la cavité transmembranaire et le niveau de pénétration du ligand dans la cavité, d'après (Hoch *et al.*, FASEB J, 2015 ; Ruat, Hoch *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2014).

Bien que plusieurs composés partagent le même site de liaison, comme la cyclopamine et le SAG1.5 par exemple, les interactions de chaque ligand avec le récepteur Smo ne font pas intervenir les mêmes résidus de la poche (**Figure 21**). Certains peuvent être partagés alors que d'autres sont uniques. Quelques exemples d'interactions clés comprennent les liaisons d'un patient atteint d'un médulloblastome métastatique et traité par le GDC-0449 (Yauch *et al.*, 2009). Cette découverte suggère un rôle important de ces liaisons hydrogène pour la fixation de certains antagonistes (Wang *et al.*, 2013b).

Jusqu'à présent, toutes les données structurales sur le domaine TM ont été recueillies d'après le cristal de Smo dans son état inactif. L'absence d'un changement de conformation de l'hélice VI du domaine TM, typique après la liaison d'un agoniste à un RCPG (Katritch *et al.*, 2013), dans le cristal de Smo complexé au SAG1.5 suggère que la forme active de Smo diffère de la forme cristallisée avec le SAG1.5. Néanmoins, des réarrangements des résidus clés R400, D473 et E518 de la poche de liaison sont observés (**Figure 21C**). Le composé SAG1.5 forme une interaction ionique avec le résidu D473 qui rompt sa liaison avec le résidu E518 observée lors de la cristallisation des antagonistes de Smo (Wang *et al.*, 2014). De plus, la liaison du SAG1.5 modifie les interactions des résidus Y262, H361 et W365 et favorise l'interaction entre les résidus P263 et W535. La mutation du résidu W535 en leucine étant à l'origine de la forme constitutivement active de Smo (SmoM2), il est concevable que le réarrangement des résidus Y262, H361, W365 et P263 ait un impact sur l'activation de Smo (Wang *et al.*, 2014).

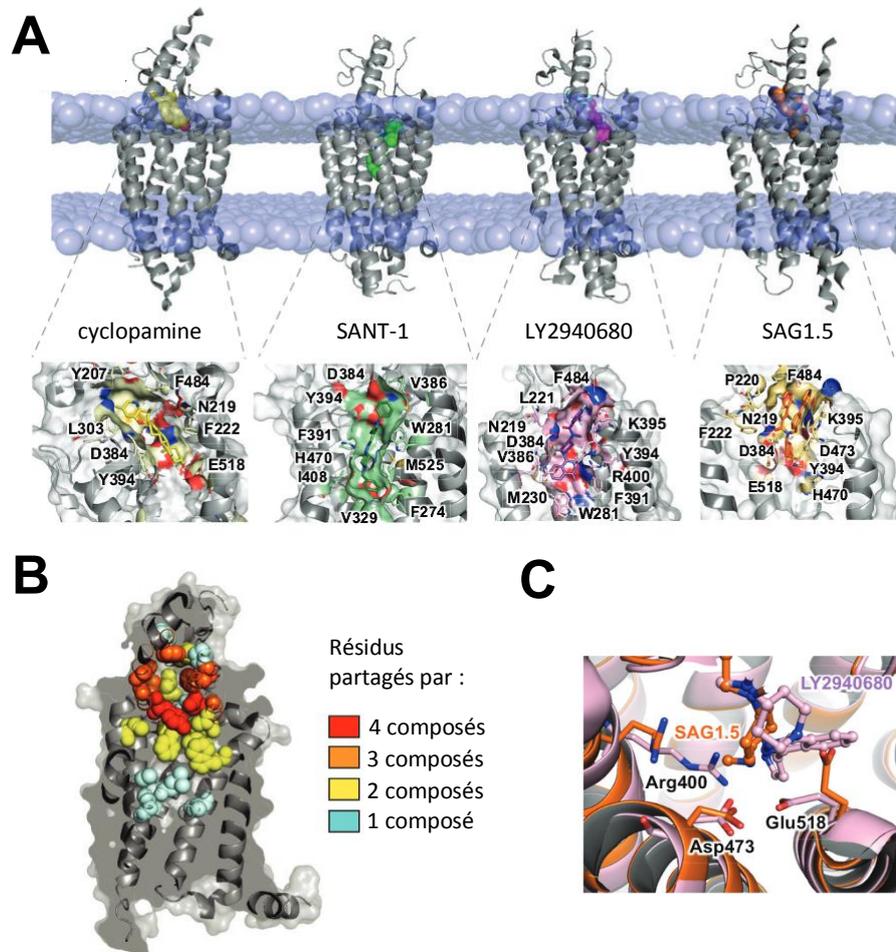


Figure 21 : Les différents sites de liaison au niveau du domaine transmembranaire des modulateurs du récepteur Smoothened.

Différentes petites molécules naturelles ou synthétiques sont capables de se lier au récepteur Smo et de moduler son activité. A. Structures cristallographiques du récepteur Smo complexé avec la cyclopamine (PDB 409R), le SANT-1 (PDB 4N4W), le LY2940680 (PDB 4JKV) et le SAG1.5 (PDB 4QIN). Les agrandissements des différents sites de liaison font apparaître les résidus mis en jeu pour la liaison de chaque composé. B. Mise en évidence de l'hétérogénéité des sites de liaison des quatre composés. Seulement trois résidus sont partagés par les quatre composés (rouge). Les résidus orange n'ont pas de contact avec le SANT-1. Les résidus jaunes sont partagés par deux composés ; par exemple le LY2940680 et le SANT-1 ont sept résidus en commun qui n'ont pas de contact avec la cyclopamine ou le SAG1.5. Les résidus bleus ont un contact unique avec un composé. Le LY2940680 ne contacte aucun résidu unique. C. Superposition des résidus R400, D473 et E518 des poches de liaison du LY2940680 et du SAG1.5 au récepteur Smo. La liaison du SAG1.5 modifie l'orientation du résidu E518, d'après (Sharpe *et al.*, Nat Chem Biol, 2015).

Les cristallisations de Smo décrites ci-dessus font apparaître des résidus clés qui interviennent dans la fixation de différentes petites molécules sur Smo et peuvent servir de base pour expliquer les différentes propriétés pharmacologiques de ces composés. Les données cristallographiques corrélient aujourd'hui avec la démonstration d'une allostérie entre les composés SANT-1 et SAG (Rominger *et al.*, 2009) ainsi que les composés cycloamine et 20(S)-OHC (Nachtergaele *et al.*, 2012). Ces composés occupent des sites de liaison différents qui ont des effets allostériques entre eux.

En plus des sites de liaison décrits dans l' ECD et dans le domaine TM, il est concevable que d'autres sites existent à la surface du récepteur de Smo. La cristallisation de Smo sous sa forme dimérique offre la possibilité de faire apparaître plusieurs cavités à l'interface des deux monomères qui pourraient être la cible de nouveaux modulateurs de Smo (**Figure 22**, (Ruat *et al.*, 2014 ; Rognan & Mus-Veteau, 2015)).

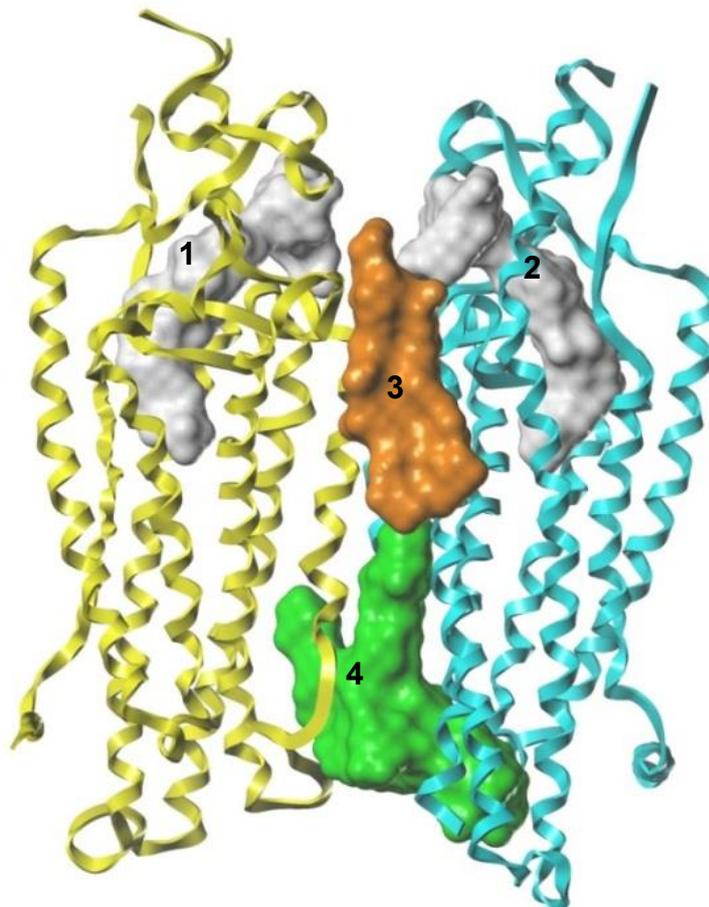


Figure 22 : Structure cristallographique d'un homodimère du récepteur Smoothened (monomère A, jaune ; monomère B, bleu).

L'interface de l'homodimère engage les domaines transmembranaires (TM) 4 et 5 des deux monomères. Cette forme dimérique du récepteur Smoothened (Smo) fait apparaître quatre cavités pouvant être ciblées par des modulateurs de synthèse ou par des molécules endogènes. La poche de liaison de l'antagoniste canonique est présente dans chaque monomère (1 et 2), mais deux cavités supplémentaires (3 et 4) sont présentes à l'interface du dimère et constituent des sites de liaison putatifs pour une nouvelle génération de modulateurs de Smo, d'après (Ruat, Hoch *et al.*, Trends Pharmacol Sci, 2014).

V. Présentation du sujet de thèse

Dans ce contexte bibliographique et suite aux travaux majeurs de notre équipe sur la pharmacologie du récepteur Smo et la compréhension des mécanismes d'action de la voie de signalisation Shh dans le cerveau adulte, mon travail de thèse s'est orienté autour de trois axes principaux :

1) L'identification de nouveaux antagonistes de Smo dérivés de la famille des acylthiourés et des acylguanidines développés dans notre équipe, conduisant à la découverte du plus puissant antagoniste de Smo connu à ce jour, le MRT-92.

2) Le développement d'un nouvel outil pharmacologique, le radioligand tritié [³H]MRT-92, qui a permis l'étude de la pharmacologie du récepteur Smo et la caractérisation du site de liaison du MRT-92 au niveau du domaine TM de Smo. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec un bioinformaticien, le Dr D. Rognan (Université de Strasbourg, France).

3) La découverte et la caractérisation d'une nouvelle molécule agoniste du récepteur Smo, le GSA-10, obtenue à l'aide d'un modèle pharmacophorique des interactions de Smo avec des molécules précédemment identifiées comme agonistes de Smo. Ce travail a été réalisé en collaboration avec deux équipes chimistes, respectivement dirigées par le Pr M. Taddei (Université de Sienne, Italie) et le Dr A. Mann (Université de Strasbourg, France) et un bioinformaticien, le Dr F. Manetti (Université de Sienne, Italie).

L'ensemble de ce travail a été réalisé en associant diverses approches biologiques et pharmacologiques : des tests cellulaires *in vitro* et *ex vivo*, des techniques de biologie moléculaire et de biochimie, des tests de radioliasion, des études de structure-activité et des techniques de modélisation moléculaire.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Résumé de l'article Hoch *et al.*, *Faseb Journal*, 2015

Le dysfonctionnement de la voie de signalisation Hh est associé avec l'apparition de différents types de tumeurs comme les BCC et les MB. Des petites molécules ciblant le récepteur Smo, le transducteur principal de la voie Hh, sont actuellement en essais cliniques pour le traitement de ces tumeurs. La compréhension du mode de liaison des antagonistes au niveau des sept domaines TM de Smo est importante pour l'identification des mécanismes de résistance suite aux traitements par ces molécules. Les études de cristallisation du récepteur Smo humain (hSmo) lié à différents ligands ont permis d'identifier deux types d'antagonistes interagissant avec le domaine TM : ceux liant principalement les acides aminés localisés dans les boucles extracellulaires (site 1, comme le LY2940680) et ceux pénétrant profondément dans la cavité TM (site 2, comme le SANT-1) (Wang *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2014).

Dans ce contexte, en collaboration avec un bioinformaticien, nous avons réalisé un amarrage moléculaire de l'acylguanidine MRT-83, un puissant antagoniste de Smo développé par notre équipe et possédant une affinité comparable aux composés inclus dans des essais cliniques (Roudaut *et al.*, 2011), dans le cristal de Smo complexé avec le composé SANT-1. Cette étude nous a permis d'identifier le site de liaison présumé du MRT-83 au niveau du domaine TM délimité par les acides aminés des sites 1 et 2. Néanmoins, nous avons remarqué que le site 2 n'était pas entièrement occupé, suggérant que l'élongation de la chaîne biaryl du MRT-83 pourrait conduire à des composés potentiellement plus puissants.

En collaboration avec des chimistes, nous avons synthétisé des dérivés du MRT-83 avec des longueurs de chaînes biaryl différentes (MRT-91, MRT-92, MRT-93, MRT-94 et MRT-95). Ces dérivés inhibent la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes, une réponse mettant en jeu la voie Hh. Ils présentent une sélectivité pour le Smo activé par le SAG (Smo^{SAG}) en comparaison à celui activé par le GSA-10 (Smo^{GSA-10}). Parmi les cinq dérivés, le MRT-

92 présente la meilleure affinité ($CI_{50} = 6 \text{ nM}$) pour inhiber la réponse induite par le Smo^{SAG}. L'utilisation de concentrations croissantes de SAG (jusqu'à $2 \mu\text{M}$) induit un décalage vers la droite de la courbe d'inhibition par le MRT-92, démontrant l'existence d'un antagonisme compétitif.

L'investigation des propriétés pharmacologiques du MRT-92 a révélé qu'il est un puissant antagoniste spécifique de Smo. En effet, en raison de l'homologie de Smo aux récepteurs Fzl, nous avons analysé la capacité du MRT-92 à inhiber une réponse liée à l'activation de ces récepteurs impliqués dans la signalisation Wnt. Contrairement à l'IWR1, un antagoniste de référence de la voie Wnt, le MRT-92 n'a pas d'activité inhibitrice sur la voie Wnt, indiquant sa spécificité pour la voie Hh. Le MRT-92 inhibe la transcription du gène rapporteur Gli-luciférase et la translocation du récepteur Smo dans le cil primaire induite sous l'action de l'agoniste SAG ($0.1 \mu\text{M}$ et $1 \mu\text{M}$, respectivement). L'effet inhibiteur du MRT-92 est la conséquence de sa fixation sur Smo, car il inhibe la liaison du dérivé fluorescent de la cycloamine, la BC, avec une affinité de 8.4 nM . Le MRT-92 possède également un effet anti-prolifératif très important puisqu'il inhibe l'incorporation de thymidine tritiée dans les GCP du cervelet de raton proliférant sous l'action de l'agoniste SAG ($0.01 \mu\text{M}$) avec une affinité de 0.4 nM , qui est 10 fois supérieure à celles du GDC-0449 et du LDE225, des antagonistes de Smo actuellement en clinique. Le MRT-92 inhibe également l'activation constitutive de la voie de signalisation Hh de cultures primaires de cellules dérivant de médulloblastomes développés spontanément chez des souris hétérozygotes pour le gène *Ptc*.

Nous avons développé la forme tritiée du MRT-92 ($[^3\text{H}]\text{MRT-92}$) pour étudier son mode de liaison au récepteur hSmo exprimé transitoirement ou de façon stable dans les membranes de cellules HEK293. Des expériences de saturation avec des concentrations croissantes du radioligand et des expériences d'association et de dissociation ont permis de démontrer que le $[^3\text{H}]\text{MRT-92}$ lie un site unique du récepteur hSmo avec une constante de dissociation (K_d) de 0.3 nM . En comparaison aux autres radioligands du récepteur Smo, le $[^3\text{H}]\text{MRT-92}$ possède une affinité 10 fois supérieure. À l'aide de ce radioligand, nous avons réalisé une étude pharmacologique de différents agonistes et

antagonistes de Smo. Tous les composés testés, à l'exception de la molécule agoniste purmorphamine, inhibent la liaison du [³H]MRT-92 au récepteur hSmo, y compris l'itraconazole, un agent antifongique rapporté comme un inhibiteur de la voie de signalisation Hh.

En collaboration avec un bioinformaticien nous avons modélisé le site de liaison présumé du MRT-92. Nous avons effectué une mutagenèse dirigée des acides aminés de Smo potentiellement impliqués dans la liaison du MRT-92 et exprimé ces mutants dans les membranes de cellules HEK293. Par des études d'immunofluorescence et de *western blot*, nous avons identifié que chaque mutant présente le même niveau d'expression que le récepteur Smo sauvage (SmoWT). Nous avons ensuite réalisé des expériences de liaison du [³H]MRT-92 sur les membranes de cellules exprimant les différents Smo mutés. Les mutations D384A, Y394A, R400A et E518K empêchent la liaison du [³H]MRT-92, ce qui suggère le rôle essentiel de ces acides aminés pour la liaison du MRT-92. Les mutations L325F, V329F, T466F et M525G réduisent significativement la liaison du [³H]MRT-92 et induisent un décalage de la CI₅₀ du MRT-92 de 3 à 8 fois, suggérant également le rôle essentiel de ces acides aminés pour la liaison du MRT-92. En revanche, la liaison du [³H]MRT-92 est insensible aux mutations S387A, I408F et D473H des poches de liaison du LY2940680, SANT-1 et GDC-0449, respectivement. Ces résultats suggèrent que la poche de liaison du MRT-92 se superpose aux sites de liaison 1 et 2, et que le MRT-92 n'interagit pas avec l'ensemble des acides aminés décrits pour ces deux sites.

Nous avons analysé les propriétés de liaison du [³H]MRT-92 au récepteur SmoD473H, un récepteur muté et résistant au traitement par le GDC-0449, et identifié que sa constante de dissociation n'était significativement pas différente de celle du récepteur SmoWT (0.5 nM et 0.3 nM, respectivement). De plus, nous avons identifié que seuls les composés MRT-92, MRT-83 et ALLO-2, préalablement caractérisés, sont insensibles à la mutation D473H en comparaison aux modulateurs de référence de Smo, ce qui suggère l'intérêt thérapeutique de ces composés pour le traitement de cette résistance.

L'ensemble de ces résultats a conduit à la découverte et à la caractérisation d'un nouveau type d'antagonistes de Smo, comme le MRT-92, qui lie un site de liaison qui se superpose aux sites 1 et 2 préalablement décrits pour les antagonistes de référence de Smo. Le MRT-92 présente une très haute affinité pour le récepteur Smo, supérieure à celle des antagonistes de Smo actuellement inclus en clinique. Les propriétés pharmacologiques du MRT-92 présentent un intérêt thérapeutique pour le traitement des médulloblastomes liés à la voie de signalisation Hh. Le [³H]MRT-92 représente un outil pharmacologique de haute affinité pour étudier la pharmacologie du récepteur Smo et les résistances associées à ce récepteur.

MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor

Lucile Hoch,* Helene Faure,* Hermine Roudaut,* Angele Schoenfelder,[†] Andre Mann,[†] Nicolas Girard,[†] Laure Bihannic,[‡] Olivier Ayrault,[‡] Elena Petricci,[§] Maurizio Taddei,[§] Didier Rognan,[†] and Martial Ruat*¹

*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecules Circuits Department, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology Team, Gif-sur-Yvette, France; [†]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche-7200, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Université de Strasbourg, Illkirch, France; [‡]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche-3306, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1005, Institut Curie, Centre Universitaire, Orsay, France; and [§]Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia, Università degli Studi di Siena, Siena, Italy

ABSTRACT The Smoothed (Smo) receptor, a member of class F G protein-coupled receptors, is the main transducer of the Hedgehog (Hh) signaling pathway implicated in a wide range of developmental and adult processes. Smo is the target of anticancer drugs that bind to a long and narrow cavity in the 7-transmembrane (7TM) domain. X-ray structures of human Smo (hSmo) bound to several ligands have revealed 2 types of 7TM-directed antagonists: those binding mostly to extracellular loops (site 1, e.g., LY2940680) and those penetrating deeply in the 7TM cavity (site 2, e.g., SANT-1). Here we report the development of the acylguanidine MRT-92, which displays subnanomolar antagonist activity against Smo in various Hh cell-based assays. MRT-92 inhibits rodent cerebellar granule cell proliferation induced by Hh pathway activation through pharmacologic (half maximal inhibitory concentration [IC₅₀] = 0.4 nM) or genetic manipulation. Using [³H]MRT-92 (K_d = 0.3 nM for hSmo), we created a comprehensive framework for the interaction of small molecule modulators with hSmo and for understanding chemoresistance linked to hSmo mutations. Guided by molecular docking and site-directed mutagenesis data, our work convincingly confirms that MRT-92 simultaneously recognized and occupied both sites 1 and 2. Our data demonstrate the existence of a third type of Smo antagonists, those entirely filling the Smo binding cavity from the upper extracellular part to the lower cytoplasmic-proximal subpocket. Our studies should help design novel potent Smo antagonists and more effective therapeutic strategies for treating Hh-linked cancers and associated chemoresistance.—Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Girard, N., Bihannic, L.,

Ayrault, O. Petricci, E., Taddei, M., Rognan, D., Ruat, M. MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor. *FASEB J.* 29, 1817–1829 (2015). www.fasebj.org

Key Words: antagonist • medulloblastoma • molecular modeling • stem cell

SMOOTHENED (SMO), A MEMBER of the GPCR superfamily, belongs to class F (Frizzled family) of these receptors (1–3). Smo is the main transducer of the Hedgehog (Hh) signaling pathway responsible for a large range of developmental processes and regulates key physiologic responses in adult tissues, including the maintenance of stem and precursor cells (4, 5). In the absence of Hh ligands, the 12-pass transmembrane protein Patched (Ptc) negatively regulates Smo, presumably through a transporter-like activity modulating the availability of a yet elusive endogenous lipid molecule (6). The binding of Hh to Ptc activates the canonical Hh signaling pathway by translocating Smo to the primary cilium. This initiates a complex signaling cascade mediated by activation of Gli transcription factors and translocation of their active forms to the nucleus leading to gene transcription. The biochemical and molecular mechanisms regulating Smo trafficking at the primary cilium presumably involve multiple states of Smo that might be modulated by Ptc itself (1, 6). The natural and teratogenic alkaloid molecule cyclopamine presumably blocks canonical Hh signaling by

Abbreviations: 7TM, 7-transmembrane; AP, alkaline phosphatase; BC, bодipy cyclopamine; BCC, basal cell carcinoma; ECD, extracellular domain; ECL, extracellular loop; GCP, granule cell precursor; Hh, Hedgehog; hSmo, human Smoothed; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; PDB, Protein Data Bank; Ptc, patched; Smo, Smoothed; WT, wild-type

¹ Correspondence: CNRS, UMR-9197, Neuroscience Paris-Saclay Institute, Molecules Circuits Department, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology Team, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France. E-mail: ruat@inaf.cnrs-gif.fr
doi: 10.1096/fj.14-267849

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

binding to the 7-transmembrane (7TM) domain of Smo (7, 8). Following the discovery of this first Smo ligand and the evidence that up-regulation of Hh signaling occurs in multiple types of cancer (9, 10), extensive research is undertaken for developing Smo antagonists (1, 9, 11). This is supported by the recent approval of GDC-0449 (vismodegib) for treating metastatic basal cell carcinoma (BCC) and locally advanced BCC untreatable by surgery and radiation (12, 13). The importance of Smo inhibitors of different chemical classes is also demonstrated by ongoing clinical trials on a large range of metastatic and advanced cancers (1, 9, 11). The recently described high-resolution X-ray structures of the 7TM and the extracellular domains of human Smo (hSmo) highlights both conserved and unique structural features of this atypical GPCR (2, 3, 14, 15). X-ray structures of the hSmo 7TM domain enabled identification of a narrow and deep hydrophobic cavity between the 7TM bundle, the 3 extracellular loops (ECL) and the cysteine-rich domain of the receptor's amino-terminal tail. Small molecular weight ligands bind to this amino-terminal tail (2, 3). In addition to understanding the binding mode of Smo antagonists to the 7TM, these studies are also important for delineating the complex processes inducing Smo resistance to drug treatment, as seen in the receptor's mutations (D473H in hSmo) rendering it resistant to GDC-0449 (16) or to LDE225 (17).

In this study, we report the design, putative binding mode, and pharmacologic properties of MRT-92, a novel Smo antagonist that is not sensitive to the D473H mutation and uniquely binds to the entire transmembrane cavity of the Smo receptor.

MATERIALS AND METHODS

Molecular docking

Input structures for MRT compounds were obtained by converting a MarvinSketch v6.1 (ChemAxon Ltd., Budapest, Hungary) 2D sketch into 3D coordinates using the Corina v3.1 software (Molecular Networks GmbH, Erlangen, Germany). The most probable protonation state at pH 7.4, according to ChemAxon's pK_a calculation plug-in (ChemAxon Ltd., Budapest, Hungary), was retained for each ligand. Four input structures for hSmo were retrieved from the Protein Data Bank (PDB; accession codes 4JKV, 4N4W, 4O9R, 4QIM). The cytochrome b652 insert used for crystallization purpose was removed in each structure, leaving the transmembrane domain (4JKV, S190-C550; 4N4W, S190-T553; 4O9R, Q192-R551; 4QIM, S190-T553) for docking. In case of a dimeric structure (4JKV), only chain A was kept. After removing all nonprotein atoms (ligand, ions, solvent, lipids), hydrogen atoms were added to the protein using standard geometries in the SYBYL-X 2.1.1 package (Certera, St. Louis, MO, USA). The binding site in each structure was defined by the sum of residues closer than 4.5 Å from any of the bound antagonists (LY2940680, SANT-1, cyclopamine, Anta XV) heavy atom in the reference 4 X-ray structures: N219^{ECD}, L221^{ECD}, F222^{ECD}, M230^{1.32f}, I234^{1.36f}, F274^{2.51f}, W281^{2.58f}, M301^{ECL1}, L303^{ECL1}, V321^{3.32f}, LEU325^{3.36f}, M326^{3.37f}, V329^{3.40f}, D384^{ECL2}, V386^{ECL2}, S387^{ECL2}, I389^{ECL2}, F391^{ECL2}, Y394^{ECL2}, K395^{ECL2}, R400^{5.43f}, V404^{5.47f}, I408^{5.51f}, F462^{6.43f}, V463^{6.44f}, T466^{6.47f}, H470^{6.51f}, D473^{6.54f}, Q477^{ECL3}, W480^{ECL3}, E481^{ECL3}, F484^{ECL3}, P513^{ECL3}, L515^{7.35f}, E518^{7.38f}, N521^{7.41f}, L522^{7.42f}, A524^{7.44f}, MET525^{7.45f}, and T528^{7.48f}. A protocol was first defined using standard settings of Surflex-Dock v2.745 (31) from the above-cited list of residues, and further used to dock MRT-92 and MRT-83 using the docking

accuracy parameter set (pgeom option) in Surflex-Dock. For every Smo structure, a total of 20 poses was saved for each ligand.

Drugs

Synthesis of MRT-91, MRT-92, MRT-93, MRT-94, and MRT-95 are available upon request. Bodipy cyclopamine (BC) was from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). GSA-10, GDC-0449, LDE225, MRT-83, SAG, ALLO-2, and M25 compounds have been synthesized as described (20, 21). LY2940680 was from Selleckchem (Houston, TX, USA), SANT-1 and XAV939 from Tocris Bioscience (Lille, France), and itracozazole, 17-DMAG, and IWR-1 from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). ShhN was provided by Dr. D. Baker (Biogen Idec, Boston, MA, USA). [³H]Thymidine was from PerkinElmer Life (Waltham, MA, USA). [³H]MRT-92 (38.1 Ci·mmol⁻¹) has been tritiated by RC Tritec (Teufen, Switzerland). SAG was dissolved in ethanol, BC in methanol, and all other compounds in DMSO at a concentration of 10 mM or 2.5 nM for GSA-10. No significant influence of the vehicle (DMSO) was observed in the assays.

Plasmids and mutagenesis

The pRL-TK Renilla luciferase plasmid has been described (23) and is referred to in the text as *R. reniformis* luciferase. The pRK5 and pRK5-SP-myc-Smo plasmids have been described (44). hSmo mutations (L325F^{3.36f}, V329F^{3.40f}, D384A^{ECL2}, S387A^{ECL2}, Y394A^{ECL2}, R400A^{5.43f}, I408F^{5.51f}, T466F^{6.47f}, D473H^{6.54f}, E518K^{7.38f}, M525G^{7.45f}) were generated by the Imagif platform in Gif-sur-Yvette using a site-directed mutagenesis protocol. The Wnt reporter plasmid M50 Super8xTOPFlash (Tcf/Lef), the pLNC Wnt-3aHA, and the control pRL-TK *R. reniformis* luciferase were obtained from Addgene.

Antibodies

A previously described polyclonal rabbit antiserum against rat Smo was used (45). The mouse anti-acetylated tubulin antibody, the mouse monoclonal anti-c-Myc antibody, the rabbit anti- γ -tubulin, and the goat anti-mouse FITC antibody were obtained from Sigma-Aldrich. The goat anti-mouse Alexa Fluor 546 antibody was obtained from Invitrogen (Saint-Aubin, France) and the goat anti-rabbit FITC antibody from Merck Millipore (Lyon, France). The horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG was obtained from Merck Millipore and the anti-rabbit from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection

Zeocin, geneticin (G418), penicillin-streptomycin, and all cell culture media or products were from Invitrogen except as stated otherwise. HEK293, C3H10T1/2, and NIH3T3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. The Shh-light2 cells (from Prof. P. A. Beachy, Stanford University, Stanford, CA, USA) and HEK293 cells stably expressing hSmo (HEK-hSmo) were cultured in the same medium supplemented with 0.4 mg/ml G418 and 0.150 mg/ml Zeocin or 0.5 mg/ml G418, respectively. HEK293 cells were transiently transfected by X-tremeGENE 9 from Roche Diagnostics (using 20 μ g per T75 flask) with WT or mutant Smo receptors for [³H]MRT-92 binding. Cells were distributed into 6-well plates containing glass coverslips coated with 0.05 mg/ml poly-D-lysine (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) for BC binding, Smo ciliary accumulation, and

immunofluorescence experiments, or into 96-well plates for alkaline phosphatase (AP) assay and Gli-dependent luciferase reporter assay.

Gli-dependent luciferase reporter, AP, and ciliary Smo accumulation assays

Shh-light2 cells were incubated for 40 hours with ShhN (5 nM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described previously (18). C3H10T1/2 cells were incubated for 6 days in the presence of SAG (0.1 μ M) or GSA-10 (1 μ M) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described previously (46). The protocol used and data analysis for ciliary Smo accumulation were performed as described previously (19).

Primary cerebellar cultures and medulloblastoma proliferation assay

Isolation of cerebellar granule cell precursors (GCPs) and quantitation of [3 H]thymidine incorporation were performed as described previously (47). Shh medulloblastomas were obtained from *Ptc^{+/−}* mice (003081; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) (28) and were serially passaged in nude mice. Shh medulloblastoma cells were isolated and cultured as described (48). Cells from 3 independent Shh medulloblastomas were treated in culture 48 hours and cell viability was measured using the CellTiter-Glo (Promega, Lyon, France). The protocol involving mouse use was performed in accordance with National and European regulation on the protection of animals used for scientific purposes.

Membrane preparation

HEK-hSmo or HEK293 transiently expressing wild-type (WT) or mutant Smo or an empty vector (pRK5) were collected by scraping in PBS. Cell pellets were resuspended at 4°C in 10 volumes of ice-cold buffer HE (50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) supplemented by a protease inhibitors cocktail (10 μ l/ml; Sigma-Aldrich). Cell pellets were homogenized with a Polytron blender for 15 seconds, placed on ice (5 minutes), and homogenized for 15 seconds. After centrifugation (500 *g*, 30 minutes, 4°C), the supernatant was centrifuged again (48,000 *g*, 45 minutes, 4°C). A Dounce homogenizer was used to resuspend the final pellet using 2 ml of ice-cold buffer HE. The membrane suspension was passed through a 25-gauge needle, formed into aliquots, and stored at −80°C. The protein concentration was determined by the method of Bradford with bovine serum albumin as standard.

Immunocytochemistry

Detection of Smo protein inside HEK293 and at the cell surface was performed as described previously (46). The Smo N-terminal Myc tag was detected using a mouse monoclonal anti-Myc antibody (1/400). Smo expression (green) was visualized using a fluorescent anti-mouse FITC antibody (1/1000).

Western blot analysis

Western blot analyses were performed as described (21, 49). Nitrocellulose membranes were probed (2 hours) at room temperature with a mouse monoclonal anti-Myc antibody (1/2000)

or a rabbit anti- γ -tubulin (1/1000). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG was used, respectively, as secondary antibody (1/1000), and immunoreactivity revealed with enhanced chemiluminescence kit ECL (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

[3 H]MRT-92 and BC binding assays

[3 H]MRT-92 binding assays were performed in polypropylene tubes. Membranes, radioligand and drugs were diluted in HEPES buffer (50 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, pH 7.2) supplemented with 0.2% bovine serum albumin to reduce nonspecific binding. Usually, 2 μ g or 20 μ g of protein, for stably or transiently transfected cells, were incubated with 0.4 nM of [3 H]MRT-92 in a final volume of 400 μ l. Triplicate incubations were generally carried out at 37°C for 180 min and stopped in ice-cold water followed by rapid filtration (Brandel apparatus) through glass fiber filters (GF/C) pretreated with 0.3% polyethyleneimine. Filters were washed with ice-cold PBS-NaCl (PBS pH 7.4 with 400 mM NaCl). Radioactivity on the filters was quantified using a liquid scintillation counter (PerkinElmer Life). Specific binding to WT or D473H Smo is defined as the binding inhibited by 1 μ M GDC-0449 or MRT-83, respectively, and represented more than 95% of total binding. Radioactive saturation experiments were performed with the addition of [3 H]MRT-92 over a range of concentrations (0.1–10.5 nM). BC assay was performed as described previously (18). Data were expressed as percentage of fluorescence intensity observed with BC alone.

Data analysis

Means and SEM were calculated using Excel 2007 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Statistical analysis was performed by Student's *t* test. Statistical significance was considered for $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, and $P \leq 0.001$. Curve fitting, half maximal inhibitory concentration (IC₅₀), and K_d determinations were performed by Prism 4.03 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). K_i values for compounds were determined from the following equation (50):

$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d),$$

where IC₅₀ is their half-inhibition concentration, L is the concentration of [3 H]MRT-92, and K_d is the equilibrium dissociation constant of [3 H]MRT-92.

RESULTS

Comparative binding mode of antagonists to hSmo transmembrane domain

The X-ray structures of hSmo bound to several antagonists including LY2940680, SANT-1, cyclopamine, and Anta XV, along with the associated mutagenesis experiments (2, 3), revealed 2 types of 7TM-directed antagonists: first, type 1—those binding mostly to ECL, (from here on called site 1), *e.g.*, LY2940680, cyclopamine, Anta XV, GDC-0449, and LDE225; and second, type 2—those penetrating deeply into the 7TM cavity (site 2), *e.g.*, SANT-1 (2, 3) (**Fig. 1A, B**). These studies have underlined the crucial role of L325^{3,36f}, the rotameric state of which influences the volume of the 7TM cavity and the level of ligand penetration into the crevice. We use the modified Ballesteros-Weinstein residue number specifically adapted for class F GPCR (3). In this

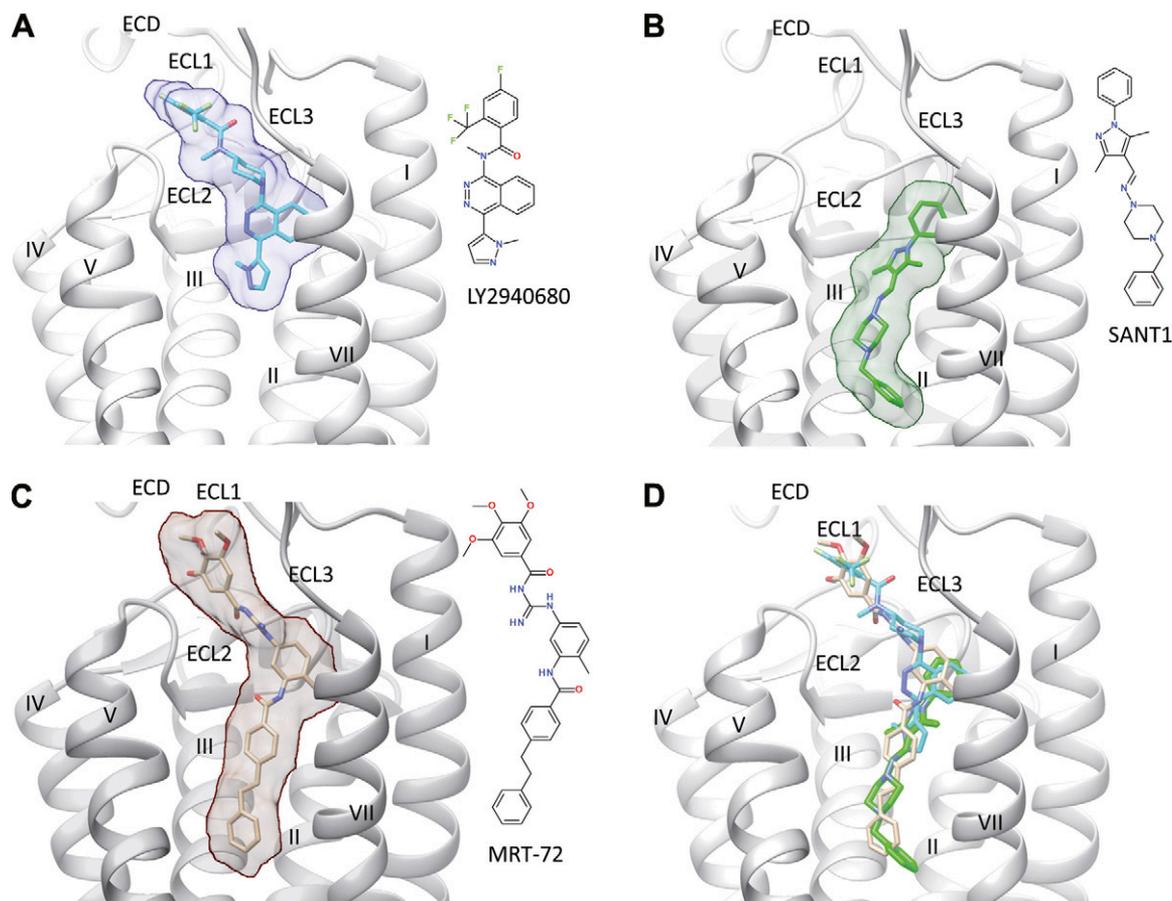


Figure 1. Binding of different antagonists (A, LY2940680; B, SANT-1; C, MRT-92) to the transmembrane domain of hSmo (white ribbons). The ECD, the 3 extracellular loops (ECL1, ECL2, ECL3), and the 7 transmembrane helices (I–VII) are labeled, with the exception of helix VI, which is masked for the sake of clarity. The bound ligand is indicated by sticks and rendered by a transparent surface. The inset illustrates the structure of each ligand. D) All 3 ligands are simultaneously rendered in the binding site. A, B) X-ray structures (PDB accession codes 4JKV and 4N4W, respectively) (2, 3). C) Obtained by docking MRT-92 into the SANT-1-bound hSmo structure.

scheme, each transmembrane residue is labeled with a superscript $x.yy$, denoting the transmembrane helix (x) and the position (yy) with respect to a fully conserved amino acid for class F receptors (for which $yy = 50$). The letter f indicates that the numbering applies to a class F GPCR.

The cleft-closed structure (PDB accession codes 4JKV, 4O9R, 4QIM) accommodates the antagonist close to the ECL upper part (type 1 binding, Supplemental Fig. 1A), whereas the cleft-opened structure (PDB accession code 4N4W) enables the antagonist to deeply penetrate the 7TM cavity, toward more cytoplasmic-proximal residues (type 2 binding, Supplemental Fig. 1B). Although type 1 and type 2 antagonists partially overlap in their bound mode, we wondered whether a third type of antagonists interacting simultaneously with both sites 1 and 2 may exist.

Using virtual screening of commercial compound libraries against a Smo antagonist pharmacophore, we recently identified an acylthiourea (MRT-10) displaying antagonist activity in various Hh assays ($IC_{50} = 0.65 \mu M$ for differentiation of the multipotent mesenchymal C3H10T1/2 cells into AP-positive osteoblasts) (18). Next, we developed and optimized acylthiourea, acylurea, and acylguanidine derivatives of MRT-10, which led to the discovery of acylguanidine MRT-83 (Supplemental Fig. 2).

MRT-83 exhibited antagonist activity comparable to that of GDC-0449 (Table 1) (19, 20). It inhibited BC binding to HEK-hSmo cells, suggesting that MRT-83 shares interactions with site 1 residues. We could not reproducibly dock MRT-83 in any of the available cleft-closed hSmo structures. However, the cleft-opened conformation (4N4W, SANT-1 bound Smo) accommodated MRT-83 (Supplemental Fig. 1C), in agreement with the observed structure–activity relationships on this last compound (20). The docking study, however, showed that the very bottom part of the pocket (site 2) is still unoccupied, suggesting that further elongating the biaryl moiety of MRT-83 may lead to even more potent analogs.

Discovery of MRT-92, a Smo antagonist that selectively blocks the Hh canonical pathway

Following our design hypothesis, we synthesized MRT-83 derivatives with longer biaryl moieties (Table 2) and evaluated their potency to block Smo-induced differentiation of the mesenchymal progenitor cells into osteoblasts (21, 22). The Smo agonists SAG and GSA-10 stimulate the differentiation of C3H10T1/2 cells into AP-positive

TABLE 1. Compared IC_{50} values for MRT-92, MRT-83, LDE225, and GDC-0449 in *Hh* cell-based assays

Compound	IC_{50} (nM)				
	Shh-Light2 (1)	C3H10T1/2 (2)		GCPs (3)	BC binding (4)
		SAG	GSA-10		
MRT-92	2.8 ± 0.5	5.6 ± 0.4	1000 ± 50	0.4 ± 0.1	8.4 ± 0.9
MRT-83	15 ± 2^a	11 ± 3^a	38 ± 7^c	6 ± 1^a	5 ± 1^b
LDE225	12 ± 2	20 ± 1^a	92 ± 12^c	3 ± 1	8 ± 2
GDC-0449	7 ± 1^b	11 ± 1^b	3300 ± 600^c	4 ± 1^b	7 ± 1^b

IC_{50} values were determined on Gli-dependent luciferase reporter activity induced in (1) Shh-Light2 cells, (2) AP activity in C3H10T1/2 cells upon stimulation by SAG or GSA-10, (3) proliferative activity of cerebellar GCPs measured by [3H]thymidine incorporation, and (4) BC binding to HEK293-hSmo cells. Data are the means \pm SEM of at least 3 independent experiments, as depicted in Figs. 2 and 3. ^aRoudaut *et al.* (19); ^bSolinas *et al.* (20); ^cGorojankina *et al.* (21).

osteoblasts by stabilizing different agonist-bound Smo conformational states (Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}) exhibiting distinct antagonist-binding preferences and pharmacologic properties (21). Among the 5 synthesized analogs,

MRT-92 blocked both SAG (0.1 μ M) and GSA-10 (1 μ M) induced differentiation of C3H10T1/2 cells as measured by the AP response, albeit with a strikingly different potency (Fig. 2A and Table 1). MRT-92 displayed an IC_{50} of

TABLE 2. IC_{50} values for MRT-83 and derivatives on SAG- and GSA-10 -induced differentiation of C3H10T1/2 cells

Compound	Structure	IC_{50} (μ M)	
		Smo ^{SAG}	Smo ^{GSA-10}
MRT-83		0.011 ± 0.003	0.038 ± 0.007
MRT-91		0.22 ± 0.02	2.6 ± 1.4
MRT-92		0.006 ± 0.001	1.0 ± 0.05
MRT-93		0.039 ± 0.009	1.4 ± 0.4
MRT-94		0.015 ± 0.004	0.7 ± 0.1
MRT-95		0.033 ± 0.006	1.5 ± 0.4

C3H10T1/2 cell differentiation was stimulated by SAG (Smo^{SAG}) or GSA-10 (Smo^{GSA-10}). Data are means \pm SEM of at least 3 independent experiments.

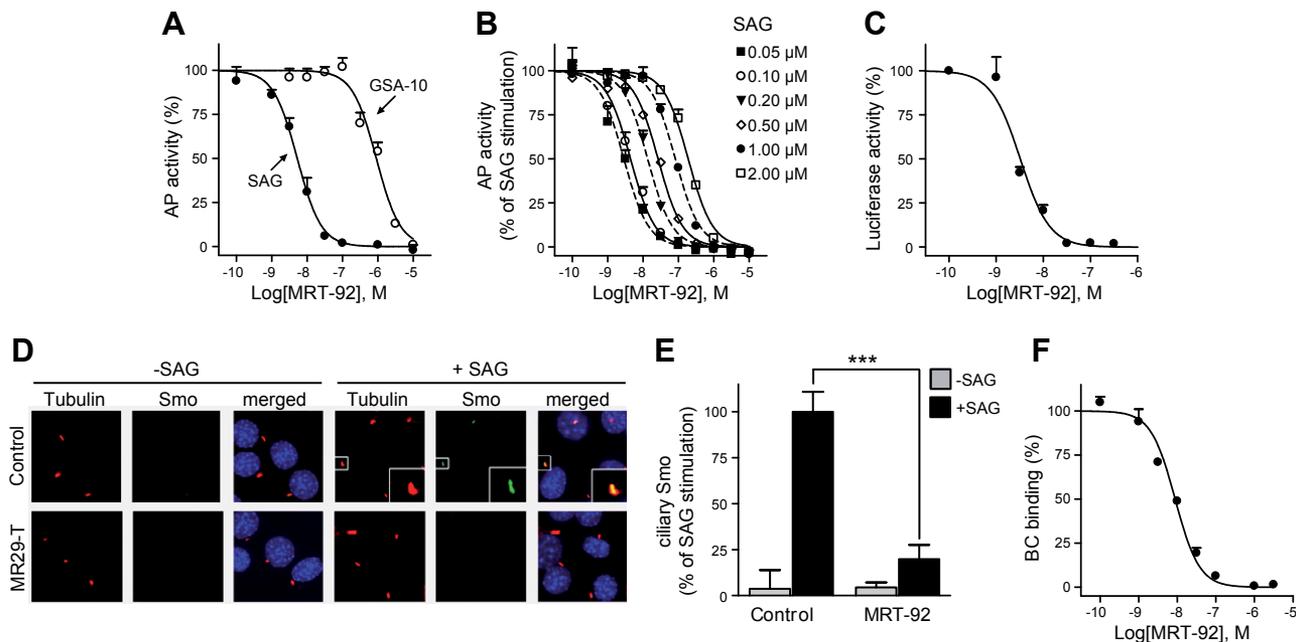


Figure 2. Characterization of MRT-92 in biologic assays. *A–C*) Activity of MRT-92 on SAG (0.1 μ M) or GSA-10 (1 μ M) induced differentiation of C3H10T1/2 cells as measured from AP activity (*A*) and on ShhN (5 nM)-induced Gli-dependent luciferase activity in Shh-light2 cells (*C*). *B*) MRT-92 competitively blocks SAG-induced AP activity. Its IC_{50} (2.8 nM) observed with SAG (0.05 μ M) increases with higher concentrations of SAG (from 0.05 μ M to 2 μ M) and was shifted by more than 60-fold at the highest agonist concentration, indicating competitive inhibition. *A–C*) Inhibition curves were generated using increasing concentrations of MRT-92; values are expressed as percentage of the maximal response induced by SAG, GSA-10, or ShhN, respectively. *D, E*) NIH3T3 cells untreated or treated with SAG (1 μ M) alone or in the presence of MRT-92 (0.3 μ M) were stained with antibodies against endogenous Smo (green), acetylated tubulin (red), and DAPI (blue). *D*) In the absence of SAG, Smo is not detected at the cilium. MRT-92 alone does not induce Smo trafficking to the primary cilium. Cell exposure to SAG induces Smo trafficking to the cilium, which is abolished by MRT-92. *E*) Quantification of the percentage of Smo-positive cilia after treatment. *F*) Inhibition of BC (5 nM) binding to HEK-hSmo cells in the presence of increasing concentrations of MRT-92 was visualized using fluorescence microscopy in a representative field. The values are expressed as percentage of the fluorescence detected in control HEK-hSmo incubated with BC alone. Data are means \pm SEM ($n = 3$) of a representative experiment over 3 to 5 independent experiments (*A–C, F*) or of 3 to 5 independent experiments (*D, E*). *** $P \leq 0.001$.

5.6 nM for SAG induction of AP response, whereas it poorly blocked Smo^{GSA-10}, with an IC_{50} of 1000 nM. These data indicate that although MRT-92 is a low-affinity Smo^{GSA-10} antagonist, it selectively blocks Smo^{SAG}-induced AP response in C3H10T1/2 cells with significantly high potency.

The other acylguanidine or thioacylurea derivatives tested, exhibited a similar micromolar potency toward Smo^{GSA-10} but were also potent inhibitors at Smo^{SAG}-induced response although with a lower potency than MRT-92. Interestingly, introducing an alkyl linker of increasing size (1 to 3 carbon atoms) between both aryl moieties was first detrimental to potency (MRT-91, 1 carbon linker) and then beneficial when the 2 phenyl moieties are separated by 2 or 3 carbons (Table 2). A saturated 2-carbon linker (MRT-92) seems to be optimal for potency because activity dropped upon further elongation (MRT-93) or unsaturation of the central bond (MRT-94, Table 2). The guanidine moiety of MRT-92 also seems important because the activity of the thiourea analog (MRT-95) was diminished (Table 2). Moreover, MRT-92 showed competitive antagonism to SAG. Increasing concentrations of SAG led to a progressive rightward shift in the MRT-92 inhibition curves with a maximal 60-fold increase in its IC_{50} (Fig. 2*B*). These data indicate that MRT-92 shares a common binding site with SAG.

To further explore MRT-92's potency as an antagonist of the Hh canonical pathway, we determined its antagonist properties in Shh-light2 cells, a NIH3T3 cell line stably transfected with a Gli-dependent firefly luciferase reporter gene used for identifying such antagonists (23). MRT-92 inhibited the ShhN (5 nM)-induced Gli-luciferase reporter transcription and displayed an IC_{50} of 2.8 nM (Fig. 2*C*). We then investigated MRT-92 functional properties in multiple cell-based assays. We notably compared its potency to that of chemically different high-affinity hSmo antagonists (MRT-83, GDC-0449, and LDE225; Supplemental Fig. 2) and concluded that MRT-92 is the most potent of all these Smo antagonists (Table 1).

MRT-92 inhibits Smo trafficking at the primary cilium

It is proposed that SAG-induced Smo activation requires Smo accumulation at the primary cilium (4, 19, 24, 25). To examine the mechanism of action of MRT-92, we investigated its ability to modulate the trafficking of endogenous Smo to the primary cilium of NIH3T3 cells (Fig. 2*D, E*). In DMSO vehicle-treated cells, Smo was not detected at the primary cilium visualized by the acetylated tubulin-positive signal (Fig. 2*D*). After treatment with SAG (1 μ M)

for 18 hours, Smo accumulation was induced at the primary cilium, as shown by the colocalization of acetylated tubulin and Smo-positive immunolabelings. MRT-92 (0.3 μM) blocked this effect but did not promote Smo-positive signals when the compound was administered alone. These data demonstrate that MRT-92 abrogates Smo ciliary translocation promoted by SAG in these cells.

MRT-92 does not block Wnt signaling

Smo displays the highest amino acid sequence identity to Frizzled receptors that are responsible for Wnt signaling (26). We evaluated the ability of MRT-92 to modulate Wnt signaling in HEK293 cells transiently transfected with Tcf/Lef-dependent firefly luciferase reporter together with a *R. reniformis* luciferase control reporter, in the presence or absence of a Wnt3a plasmid (19). As expected, Wnt3a-induced Wnt signaling was blocked by the Wnt antagonist IWR-1 (10 μM) (27). However, MRT-92 (0.1 μM) did not significantly modify the basal activity level or the Wnt3a-induced Tcf/Lef luciferase activity in these cells (Supplemental Fig. 3), indicating that it does not display significant agonist and antagonist Wnt signaling activity in this assay.

MRT-92 inhibits rat GCPs and Shh medulloblastoma cell proliferation

A hallmark of Smo antagonists is to block proliferation of GCPs induced by Hh pathway activation (1). Thus, we evaluated the ability of MRT-92 to inhibit rat GCPs proliferation in primary culture induced by Smo activation as measured by [^3H]thymidine incorporation over basal level. MRT-92 inhibited SAG (0.01 μM)-induced GCPs proliferation with an IC_{50} of 0.4 nM (Fig. 3A), whereas the other tested Smo antagonists were 7 to 15 times less potent (Table 1). Medulloblastoma formation occurs in *Ptc*^{+/-} mice because of loss of *Ptc* and aberrant activation of the Hh pathway in GCPs during cerebellar development (28). We then investigated whether MRT-92 can block the constitutive activity of the Hh pathway observed in primary culture of cells from Shh medulloblastoma as measured by the metabolic activity of these cells, used as an index of their proliferation state. We observed that MRT-92 (0.3 μM) and GDC-0449 (3 μM) inhibited this response by more than 50% but remained unmodified by the Wnt/ β catenin inhibitor (XAV939, 3 μM). Moreover, the response was completely abolished by a heat shock protein 90 inhibitor (17-DMAG, 0.5 μM) (Fig. 3B). Altogether, these data demonstrate that MRT-92 is a potent antagonist of GCPs proliferation induced by Hh pathway activation through pharmacologic or genetic manipulation.

Characterization of [^3H]MRT-92 binding to HEK-hSmo cell membranes

The high potency of MRT-92 for inhibiting the Hh canonical pathway identified in several Hh-based assays, including inhibition of GCPs, encouraged us to develop a tritiated analog ([^3H]MRT-92, Fig. 4A) for further evaluating the mode of action of Smo modulators. At 37°C,

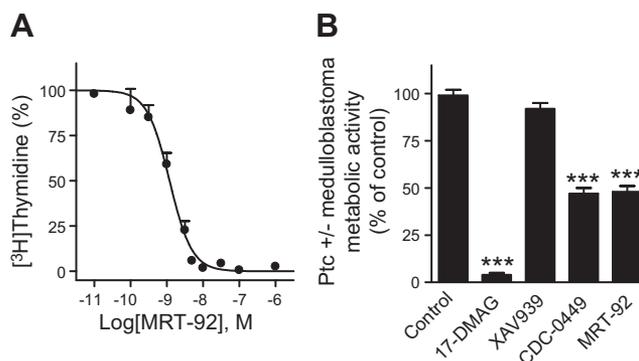


Figure 3. Effects of MRT-92 on GCPs and Shh medulloblastoma cell proliferation. *A*) Antagonist potency of MRT-92 on SAG (0.01 μM)-induced proliferation of rat cerebellar GCPs. Inhibition curve was generated using increasing concentrations of MRT-92 and the values are expressed as a percentage of the maximal response induced by SAG. *B*) Antagonist activity of MRT-92 on *Ptc*^{+/-} medulloblastoma cells' metabolic activity. MRT-92 (0.3 μM), GDC-0449 (3 μM), 17-DMAG (0.5 μM), or XAV939 (3 μM) was added into the medium of *Ptc*^{+/-} medulloblastoma culture cells, and metabolic activity was measured 48 hours later. Data are means \pm SEM ($n = 3$) of a representative experiment over 4 independent experiments (*A*) or of 4 independent experiments (*B*). *** $P \leq 0.001$.

[^3H]MRT-92 (0.30 nM) bound to HEK-hSmo membranes with an association rate constant (k_1) of $0.03 \text{ min}^{-1} \times \text{nM}^{-1}$, with equilibrium attained after 150 to 180 min (Fig. 4B). Dissociation occurring in the presence of GDC-0449 (20 μM) followed first-order kinetics with a rate constant (k_{-1}) of 0.007 min^{-1} . The ratio (k_{-1}/k_1) gave a K_d of $0.24 \pm 0.1 \text{ nM}$. Saturation of specific [^3H]MRT-92 binding at equilibrium, defined using 1 μM GDC-0449, was monophasic ($n_H = 0.93$) leading to a linear Scatchard plot. GraphPad Prism analysis of the binding isotherms led to a K_d of $0.30 \pm 0.1 \text{ nM}$ and a maximal capacity value (B_{max}) of $14.2 \pm 1.0 \text{ pmol/mg}$ of protein. At 0.4 nM, specific binding of [^3H]MRT-92 to HEK-hSmo represented 95% of total binding, and nonspecific binding increased linearly from 0.1-10 nM of [^3H]MRT-92 probe concentration (Fig. 4C). These data indicate that [^3H]MRT-92 is a potent radioligand for labeling hSmo. Binding of [^3H]MRT-92 to HEK-hSmo membranes was inhibited in a monophasic manner by a series of Smo antagonists of different structures (Supplemental Fig. 2). These include itraconazole, an antifungal agent with Hh antagonist properties (29), and the Smo agonist SAG. The exception was purmorphamine, another Smo agonist (30) (Table 3 and Supplemental Fig. 4). These experiments demonstrate that all these molecules, except purmorphamine, are potent inhibitors of [^3H]MRT-92 binding to hSmo.

Characterization of the MRT-92 binding site

Evidence from X-ray structures revealed that the binding sites of SAG and cyclopamine are largely overlapping (3, 7) between the extracellular domain (ECD), the 3 ECL, and the upper part of the 7TM helices of hSmo. To delineate the precise binding site of MRT-92, we docked this novel antagonist with Surflex-Dock (31) in all available X-ray

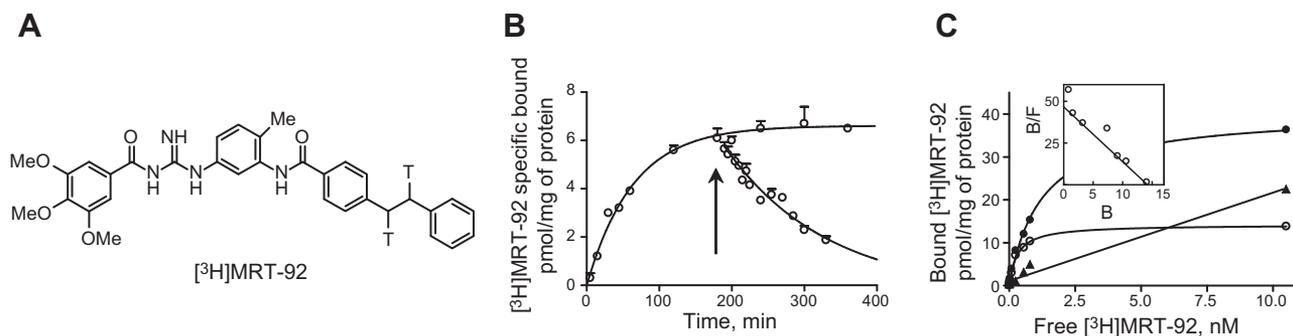


Figure 4. Reversible labeling of the hSmo receptor with [³H]MRT-92. *A*) Chemical structure of [³H]MRT-92 (T indicates a tritium atom). *B*) Association and dissociation of [³H]MRT-92 upon addition of 20 μM GDC-0449 (arrow). Computer analysis of the specific binding gave an association rate constant $k_1 = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ and a dissociation $k_{-1} = 7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. The ratio k_{-1}/k_1 gave an equilibrium dissociation constant (K_d) of $0.24 \pm 0.1 \text{ nM}$. *C*) Saturation of [³H]MRT-92 binding to HEK-hSmo cell membranes stably expressing hSmo. Membranes (2 μg protein) were incubated at 37°C for 180 minutes in 0.4 ml of HEPES buffer with [³H]MRT-92 in increasing concentrations. Nonspecific binding was evaluated using 1 μM GDC-0449. Computer analysis of the specific binding gave a K_d of $0.30 \pm 0.1 \text{ nM}$ and a B_{max} of $14.2 \pm 1.0 \text{ pmol/mg}$ of protein. Inset shows Scatchard plot analysis of the specific binding. Data are means \pm SEM ($n = 3$) of a representative experiment over 3 to 5 independent experiments. ●, total binding; ○, specific binding; ▲, nonspecific binding; B, bound [³H]MRT-92; F, free [³H]MRT-92.

structures of hSmo with closed or opened lower 7TM cleft conformation. In agreement with our preliminary docking experiments of the lead compound MRT-83, the initial design hypothesis, and the observed structure–activity relationships (Table 2), we could only dock MRT-92 using the cleft-opened structure (SANT-1-bound form). As anticipated, MRT-92 is predicted to fill the entire 7TM cavity from the upper ECD to its most cytoplasmic-proximal part (Fig. 1C), and it therefore shares characteristics of both type 1 and type 2 Smo antagonists (Fig. 1D). MRT-92 is predicted to tightly occupy the Smo 7TM cavity using 3 main anchoring areas (Fig. 5): 1) aromatic and hydrophobic interactions of the trimethoxyphenyl moiety to the upper ECD (L221^{ECD}) and ECL3 loop (W480^{ECL3}, F484^{ECL3}), 2) a network of 4 hydrogen bonds between the central polar part (acylguanidine, amide) of the ligand and polar residues in the upper extracellular part of the cavity (N219^{ECD}, D384^{ECL2}, Y394^{ECL2}, E518^{7.38f}); and 3)

extensive aromatic and hydrophobic contacts in the narrow and deep-penetrating nonpolar part of the cavity (V386^{ECL2}, F391^{ECL2}, Y394^{ECL2}, M230^{1.32f}, H470^{6.51f}, L522^{7.42f}, I408^{5.51f}, T466^{6.47f}, L325^{3.36f}, M525^{7.45f}, V463^{6.44f}, F274^{2.51f}, V329^{3.40f}).

To verify this unique binding mode, we first checked whether MRT-92 could compete with the fluorescently labeled cyclopamine analog BC, prototypical of type 1 binding (2, 3, 7). MRT-92 indeed blocked BC (5 nM) binding to HEK-hSmo in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 8.4 nM, in the same range the other reference Smo antagonists tested (Fig. 2F and Table 1). These data indicate that MRT-92 binds to hSmo at least at the cyclopamine binding site and therefore presents binding features characteristic of type 1 antagonists.

To precisely identify the amino acids implicated in MRT-92 binding, we mutated 11 amino acids delineating either binding sites 1 and 2 (2, 3, 7, 32) (Fig. 5). For investigating the amino acids implicated in type 1 binding, we mutated into alanine, D384^{ECL2}, S387^{ECL2}, and Y394^{ECL2} residues, as well as R400^{5.43f}, known to interact with LY2940680 (2). We next characterized the D473H^{6.54f} and E518K^{7.38f} mutants shown to abrogate GDC-0449 binding (2, 16, 32). To further investigate the interaction of the terminal biaryl side chain of MRT-92 with site 2, we engineered 4 mutants with a reduced site 2 volume (L325F^{3.36f}, V329F^{3.40f}, I408F^{5.51f} and T466F^{6.47f}) and 1 mutated hSmo (M525G^{7.45f}) with an increased site 2 volume (Fig. 5). These mutants and WT hSmo were transiently transfected into HEK293 cells. Their subcellular distribution was visualized using a Myc antibody that recognizes the Myc epitope located at the amino-terminal tail of the WT and mutant receptors. Next, we analyzed Smo immunoreactivity on permeabilized and nonpermeabilized transfected HEK293 cells. Myc immunoreactivity was detected at the cell surface of nonpermeabilized and at the cytoplasmic level of permeabilized HEK293 transfected cells, while no signal was detectable with control pRK5-transfected cells (Fig. 6A). These data suggest that all mutant receptors were

TABLE 3. Potency of Smo modulators using [³H]MRT-92 binding to human WT Smo and D473H^{6.54f} mutant receptors

Compound	K_i (nM)	
	WT	D473H ^{6.54f}
MRT-92	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.2
MRT-83	4.6 \pm 0.7	5.5 \pm 0.2
ALLO-2	3.8 \pm 1.5	5.1 \pm 2.0
LDE225	1.6 \pm 0.4	108 \pm 18***
GDC-0449	5.8 \pm 1.3	>1000***
LY2940680	0.5 \pm 0.2	55 \pm 0.8***
SANT-1	1.1 \pm 0.1	67 \pm 0.9***
M25	0.9 \pm 0.1	61 \pm 13***
Itraconazole	28.3 \pm 0.1	>1000***
SAG	2.4 \pm 0.3	45 \pm 0.3***
Purmorphamine	>5000	ND

Data (means \pm SEM of 3 to 5 independent experiments) derived from experiments, as shown in Supplemental Fig. 4. ND, not determined. *** $P \leq 0.001$.

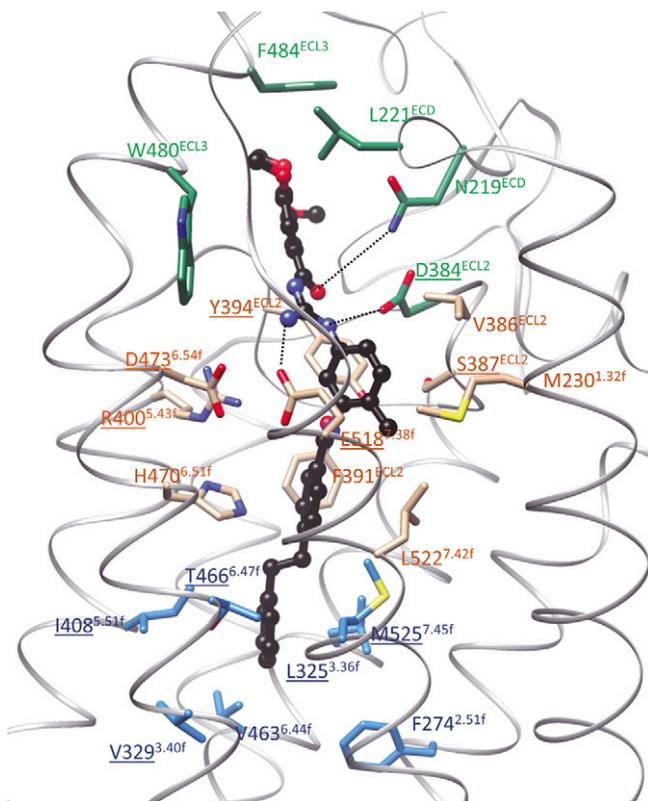


Figure 5. Close-up of the proposed binding mode of MRT-92 to hSmo. The ligand is displayed in ball and sticks using the following color coding: carbon, black; nitrogen, blue, oxygen, red. Smo side chains (carbon atoms) are colored according to their contribution to bind only LY2940680 (green), only SANT-1 (cyan), or both antagonists (tan). Protein nitrogen, oxygen, and sulfur atoms are colored in blue, red, and yellow, respectively. Smo residues are labeled according to the new class F Ballesteros-Weinstein nomenclature (3). Protein–ligand hydrogen bonds are displayed as dashed lines. Amino acids mutated in this study are underlined.

addressed to the cell membrane. Western blot analysis under reducing SDS-PAGE conditions identified a major polypeptide migrating with a molecular mass of 86 kDa in whole lysates of membranes of the transfected HEK293 cells. This signal was absent in control pRK5-transfected cell preparations, thereby indicating its specificity. Importantly, all mutant receptors were expressed at a similar level (L325F, V329F, I408F, T466F, D473H) or more robustly (D384A, S387A, Y394A, R500A, E518K, M525G) than the WT receptor (Fig. 6B).

To investigate the contribution of these amino acids to the MRT-92 binding pocket, we performed a [^3H]MRT-92 binding assay on membranes from HEK293 transiently transfected with WT and mutant Smo receptors. S387A^{ECL2}, I408F^{5.51f}, and D473H^{6.54f} mutations did not modify [^3H]MRT-92 binding (Fig. 6C)—data that were further corroborated by inhibition competition assay of the radioligand showing no difference in the IC₅₀ of MRT-92 for WT and these mutants (Supplemental Table 1). Our data suggest that these residues do not play a significant role in MRT-92 recognition. In contrast, [^3H]MRT-92 binding to membranes of HEK293 cells expressing D384A^{ECL2}, Y394A^{ECL2}, R400A^{5.43f}, and E518K^{7.38f} mutations was reduced to the level of the control pRK5-

transfected cells, excluding further [^3H]MRT-92 binding analysis and demonstrating that these amino acids are required for MRT-92 recognition. For L325F^{3.36f}, V329F^{3.40f}, T466F^{6.47f}, and M525G^{7.45f} mutants, [^3H]MRT-92 binding was significantly impaired (Fig. 6C). In agreement with these data, the IC₅₀ for MRT-92 inhibition deduced from the radioligand competition assay were right-shifted 3- to 8-fold (Supplemental Table 1). On the contrary, for the M525G^{7.45f} mutant, the inhibition curve for MRT-93, which displayed a longer alkyl linker, was left shifted, although it was not statistically significant (Supplemental Fig. 5). These data suggest that MRT-93 can still interact at the back of the mutant pocket, whereas MRT-92 interaction is diminished, which is in agreement with the MRT-92 binding model.

We next determined the IC₅₀ for LY2940680 (type 1 antagonist) and SANT-1 (type 2 antagonist) on mutant receptors retaining [^3H]MRT-92 binding (Supplemental Table 1). The IC₅₀ for LY2940680 inhibition of [^3H]MRT-92 binding was right shifted (3- to 100-fold) for the S387A^{ECL2}, L325F^{3.36f}, and D473H^{6.54f} mutants but did not differ from that of WT receptor for the other mutants (Supplemental Table 1). The ability of SANT-1 to inhibit [^3H]MRT-92 binding to V329F^{3.40f} and T466F^{6.47f} mutants was abolished, and it was severely impaired for L325F^{3.36f}, I408F^{5.51f}, and M525G^{7.45f} mutants (4- to 140-fold drop of the IC₅₀), but was not modified for the S387A^{ECL2} mutant. Taken together, these data confirm our docking hypothesis that MRT-92-binding mode differs from that of either LY2940680 or SANT-1 by simultaneously occupying binding sites 1 and 2 (Fig. 7).

Differential binding modes of Smo modulators to the GDC-0449 resistant D473H mutant

Because the IC₅₀ of MRT-92 was not modified for the D473H mutant, we next evaluated the properties of [^3H]MRT-92 binding to this mutant. Saturation of specific [^3H]MRT-92 binding to membranes of HEK293 cells transiently expressing D473H mutant leads to a linear Scatchard plot and a K_d value of 0.50 ± 0.1 nM (Supplemental Fig. 6), which was not significantly different from [^3H]MRT-92 K_d for WT hSmo. Thus, we utilized this radioligand assay for investigating whether Hh and Smo modulators of different structures interacted with this naturally occurring mutant. [^3H]MRT-92 binding to HEK293 membranes expressing D473H mutant was inhibited in a monophasic manner by MRT-92, MRT-83, and ALLO-2 with potency similar to the WT receptor. However, the dose-response curves for LDE225, LY2940680, SANT-1, M25, and SAG were right shifted (20–100-fold) or abrogated for GDC-0449 and itraconazole (Table 3 and Supplemental Fig. 4).

DISCUSSION

Structural studies of hSmo in complex with various antagonists (2, 3, 7) revealed the existence of 2 type of antagonists: those binding either to the upper 7TM cavity (type 1; e.g., LY2940680, cyclopamine, vismodegib, LDE225) or the bottom part of the 7TM cavity (type 2; e.g., SANT-1). Studying the binding mode of the herein described

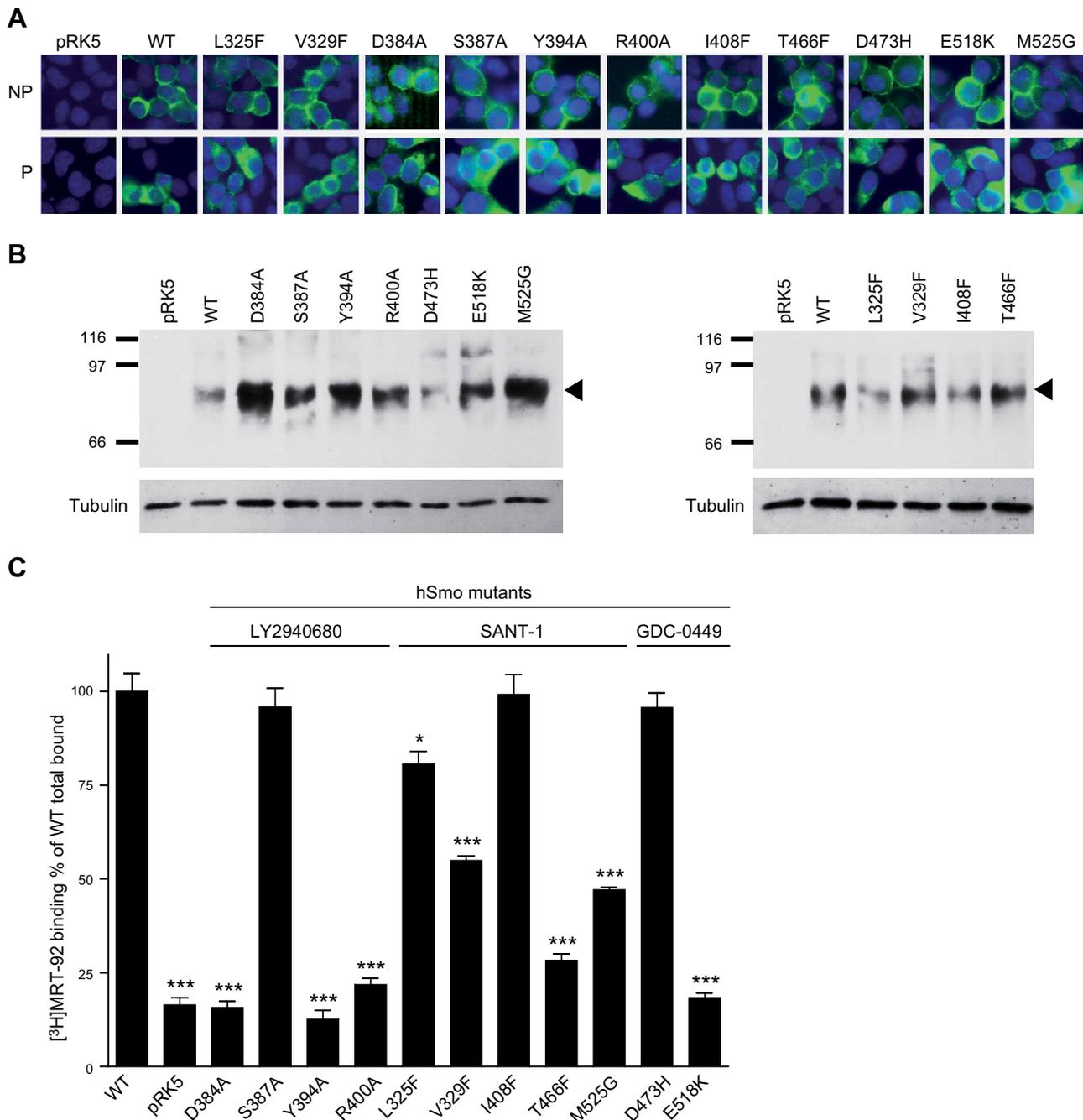


Figure 6. Functional analysis of human WT and mutant Smo receptors. *A*) Analysis of hSmo expression by immunofluorescence in HEK293 cells. Cells were transfected with the WT or mutant hSmo (D384A, S387A, Y394A, R400A, L325F, V329F, I408F, T466F, M525G, D473H E518K). The N-terminal Myc tag was detected using an anti-Myc antibody on nonpermeabilized (NP) or permeabilized (P) cells. *B*) Immunoblot analysis of membranes (5 μ g) of HEK293 cells transiently transfected with an empty vector (pRK5), or a vector containing WT or mutant hSmo, was performed after SDS-PAGE. Smo proteins were detected using an anti-Myc antibody. Molecular mass marker is shown on the left (kDa). Arrowhead on the right indicates the major band corresponding to the WT or mutant hSmo and to γ -tubulin used as charge control. *C*) Effect of Smo mutations on [³H]MRT-92 total binding. Membranes (20 μ g of protein) of HEK293 cells transiently expressing WT or mutant hSmo were incubated with 0.5 nM [³H]MRT-92. [³H]MRT-92 binding is expressed as percentage of the WT total binding (2000 cpm). Data are means \pm SEM ($n = 3$) of 3 to 5 independent experiments. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$.

antagonist, MRT-92, suggests a third binding mode (type 3) bridging the 2 binding sites described above. Moreover, our present study demonstrates that MRT-92 is among the most potent Smo antagonist known so far (Table 1), being almost 10-fold more potent in inhibiting rat GCPs proliferation than GDC-0449 and LDE225,

2 compounds currently in clinical trials for the treatment of medulloblastoma [(17, 33); see also trial numbers NCT00822458, NCT01601184, NCT01239316, NCT01125800, NCT01208831, and NCT00880308, at ClinicalTrials.gov]. MRT-92, like GDC-0449, also blocks the proliferation of medulloblastoma cells from $Ptc^{+/-}$

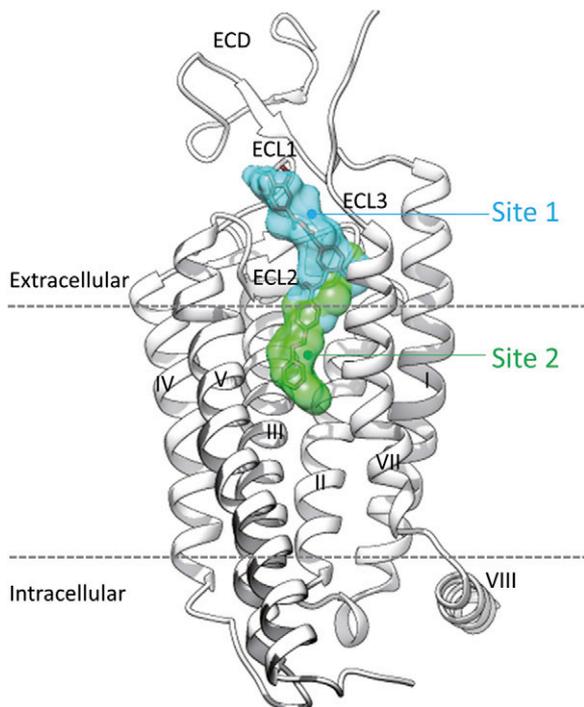


Figure 7. Schematic representation of MRT-92 binding to hSmo. Site 1 (cyan) is occupied by the agonists (SAG, SAG1.5) and antagonists (LY2940680; Anta XV, cyclopamine, KAAD-cyclopamine, GDC-0449), whereas site 2 (green) is only used by the antagonist SANT-1. The novel antagonist MRT-92 (stick model) occupies both sites simultaneously. Smo ECD and loops (ECL1–3) as well as the transmembrane helices are labeled as in Fig. 1. The intracellular helix 8 (VIII) is further indicated with respect to the membrane boundaries (dashed lines).

mice (Fig. 3B), suggesting its potential use in the treatment of medulloblastoma associated to mutation-driven Hh-associated cancers.

Smo antagonists are under intense investigation for a growing number of Hh-dependent tumors (1, 9, 34). However, several clinical trials with Smo antagonists were either discontinued (TAK-441, IPI-926) or led to negative results for patients with metastatic colorectal carcinoma and ovarian cancers treated with GDC-0449 (11, 35, 36). To better understand these failures, it is of utmost importance to relate the clinical efficacy of Smo antagonists to their binding mode and to check whether a highly potent type 3 antagonist like MRT-92 may confer some advantages over the existing type 1 or type 2 Smo antagonists.

Smo can adopt different conformations, both in the cytoplasm and at the primary cilium, and Smo antagonists stabilize distinct conformations in the cilium (1). Cyclopamine drives Smo from the cytoplasm into the cilium in an inactive state, whereas most Smo antagonists acting in the canonical pathway are proposed to block an inactive form of Smo in the cytoplasm. MRT-92 belongs to this class of antagonists. It is suggested that ciliated medulloblastoma with high Hh signaling would respond to treatments that target the primary cilium (37). However, cilia can both mediate and suppress Hh-dependent tumorigenesis (4, 9), and from a therapeutic point of view, it is not yet evident whether a Smo antagonist should block Smo in the cytoplasm or in the primary cilium. MRT-92, like cyclopamine

and GDC-0449, displays low sensitivity to block the effects of GSA-10 on Smo. Hence, it would be important to further determine whether the cancer-related effects of Smo clinical candidates and their adverse effects, which include hair loss, muscle spasms, fatigue, and decreases in weight and appetite (9), are associated with inhibition of different Smo conformations such as Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}.

The X-ray structures of hSmo bound with various antagonists and the agonist SAG1.5 (2, 3, 7) demonstrated the existence of a long and narrow ligand binding pocket delineated by the extracellular linker 3 ECL and 7TM residues where Smo modulators bind. The evidence that MRT-92 binding site (Fig. 7) overlaps the binding pocket of both type 1 and type 2 antagonists is supported by 1) its binding inhibition of a known type 1 antagonist (BC; Table 1), 2) the ability of type 1 and type 2 antagonists to potently inhibit [³H]MRT-92 binding (Table 3), 3) the observation that specific mutations affecting type 1 (3 in ECL2 and 1 in TM7) or type 2 (2 in TM3, 1 in TM6, and 1 in TM7) antagonists abolished or significantly reduced [³H]MRT-92 binding to Smo mutants (Supplemental Table 1), and 4) MRT-92 competitively inhibited SAG-induced differentiation of mesenchymal cells. The 7TM cavity can accommodate a large variety of ligand chemotypes (Supplemental Fig. 2) at overlapping binding sites, sometimes upon minor conformational rearrangement of a few side chains, like L325^{3,36f} or E518^{7,38f} (2, 3, 7). L325^{3,36f} is proposed to act as a gatekeeper to close or open a back pocket in the 7TM crevice (3). This plasticity of the 7TM cavity, as revealed by X-ray studies, is a key player in MRT-92 antagonist potency. When its side chain is perpendicular to the 7TM main axis (*i.e.*, bound to LY2940680), the cavity ends at the middle of the helical bundle, therefore forcing the bound antagonist to mainly interact with ECL residues. When its side chain is parallel to the 7TM main axis (*i.e.*, bound to SANT-1), the back pocket is open such that antagonists deeply penetrate into a bigger cavity (800 Å² for SANT-1-bound Smo *vs.* 700 Å² for LY2940680-bound Smo). Interestingly, the binding of [³H]MRT-92 was only moderately affected by the L325F^{3,36f} mutation, and competition binding experiments revealed that this mutation slightly decreases binding of LY2940680 and of SANT-1 (Supplemental Table 1). In addition, this mutation did not affect the binding of [³H]cyclopamine (3).

Mutations in a single residue (*e.g.*, D473H^{6,54f}) provides the molecular basis for chemoresistance to GDC-0449 (16). The binding of various Smo modulators to the D473H^{6,54f} mutant was rendered difficult by the fact that [³H]cyclopamine does not bind to this mutant excluding further analysis. Here, we propose that MRT-92 will be insensitive to that mutation (Fig. 6), as supported by a similar *K_d* deduced from saturation experiments of [³H]MRT-92 toward WT and D473H^{6,54f} mutant (Fig. 4 and Supplemental Fig. 6) and a similar *K_i* for inhibiting [³H]MRT-92 binding to these receptors. This property is also shared by its close analogs MRT-83 (19) and ALLO-2, which inhibited the GDC-0449-resistant D477G mouse Smo mutant and inhibited both BC and [³H]cyclopamine binding (38). We took advantage of this fact to characterize the potency of structurally different Smo modulators. We observed notably that the D473H^{6,54f} mutation drastically impairs the potency of LDE225, GDC-0449, LY2940680, M25, SANT-1, and SAG to inhibit [³H]MRT-92 binding (Supplemental

Fig. 4). Our data now support previous results deduced from crystallographic experiments for an important role of D473^{6,54f}, clustered with R400^{5,43f} and E518^{7,38f}, to selectively interact with some type 1 antagonists (GDC-0449, cyclopamine), but which was less appreciated for LY2940680 (2), whereas MRT-92 binds to the GDC-0449-resistant W281L^{2,58f} and V321M^{3,32f} mutants has to be further investigated (39).

The antifungal agent itraconazole, shown to inhibit Hh pathway activation with an IC₅₀ in the micromolar range (40), is in clinical trials for the treatment of BCC associated with this pathway (41). Itraconazole does not compete to the BC binding site, and it is hypothesized to act on Smo indirectly (40). We now show that this molecule inhibits [³H]MRT-92 binding to hSmo with high potency ($K_i = 28$ nM), providing the first direct evidence that this molecule is a potent Smo antagonist. However, we found that inhibition of [³H]MRT-92 by itraconazole was sensitive to the D473H^{6,54f} mutation, whereas this molecule was shown to inhibit WT and GDC-0449-resistant D477G mouse Smo with the same potency (29). Thus, further work is required to delineate whether itraconazole belongs to type 1 to 3 antagonists or to yet another type.

Although a large number of Smo antagonists are developed, only a limited number of agonists are characterized (1, 42). SAG inhibits [³H]MRT-92 binding to hSmo, whereas purmorphamine did not. These data suggest a different binding mode for SAG and purmorphamine because the latter was shown to interact at the level of the cyclopamine binding site (30). Recent evidence argues that cyclopamine and GDC-0449, 2 molecules displaying antagonist activity toward canonical Hh signaling, also display agonist activity toward Smo in a 3T3-L1 model of adipose tissue (43). Whether these molecules activate a different form of Smo is not yet known.

Smo antagonists are intensely studied for Hh-dependent tumors. MRT-92 and its derivatives, including [³H]MRT-92, have increased the understanding of how small molecules interact at Smo 7TM and the development of novel antagonists interacting with both sites 1 and 2. This, we believe, will open new avenues for cancer therapy and novel therapeutics. FJ

This work has benefited from the facilities of the TEFOR Molecular Biology Unit, IMAGIF, Gif Research Center. This work was supported by grants from La Ligue contre le Cancer (Comité des Yvelines) and Fondation Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) to M.R. from l'Institut National du Cancer (INCa R10067LS), Marie Curie Integration Grant FP7-PEOPLE-2011-CIG 294010, Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CNRS/INSERM) and Institut Curie (to O.A.). L.H. is the recipient of a doctoral fellowship from La Ligue contre le Cancer and la Fondation Recherche Médicale (FDT20140930825) and L.B. from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Ruat, M., Hoch, L., Faure, H., and Rognan, D. (2014) Targeting of Smoothed for therapeutic gain. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 237–246
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W., Siu, F. Y., Roth, B. L., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2013)

- Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **497**, 338–343
- Wang, C., Wu, H., Evron, T., Vardy, E., Han, G. W., Huang, X. P., Hufeisen, S. J., Mangano, T. J., Urban, D. J., Katritch, V., Cherezov, V., Caron, M. G., Roth, B. L., and Stevens, R. C. (2014) Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nat. Commun.* **5**, 4355–4366
- Ruat, M., Roudaut, H., Ferent, J., and Traiffort, E. (2012) Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation* **83**, S97–S104
- Briscoe, J., and Théron, P. P. (2013) The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 416–429
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., and Beachy, P. A. (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* **418**, 892–897
- Weierstall, U., James, D., Wang, C., White, T. A., Wang, D., Liu, W., Spence, J. C., Bruce Doak, R., Nelson, G., Fromme, P., Fromme, R., Grothmann, I., Kupitz, C., Zatselpin, N. A., Liu, H., Basu, S., Wacker, D., Han, G. W., Katritch, V., Boutet, S., Messerschmidt, M., Williams, G. J., Koglin, J. E., Marvin Seibert, M., Klinker, M., Gati, C., Shoeman, R. L., Barty, A., Chapman, H. N., Kirian, R. A., Beyerlein, K. R., Stevens, R. C., Li, D., Shah, S. T., Howe, N., Caffrey, M., and Cherezov, V. (2014) Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat. Commun.* **5**, 3309–3318
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., and Beachy, P. A. (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev.* **16**, 2743–2748
- Amakye, D., Jagani, Z., and Dorsch, M. (2013) Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Med.* **19**, 1410–1422
- Ng, J. M., and Curran, T. (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 493–501
- Hadden, M. K. (2013) Hedgehog pathway inhibitors: a patent review (2009–present). *Expert Opin Ther Pat* **23**, 345–361
- Von Hoff, D. D., LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Yauch, R. L., Tibes, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brahmer, J. R., Mackey, H. M., Lum, B. L., Darbonne, W. C., Marsters, J. C., Jr., de Sauvage, F. J., and Low, J. A. (2009) Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1164–1172
- LoRusso, P. M., Rudin, C. M., Reddy, J. C., Tibes, R., Weiss, G. J., Borad, M. J., Hann, C. L., Brahmer, J. R., Chang, I., Darbonne, W. C., Graham, R. A., Zerivitz, K. L., Low, J. A., and Von Hoff, D. D. (2011) Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2502–2511
- Nachtergaele, S., Whalen, D. M., Mydock, L. K., Zhao, Z., Malinauskas, T., Krishnan, K., Ingham, P. W., Covey, D. F., Siebold, C., and Rohatgi, R. (2013) Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *eLife* **2**, e01340
- Rana, R., Carroll, C. E., Lee, H. J., Bao, J., Marada, S., Grace, C. R., Guibao, C. D., Ogden, S. K., and Zheng, J. J. (2013) Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signalling. *Nat. Commun.* **4**, 2965–2974
- Yauch, R. L., Dijkgraaf, G. J., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C. P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C. A., Tang, T., Bazan, J. F., Kan, Z., Seshagiri, S., Hann, C. L., Gould, S. E., Low, J. A., Rudin, C. M., and de Sauvage, F. J. (2009) Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* **326**, 572–574
- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., Yu, Q., Ostrom, L., Fordjour, P., Anderson, D. L., Monahan, J. E., Kelleher, J. F., Peukert, S., Pan, S., Wu, X., Maira, S. M., García-Echeverría, C., Briggs, K. J., Watkins, D. N., Yao, Y. M., Lengauer, C., Warmuth, M., Sellers, W. R., and Dorsch, M. (2010) Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci. Transl. Med.* **2**, 51ra70
- Manetti, F., Faure, H., Roudaut, H., Gorjankina, T., Traiffort, E., Schoenfelder, A., Mann, A., Solinas, A., Taddei, M., and Ruat, M. (2010) Virtual screening-based discovery and mechanistic

- characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothened antagonists. *Mol. Pharmacol.* **78**, 658–665
19. Roudaut, H., Traiffort, E., Gorjankina, T., Vincent, L., Faure, H., Schoenfelder, A., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., Taddei, M., and Ruat, M. (2011) Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent Smoothened antagonist. *Mol. Pharmacol.* **79**, 453–460
 20. Solinas, A., Faure, H., Roudaut, H., Traiffort, E., Schoenfelder, A., Mann, A., Manetti, F., Taddei, M., and Ruat, M. (2012) Acylthiourea, acylurea, and acylguanidine derivatives with potent hedgehog inhibiting activity. *J. Med. Chem.* **55**, 1559–1571
 21. Gorjankina, T., Hoch, L., Faure, H., Roudaut, H., Traiffort, E., Schoenfelder, A., Girard, N., Mann, A., Manetti, F., Solinas, A., Petricci, E., Taddei, M., and Ruat, M. (2013) Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothened. *Mol. Pharmacol.* **83**, 1020–1029
 22. Hyman, J. M., Firestone, A. J., Heine, V. M., Zhao, Y., Ocasio, C. A., Han, K., Sun, M., Rack, P. G., Sinha, S., Wu, J. J., Solow-Cordero, D. E., Jiang, J., Rowitch, D. H., and Chen, J. K. (2009) Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 14132–14137
 23. Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M. K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott, M. P., and Beachy, P. A. (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**, 1005–1009
 24. Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y., and Reiter, J. F. (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018–1021
 25. Rohatgi, R., Milenkovic, L., Corcoran, R. B., and Scott, M. P. (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3196–3201
 26. van Amerongen, R., and Nusse, R. (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**, 3205–3214
 27. Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C. W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N. S., Roth, M. G., Amatrua, J. F., Chen, C., and Lum, L. (2009) Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 100–107
 28. Goodrich, L. V., Milenković, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109–1113
 29. Kim, J., Aftab, B. T., Tang, J. Y., Kim, D., Lee, A. H., Rezaee, M., Kim, J., Chen, B., King, E. M., Borodovsky, A., Riggins, G. J., Epstein, E. H., Jr., Beachy, P. A., and Rudin, C. M. (2013) Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothened antagonists. *Cancer Cell* **23**, 23–34
 30. Sinha, S., and Chen, J. K. (2006) Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 29–30
 31. Jain, A. N. (2003) Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J. Med. Chem.* **46**, 499–511
 32. Dijkgraaf, G. J., Alickie, B., Weinmann, L., Januario, T., West, K., Modrusan, Z., Burdick, D., Goldsmith, R., Robarge, K., Sutherland, D., Scales, S. J., Gould, S. E., Yauch, R. L., and de Sauvage, F. J. (2011) Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothened mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res.* **71**, 435–444
 33. Rudin, C. M., Hann, C. L., Laterra, J., Yauch, R. L., Callahan, C. A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S. E., Coleman, B., LoRusso, P. M., Von Hoff, D. D., de Sauvage, F. J., and Low, J. A. (2009) Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1173–1178
 34. Scales, S. J., and de Sauvage, F. J. (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 303–312
 35. McMillan, R., and Matsui, W. (2012) Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4883–4888
 36. Lin, T. L., and Matsui, W. (2012) Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *Oncotargets Ther* **5**, 47–58
 37. Han, Y. G., Kim, H. J., Dlugosz, A. A., Ellison, D. W., Gilbertson, R. J., and Alvarez-Buylla, A. (2009) Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat. Med.* **15**, 1062–1065
 38. Tao, H., Jin, Q., Koo, D. I., Liao, X., Englund, N. P., Wang, Y., Ramamurthy, A., Schultz, P. G., Dorsch, M., Kelleher, J., and Wu, X. (2011) Small molecule antagonists in distinct binding modes inhibit drug-resistant mutant of smoothened. *Chem. Biol.* **18**, 432–437
 39. Brinkhuizen, T., Reinders, M. G., van Geel, M., Hendriksen, A. J., Paulussen, A. D., Winnepeninckx, V. J., Keymeulen, K. B., Soetekouw, P. M., van Steensel, M. A., and Mosterd, K. (2014) Acquired resistance to the Hedgehog pathway inhibitor vismodegib due to smoothened mutations in treatment of locally advanced basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 1005–1008
 40. Kim, J., Tang, J. Y., Gong, R., Kim, J., Lee, J. J., Clemons, K. V., Chong, C. R., Chang, K. S., Fereshteh, M., Gardner, D., Reya, T., Liu, J. O., Epstein, E. H., Stevens, D. A., and Beachy, P. A. (2010) Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* **17**, 388–399
 41. Kim, D. J., Kim, J., Spaunhurst, K., Montoya, J., Khodosh, R., Chandra, K., Fu, T., Gilliam, A., Molgo, M., Beachy, P. A., and Tang, J. Y. (2014) Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **32**, 745–751
 42. Hadden, M. K. (2014) Hedgehog pathway agonism: therapeutic potential and small-molecule development. *ChemMedChem* **9**, 27–37
 43. Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S. L., Loipetzberger, A., Connor, T., Jaeger, C., Kammerer, B., Winter, L., Wiche, G., Dalgaard, K., Selvaraj, M., Gaster, M., Lee-Young, R. S., Febbraio, M. A., Knauf, C., Cani, P. D., Aberger, F., Penninger, J. M., Pospisilik, J. A., and Esterbauer, H. (2012) Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* **151**, 414–426
 44. Masdeu, C., Faure, H., Coulombe, J., Schoenfelder, A., Mann, A., Brabet, I., Pin, J. P., Traiffort, E., and Ruat, M. (2006) Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothened to G15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349**, 471–479
 45. Masdeu, C., Bernard, V., Faure, H., Traiffort, E., and Ruat, M. (2007) Distribution of Smoothened at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* **18**, 395–399
 46. Coulombe, J., Traiffort, E., Loulier, K., Faure, H., and Ruat, M. (2004) Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Mol. Cell. Neurosci.* **25**, 323–333
 47. Charytoniuk, D., Porcel, B., Rodríguez Gomez, J., Faure, H., Ruat, M., and Traiffort, E. (2002) Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J. Physiol. Paris* **96**, 9–16
 48. Zhao, H., Ayrault, O., Zindy, F., Kim, J. H., and Roussel, M. F. (2008) Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev.* **22**, 722–727
 49. Petrel, C., Kessler, A., Maslah, F., Dauban, P., Dodd, R. H., Rognan, D., and Ruat, M. (2003) Modeling and mutagenesis of the binding site of Calhex 231, a novel negative allosteric modulator of the extracellular Ca(2+)-sensing receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 49487–49494
 50. Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108

Received for publication November 20, 2014.

Accepted for publication December 18, 2014.

Supplementary Materials and Methods

Text S1. Tcf/Lef Dependent Luciferase Reporter Assay.

Experiments were performed as previously described (19). After transfection (1h) with the Wnt reporter and the control *R. reniformis* luciferase plasmids, HEK293 cells were incubated with MRT-92 (0.1 μ M), IWR-1 (10 μ M), or vehicle (DMSO) alone, and luciferase activities were measured 48h later using Dual Luciferase assay (Promega). Data are Firefly luciferase activity reported relative to the *R. reniformis* luciferase control activity. MRT-92 did not modify the *R. reniformis* luciferase activity at 0.1 μ M.

Supplementary Figures

Fig. S1. Comparative binding modes of LY2940680 (A), SANT-1 (B) and MRT-83 (C) to human Smo (gray ribbons). The ligand is displayed in ball and sticks using the following color coding: carbon- white; nitrogen- blue; oxygen- red. The molecular surface of each ligand is rendered as a white transparent surface. Smo side chains (carbon atoms) are colored according to their contribution to bind only LY2940680 (green), only SANT-1 (cyan) or both antagonists (tan). Protein nitrogen, oxygen and sulfur atoms are colored in blue, red and yellow, respectively. Smo residues are labeled according to the new class F Ballesteros-Weinstein nomenclature (3). Protein-ligand hydrogen bonds are displayed as dashed lines. Panel A and B represent X-ray structures (PDB accession codes 4JKV and 4N4W, respectively) whereas panel C was obtained by docking MRT-83 into the SANT1-bound hSmo structure (see Molecular docking section in Materials and Methods).

Fig. S2. Chemical structures of reference Hh/Smo modulators MRT-83, GDC-0449, LDE225, LY2940680, SANT-1, cyclopamine, M25, ALLO-2, Itraconazole, SAG and Purmorphamine.

Fig. S3. MRT-92 does not block Wnt signaling. HEK293 cells were transiently transfected with plasmids containing Tcf/Lef-Luciferase reporter, *R. reniformis* luciferase control and, when indicated, with Wnt3a. MRT-92 (0.1 μ M), IWR-1 (10 μ M), or vehicle (DMSO) alone was added. The luciferase activities were measured 48h later. The values correspond to luciferase ratio and are expressed as arbitrary units (AU). Data are means \pm S.E.M. (n=3) of 3 independent experiments. ***, $p \leq 0.001$.

Fig. S4. Inhibition of [³H]MRT-92 binding to human WT and D473H Smo. Inhibition of [³H]MRT-92 binding to wild type (WT, ●) or D473H mutant (D473H, ○) hSmo by increasing concentrations of MRT-92 (A), MRT-83 (B), ALLO-2 (C), LDE225 (D), GDC-0449 (E), LY2940680 (F), SANT-1 (G), M25 (H), Itraconazole (I), SAG (J) or Purmorphamine (K). Data (Means \pm S.E.M., n = 3) are representative of at least 3 independent experiments and represent the percentage of [³H]MRT-92 specific binding determined in the presence of 1 μ M GDC-0449 for WT or 1 μ M MRT-83 for D473H.

Fig. S5. Inhibition of [³H]MRT-92 binding to human WT and M525G Smo by MRT-92 and MRT-93. Inhibition of [³H]MRT-92 binding to wild type (WT, ●) or M525G mutant (M525G, ○) hSmo by increasing concentrations of MRT-92 (A) or MRT-93 (B). Data (Means \pm S.E.M., n=3) are representative of 3 independent experiments and represent the percentage of [³H]MRT-92 specific binding determined in the presence of 1 μ M GDC-0449. MRT-92 displays an $IC_{50} = 1.2$ nM for human WT Smo which is significantly right shifted for M525G mutant Smo ($IC_{50} = 4.8$ nM). MRT-93 displays an $IC_{50} = 7.3$ nM for human WT Smo which is left shifted for M525G mutant Smo ($IC_{50} = 5.2$ nM).

Fig. S6. Saturation binding studies of [³H]MRT-92 at the D473H mutant hSmo. Membranes (20 μ g of proteins) of HEK293 cell transiently expressing D473H hSmo were incubated at 37°C for 180 min in 0.4 mL of HEPES buffer with [³H]MRT-92 in increasing concentrations. Non-specific binding was evaluated using 1 μ M MRT-83. Computer analysis of the specific binding gave a K_d of 0.50 ± 0.1 nM and a B_{max} of 7.9 ± 0.5 pmol/mg of protein. Data (Means \pm S.E.M., n = 3) are representative of 3 independent experiments. Inset: Scatchard plot analysis of the specific binding. Total binding (●), specific binding (○), non specific binding (▲). B: bound [³H]MRT-92, F: free [³H]MRT-92.

Fig. S1

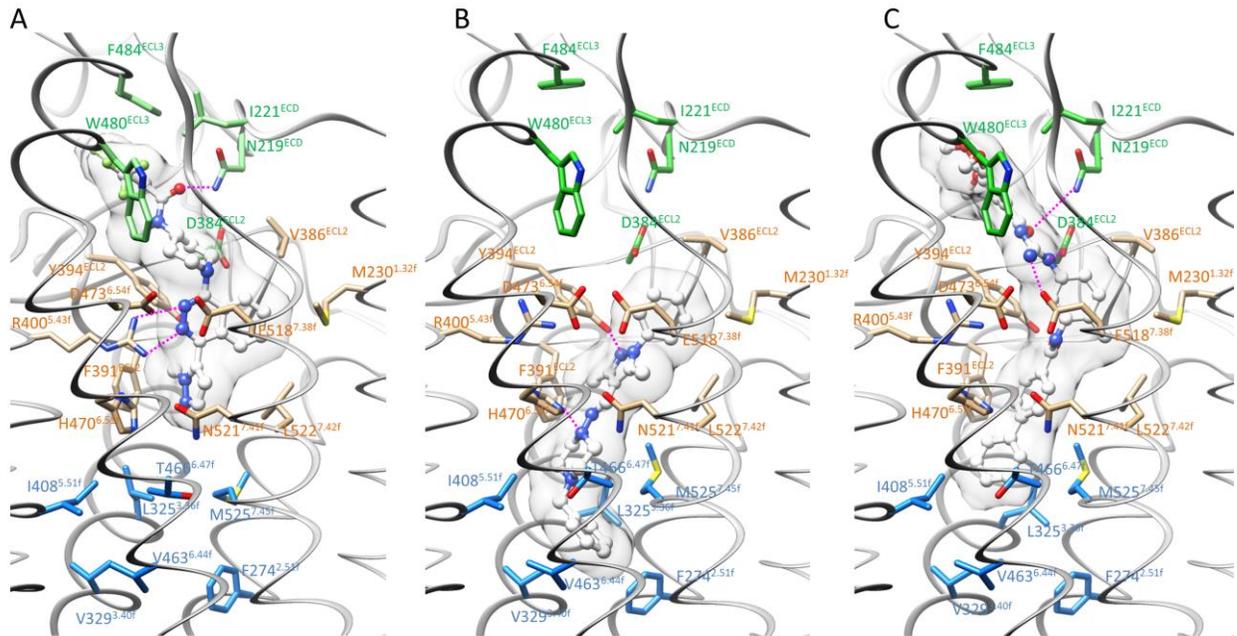


Fig. S2

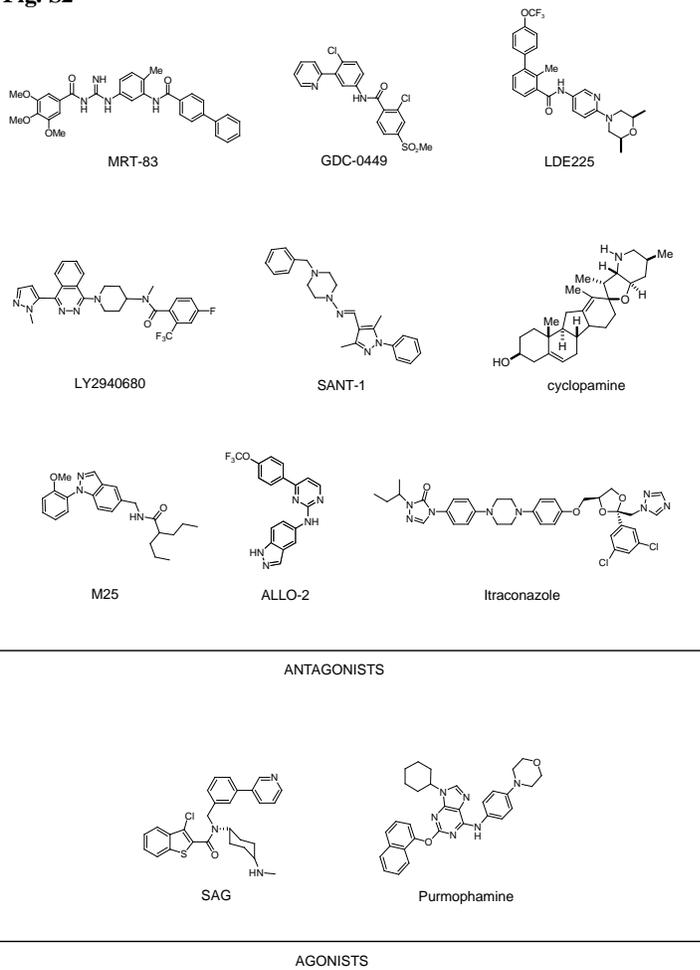


Fig. S3

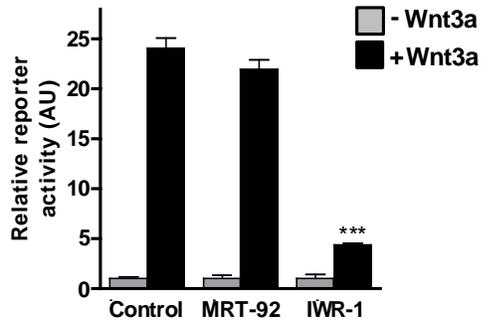


Fig. S4

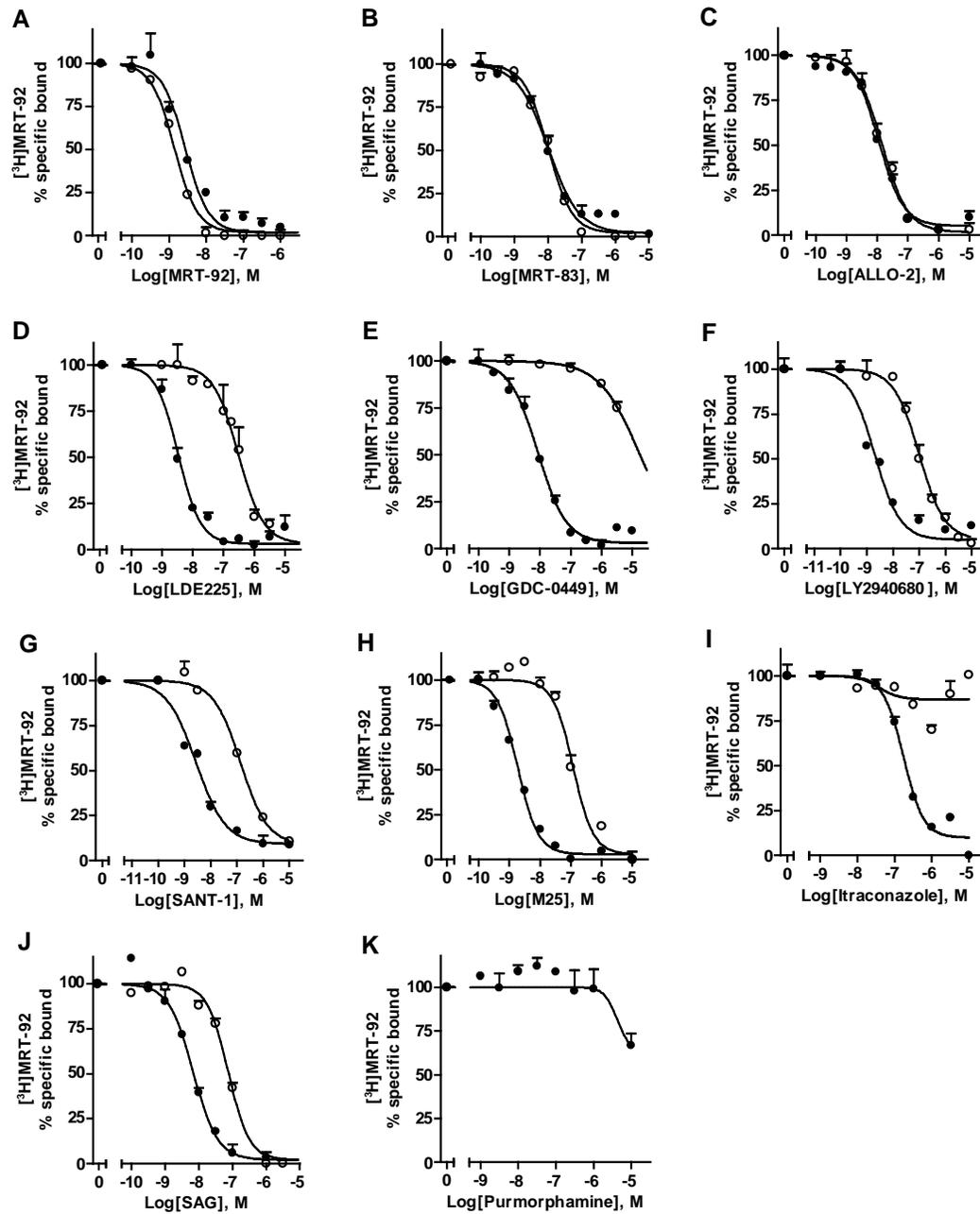


Fig. S5

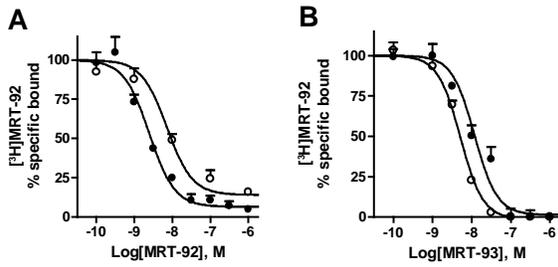
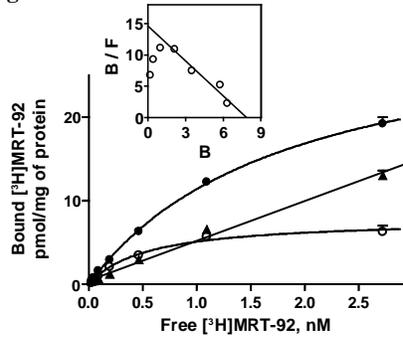


Fig. S6



Supplementary Table S1. IC₅₀ of Smo antagonists for inhibiting [³H]MRT-92 at human WT and mutant Smo receptors.

hSmo variant	Binding site	IC ₅₀ (nM)		
		MRT-92	LY2940680	SANT-1
WT	n.a.	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.4	2.4 ± 0.2
D384A ^{ECL2}	1	n.a.	n.a.	n.a.
S387A ^{ECL2}	1, 2	1.4 ± 0.7	15.2 ± 3.2**	2.4 ± 1.1
Y394A ^{ECL2}	1, 2	n.a.	n.a.	n.a.
R400A ^{5.43f}	1, 2	n.a.	n.a.	n.a.
D473H ^{6.54f}	1, 2	1.4 ± 0.3	112 ± 1.5***	132 ± 1.8***
E518K ^{7.38f}	1, 2	n.a.	n.a.	n.a.
L325F ^{3.36f}	2	3.9 ± 0.8*	3.6 ± 0.5**	10.1 ± 0.6**
V329F ^{3.40f}	2	6.0 ± 1.5*	2.2 ± 0.5	> 1000***
I408F ^{5.51f}	2	1.1 ± 0.4	1.7 ± 0.5	210 ± 38***
T466F ^{6.47f}	2	10.0 ± 2.7*	n.d.	> 1000***
M525G ^{7.45f}	2	4.8 ± 2.1*	0.6 ± 0.2	345 ± 32***

Data are means ± S.E.M. of 3-5 independent experiments. n.a., not applicable; n.d., not determined; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

Résumé de l'article Gorojankina *et al.*, Mol Pharmacol, 2013

La voie de signalisation Shh est impliquée dans la maintenance des cellules souches et dans la réparation des tissus adultes. Les protéines Shh modulent l'activité électrique des neurones matures et la stimulation de la voie de signalisation Shh a montré une efficacité thérapeutique dans des modèles de la maladie de Parkinson, de la neuropathie diabétique, de la démyélinisation et de l'ischémie du myocarde, suggérant que des petites molécules agonistes de la voie Hh pourraient avoir un intérêt thérapeutique pour le traitement de ces maladies (Ruat *et al.*, 2015). Le récepteur à sept domaines TM Smo est le composant majeur de la transduction de cette voie. Le criblage à haut débit de banques chimiques a conduit à l'identification des molécules agonistes de référence de Smo, le SAG, un chlorobenzothiophène, et la purmorphamine, un dérivé de purine, ainsi que des molécules apparentées. Ces molécules ont été utilisées pour moduler les cellules souches embryonnaires et les cellules souches neurales adultes, mais aucune n'a atteint les essais cliniques (Hadden, 2014).

Dans ce contexte, le développement de nouvelles molécules de structures chimiques différentes est nécessaire afin de pouvoir envisager l'utilisation d'activateurs de la voie de signalisation Hh en clinique. En collaboration avec un bioinformaticien, nous avons généré et validé un modèle pharmacophorique des agonistes de Smo basé sur les structures de la purmorphamine, du SAG et de ses dérivés. Le modèle pharmacophorique que nous avons développé est constitué de deux groupements accepteurs d'hydrogène et de quatre régions hydrophobes. Il a permis le criblage virtuel d'une banque de 400 000 molécules commercialisée par la société Asinex. Parmi les composés dont la structure comprenait les six régions essentielles du pharmacophore, vingt ont été retenus après inspection visuelle et leur

capacité à induire une réponse mettant en jeu la voie Hh, la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2, a été analysée. Le composé quinolone GSA-10, de structure différente du SAG et de la purmorphamine, a été identifié. Le GSA-10 induit la différenciation ostéoblastique avec une affinité similaire à la purmorphamine ($EC_{50} = 1.2$ et $0.8 \mu\text{M}$, respectivement). Le SAG possède une affinité supérieure ($EC_{50} = 0.13 \mu\text{M}$), cependant sa réponse maximale induite ne représente que 75 % de la réponse maximale induite par le GSA-10.

Nous avons analysé la capacité du GSA-10 à induire la différenciation ostéoblastique en présence d'un shRNA du gène *Smo* ou *Ptc*. Comme pour le SAG, le traitement des cellules par un shRNA *Smo* diminue significativement l'effet du GSA-10 et à l'inverse, le traitement des cellules par un shRNA *Ptc* augmente l'effet du GSA-10, suggérant que ce composé se lie à *Smo* pour induire la différenciation ostéoblastique. De plus, nous avons observé que le GSA-10 ne stimule pas les voies de signalisation Wnt et BMP, suggérant que les effets de ce composé sur la différenciation ostéoblastique sont spécifiques de la voie de signalisation Hh.

Nous avons caractérisé les propriétés agonistes du composé GSA-10 dans d'autres tests cellulaires. Contrairement au SAG, le GSA-10 ne stimule pas l'expression du gène rapporteur Gli-luciférase des cellules *Shh-light* et diminue significativement l'expression du gène *Gli1*, il n'induit pas la prolifération de cultures primaires de GCP de cervelet de raton et n'induit pas la translocation du récepteur *Smo* au cil primaire des cellules NIH3T3 et C3H10T1/2. Le GSA-10 ne déplace pas la liaison de la BC à *Smo*, suggérant l'existence de deux sites de liaison distincts sur *Smo*, Smo^{SAG} et $\text{Smo}^{\text{GSA-10}}$. De plus, nous avons observé que la toxine cholérique et la forskoline, deux activateurs connus de l'adénylate cyclase, sont des régulateurs positifs et négatifs de la différenciation cellulaire induite par le GSA-10 et le

SAG, respectivement. La PTX régule également la différenciation ostéoblastique induite par le SAG mais n'a pas d'effet sur le GSA-10, suggérant une différence dans le couplage de Smo avec les protéines G.

De façon intéressante, nous avons observé que le GSA-10 et le SAG agissent synergiquement sur la différenciation des cellules C3H10T1/2. En présence de 1 μM de GSA-10, l' EC_{50} du SAG est diminuée de 14 fois, de 0.14 μM à 0.01 μM . En présence de 0.3 μM de SAG, l' EC_{50} du GSA-10 est diminuée de 2 fois, de 0.9 μM à 0.4 μM . L'augmentation de l'activité maximale des cellules n'est pas additive mais fortement potentialisée par les deux molécules. Ces résultats fournissent des preuves supplémentaires pour un mécanisme d'action distinct pour les deux molécules. Aucune potentialisation n'a été observée par l'addition de SAG et de GSA-10 lors de l'analyse de la translocation de Smo dans le cil primaire, suggérant que l'effet synergique observé dans la différenciation ostéoblastique n'est pas lié à la translocation de Smo dans le cil primaire.

Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence de nouveaux états conformationnels de Smo pouvant être discriminés pharmacologiquement par les antagonistes. En effet, l'affinité du GDC-0449, du CUR61414 et de la cyclopatamine est de 10 à 300 fois inférieure pour le $\text{Smo}^{\text{GSA-10}}$, en comparaison au Smo^{SAG} . Nous avons identifié que le MRT-83 est un antagoniste compétitif de la forme Smo^{SAG} avec une affinité de 11 nM. L'effet du GSA-10 sur l'expression du gène *Gli1* dans les cellules Shh-light suggère que le GSA-10 pourrait avoir une activité antagoniste sur le récepteur Smo^{SAG} . En présence de 1 μM de GSA-10, l'induction maximale du SAG est réduite mais ne déplace pas son EC_{50} suggérant un antagonisme non compétitif du GSA-10.

L'ensemble de ces résultats démontre que le criblage virtuel de banques de molécules à l'aide d'un pharmacophore est une approche appropriée à la découverte de nouvelles molécules agonistes du récepteur Smo. Le GSA-10 appartient à une nouvelle famille de composés qui stimule une voie de signalisation Hh non-canonique. Son effet sur la différenciation ostéoblastique suggère un potentiel thérapeutique pour les maladies osseuses. Ces résultats démontrent également la variabilité importante des conformations de Smo induites par les différents agonistes. Leur implication dans le développement des tumeurs liées à la voie Hh devra être étudiée et la recherche de nouveaux agents thérapeutiques sélectifs des différentes conformations envisagée.

Discovery, Molecular and Pharmacological Characterization of GSA-10, a Novel Small-Molecule Positive Modulator of SmoothenedSM

Tatiana Gorojankina, Lucile Hoch, H el ene Faure, Hermine Roudaut, Elisabeth Traiffort, Angèle Schoenfelder, Nicolas Girard, André Mann, Fabrizio Manetti, Antonio Solinas, Elena Petricci, Maurizio Taddei, and Martial Ruat

CNRS, UPR-3294, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2118, Gif-sur-Yvette, France (T.G., L.H., H.F., H.R., E.T., M.R.); Laboratoire d'Innovation Thérapeutique CNRS, UMR-7200, Universit  de Strasbourg, Illkirch, France (A.Sc., N.G., A.M.); and Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Universit  degli Studi di Siena, Siena, Italy (F.M., A.So., E.P., M.T.)

Received December 20, 2012; accepted February 8, 2013

ABSTRACT

Activation of the Smoothened (Smo) receptor mediates Hedgehog (Hh) signaling. Hh inhibitors are in clinical trials for cancer, and small-molecule Smo agonists may have therapeutic interests in regenerative medicine. Here, we have generated and validated a pharmacophoric model for Smo agonists and used this model for the virtual screening of a library of commercially available compounds. Among the 20 top-scoring ligands, we have identified and characterized a novel quinolinecarboxamide derivative, propyl 4-(1-hexyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamido) benzoate, (GSA-10), as a Smo agonist. GSA-10 fits to the agonist pharmacophoric model with two hydrogen bond acceptor groups and four hydrophobic regions. Using pharmacological, biochemical, and molecular approaches, we provide compelling evidence that GSA-10 acts at Smo to

promote the differentiation of multipotent mesenchymal progenitor cells into osteoblasts. However, this molecule does not display the hallmarks of reference Smo agonists. Remarkably, GSA-10 does not recognize the classic bodipy-cyclopamine binding site. Its effect on cell differentiation is inhibited by Smo antagonists, such as MRT-83, SANT-1, LDE225, and M25 in the nanomolar range, by GDC-0449 in the micromolar range, but not by cyclopamine and CUR61414. Thus, GSA-10 allows the pharmacological characterization of a novel Smo active site, which is notably not targeted to the primary cilium and strongly potentiated by forskolin and cholera toxin. GSA-10 belongs to a new class of Smo agonists and will be helpful for dissecting Hh mechanism of action, with important implications in physiology and in therapy.

Introduction

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is implicated in growth and patterning during development. This pathway regulates stem cell maintenance and repair in adult tissues. Aberrant Hh signaling linked to gene pathway mutations is associated with severe physiologic consequences, such as birth defects and with development of cancer, including basal cell carcinoma and medulloblastoma. Hh signaling also supports the tumor microenvironment (Heretsch et al., 2010; Low and de Sauvage, 2010; Ng and Curran, 2011). Hh ligands activate the pathway through binding to the twelve-transmembrane receptor

Patched (Ptc), leading to the derepression of Smoothened (Smo), a seven-transmembrane protein presumably belonging to the G protein-coupled receptor superfamily. Smo signals through a complex transduction machinery that includes the Gli family of transcription factors, resulting in the expression of Hh target genes, including *Gli1* and *Ptc*. Trafficking of proteins involved in Hh signaling up and down the primary cilium has rapidly emerged as a key step in the processing of the Hh signal. Ptc is proposed to be localized to the cilium in the absence of its ligand and to inhibit signaling by excluding Smo from this organelle. After ligand binding, simultaneous removal of Ptc and localization of Smo to cilia occur (Goetz and Anderson, 2010; Ruat et al., 2012).

This work was supported by Ministero Istruzione Universit  e Ricerca within the PRIN 2009 Project [2009RMW3Z5_006 to M.T. and F.M.]; La Ligue contre le Cancer (comit  des Yvelines et de l'Essonne to M.R.); The Neuropole de Recherche Francilien [doctoral fellowship 248890 to H.R.]; La Ligue contre le Cancer (to L.H.); and Asinex.

dx.doi.org/10.1124/mol.112.084590.

SM This article has supplemental material available at molpharm.aspetjournals.org.

Smo has been identified as a molecular target for the action of antagonists aimed at blocking the Hh pathway. Smo inhibitors, such as GDC-0449 and LDE225, are candidates for the treatment of cancers associated with dysfunction of Hh signaling, and the search for Smo antagonists is under intense study (Heretsch et al., 2010; Low and de Sauvage, 2010; Ng

ABBREVIATIONS: AP, alkaline phosphatase; BC, Bodipy-cyclopamine; CTX, cholera toxin; DMSO, dimethyl sulfoxide; GCPs, cerebellar granule cell precursors; HEK, human embryonic kidney; Hh, Hedgehog; Smo, Smoothened; PCR, polymerase chain reaction; Ptc, Patched; PTX, pertussis toxin; qPCR, quantitative PCR; RT-PCR, reverse-transcription PCR.

and Curran, 2011). On the other hand, Hh proteins modulate electrical activities of mature neurons, and stimulation of the Hh pathway has shown therapeutic efficacy in models of Parkinson disease, diabetic neuropathy, and myocardial ischemia, suggesting that small-molecule agonists of the Hh pathway may have therapeutic interest (Traiffort et al., 2010). High-throughput screening of chemical libraries has led to the identification of the Smo reference agonists SAG, a chlorobenzothiophene (Brunton et al., 2009; Chen et al., 2002; Frank-Kamenetsky et al., 2002), and purmorphamine, a purine derivative (Fig. 1A) (Wu et al., 2002; Sinha and Chen, 2006). SAG has been shown to act as a neuroprotective agent in neonates displaying glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury, which suggests the potential clinical interest of Smo agonists (Heine et al., 2011). SAG and purmorphamine have been used for modulating various patterning events in embryonic stem cells and adult neural precursor cells (Frank-Kamenetsky et al., 2002; Danjo et al., 2011). Further investigations are necessary for delineating the potential interest of several glucocorticoids (Wang et al., 2010) and oxysterols (Corcoran and Scott, 2006; Nachtergaele et al., 2012) as Smo agonists. However, only a limited number of Smo agonists have yet been characterized, and none has reached clinical trials.

We report here the discovery of a novel Smo agonist, a quinolinecarboxamide named GSA-10, belonging to a new chemical class of Hh modulators, and that promotes the differentiation of multipotent mesenchymal progenitor cells into osteoblasts. Characterization of GSA-10 in cell-based assays demonstrates that this molecule does not display the hallmarks of reference Smo agonists and specifically allows the pharmacological identification of a novel Smo active site, which is notably not targeted to the primary cilium. Moreover, the results provide novel important insights into the pharmacological properties of reference Smo antagonists currently in clinical development for treating various cancers.

Materials and Methods

Pharmacophore Design and Virtual Screening. The chemical structures of purmorphamine and SAG agonists were used to build the six-feature pharmacophoric model for Smo agonists by means of

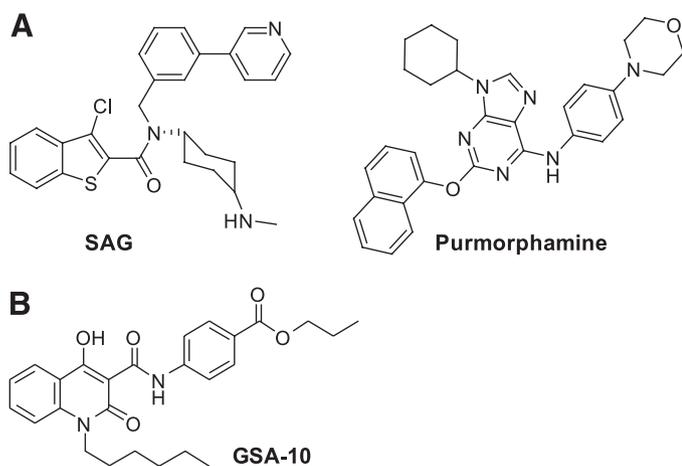


Fig. 1. Chemical structures of reference Smo agonists SAG and purmorphamine (A) and of GSA-10, a novel molecule identified from virtual screening (B).

the software Discovery Studio (version 3.0; Accelrys Software Inc., San Diego, CA). In particular, the common feature hypothesis generation routine (HipHop, formerly belonging to the Catalyst software) was applied to identify the common chemical features shared by the compounds (called the pharmacophoric model). The resulting pharmacophoric model was then used as a three-dimensional query to mine in silico the Asinex (Moscow, Russia) Gold, and Platinum Collections. Twenty compounds (structures are available in Supplemental Table 1) were selected from the final ranking list on the basis of their fit value and the uniqueness of the molecular structure. Further details of the computational protocol were previously described (Manetti et al., 2010).

Small Molecules. Potential Smo modulators identified from virtual screening were purchased from Asinex. MRT-83, CUR61414, and SAG were synthesized as described elsewhere (Solinas et al., 2012). M25 (2-ethyl-N-((1-(2-methoxyphenyl)-1H-indazol-5-yl)methyl)butanamide) was prepared in accordance with a general procedure reported for analogous 1H-indazoles (Dessole et al., 2009). Analytical data for M25 were as follows: mp, 77°C (heptane/AcOEt); ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.18 (s, 1H, H(ar)); 7.68 (s, 1H, H(ar)), 7.45 (m, 2H, H(ar)); 7.29 (m, 2H, H(ar)); 7.11 (m, 2H, H(ar)); 5.73 (m, 1H, NH); 4.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H, NCH_2Ar); 3.80 (s, 3H, OCH_3); 2.06 (m, 1H, CH(al)); 1.66–1.26 (m, 8H, $\text{CH}_2(\text{al})$); 0.90 (m, 6H, $\text{CH}_3(\text{al})$); LRMS-ESI (m/z) 380.2 ($M+1$). Cyclopamine and Bodipy-cyclopamine were from Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada); SANT-1 from ChemBridge Corporation (San Diego, CA); GDC-0449, LDE225, and CHIR-99021 from Selleck Chemicals (Houston, TX); and purmorphamine from Calbiochem (Merck, Lyon, France). Forskolin and cholera toxin (CTX) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), and pertussis toxin (PTX) was from Calbiochem.

Synthesis of GSA-10. Propyl 4-(1-hexyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamido)benzoate was prepared in accordance with a general procedure already reported for analogous quinolinecarboxamides (Jönsson et al., 2004), as follows: (mp 118–120°C; MeOH/ H_2O); ^1H -NMR [400 MHz, d_6 -dimethyl sulfoxide (DMSO)]: δ 8.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.77 (m, 2H), 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.42–7.31 (m, 4H), 4.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.41 (m, 2H), 1.50 (m, 4H), 1.38–1.10 (m, 6H), 1.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H), 0.89 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (100 MHz, d_6 -DMSO): δ 172.1, 169.7, 162.7, 158.4, 142.4, 139.8, 130.6(2C), 129.8, 127.8, 125.3, 122.5, 120.7, 118.7 (2C) 114.4, 112.7, 61.9, 42.7, 31.8, 29.6, 27.5, 22.9, 21.3, 11.9, 10.8; $[\text{MNA}]^+$ calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}$, 473.2053; found, 473.2049; analysis (calcd., found for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$): C(69.31, 69.20) H(6.71, 6.78) N(6.22, 6.19) O(17.76, 17.83).

Cell Culture and Reagents. Human embryonic kidney (HEK) 293 and C3H10T1/2 were obtained from ATCC, and the Shh-light2 cells were from P.A. Beachy (Stanford University). The HEK-hSmo cell line stably expressing the human Smo was described previously (Roudaut et al., 2011). They were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (plus zeocyn/G418 for Shh-light2, plus G418 for HEK-hSmo). All cell culture reagents were from Life Technologies (Saint Aubin, France). Unless otherwise stated, other reagents are from Sigma-Aldrich.

Plasmids. The pRL-TK Renilla luciferase plasmid is described elsewhere (Manetti et al., 2010) and was given by H. Sasaki. prK5-SP-myc-Smo and prK5-Ptc have been used previously (Masdeu et al., 2006). The Wnt reporter plasmid M50 Super8xTOPFlash (Tcf/Lef) was provided by R. Moon, the pLNC Wnt-3aHA (Wnt3a) by J. Kitajewski, and the pRIAS-BMP4 (BMP4) by C. Tabin. These plasmids (#12456, #18030, and #14001, respectively) were obtained through Addgene (Cambridge, MA). The BMP reporter Bre-Luc plasmid was generously provided by P. Dijke.

Alkaline Phosphatase (AP) Assay. C3H10T1/2 cells were incubated for 6 days in the presence of the studied compounds. For inhibition assay, MRT-83 was used in presence of a defined concentration of GSA-10 or SAG. Similarly, forskolin, PTX, or CTX was mixed with the agonist before being added to the cells. The

cell-based bioassay was performed as described previously (Manetti et al., 2010). All data are mean \pm S.E.M. of quadruplicates and are from a representative experiment of $n \geq 3$.

shRNA Selection and Infection. Predesigned mouse pLKO.1 lentiviral shRNA against Smo (TRCN0000026245) or Ptc (TRCN0000042540; Open Biosystem, Huntsville, AL) was tested in HEK293 cells cotransfected by FuGENE (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) with pRK5-SP-myc-Smo or pRK5-Ptc (1:1) as described elsewhere (Roudaut et al., 2011). A pLKO.1 vector expressing nonrelevant shRNA was provided by A. Monteil (Montpellier, France) and used as control. Inhibition efficiency was estimated 48 hours later by Western blotting using C-myc antibody 9E10 (Sigma-Aldrich) for Smo or Ab130, a previously described polyclonal rabbit antiserum against Ptc (Bidet et al., 2011). The shRNAs vectors were used for production of lentiviral particles (lentivectors production facility /SFR BioSciences Gerland; Lyon Sud, UMS3444/US8, France). For lentiviral infection, C3H10T1/2 cells were seeded into 12-well plates (6×10^4 cells/well) and infected the next day with lentiviral particles containing Smo, Ptc, or control shRNAs at a multiplicity of infection of 33 in the presence of polybrene (Sigma). Fresh medium was added 24 hours later, and the following day, cells were transferred into 6 cm Petri dishes in medium supplemented with 2 μ g/ml of puromycin (Life Technologies). After 2 weeks of puromycin selection, cells were plated into 96-well plates without puromycin for a differentiation assay.

RNA Preparation and Semiquantitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction. Total RNA was extracted from C3H10T1/2 cells with use of TRIzol Reagent, and cDNA synthesis was performed using the RT SuperScript II with random hexamer primers (Life Technologies). Semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed on 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). Primer sequences are available on request. Quantitative PCR (qPCR) was performed in duplicate on ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) with use of geometrical mean of three murine genes: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta 2-microglobulin, and TATA-binding protein as endogenous control (Plateforme de qPCR, IMAGIF, Gif/Yvette, France). Gene expression was calculated using the relative quantification method. References for the primers used are indicated in Supplemental Table 2.

Luciferase Reporter Assays. Gli-dependent reporter assay was realized as described elsewhere (Roudaut et al., 2011) in Shh-light2 cells (Chen et al., 2002) stably expressing the Gli-Firefly and renilla reporter. A similar method was used for Wnt (Tcf/Lef) and BMP (Bre-Luc) luciferase reporters as described elsewhere (Roudaut et al., 2011). After cotransfection (1 hour) with the Tcf/Lef or BMP reporter and the control Renilla luciferase plasmid (together with BMP4 or Wnt3a-containing plasmids when indicated), HEK293 cells were incubated with the drug to be tested, and the luciferase activities were measured 48 hours later. All data are firefly luciferase activity reported to the Renilla control activity. At 10 μ M, compounds modified the Renilla activity by less than 30%.

Primary Cerebellar Cultures. Isolation of cerebellar granule cell precursors (GCPs) from P8 male rat and quantification of [3 H]thymidine incorporation were performed as described elsewhere (Roudaut et al., 2011).

Ciliary Smo Accumulation Assay and Bodipy-Cyclopamine Binding. The protocols were adapted from those previously described (Roudaut et al., 2011). Cell culture slides were analyzed using a DMRXA2 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a Photometric Cool-Snap camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany). Images for counting were taken with a 20 \times objective.

Data Analysis. Means and S.E.M. were calculated using Excel 2007. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test. Statistical significance was considered for * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; or *** $P \leq 0.001$. Curve-fitting and IC₅₀ determinations were performed using GraphPad Prism 4.03.

Results

Identification of GSA-10 by Virtual Screening Using a Smo Agonist Pharmacophore. Recently, we identified and developed a series of thioureas, ureas, and guanidines as novel potent Smo antagonists with use of a pharmacophore-based virtual screening strategy (Manetti et al., 2010; Roudaut et al., 2011; Solinas et al., 2012). We reasoned that we could exploit this strategy to identify novel Smo agonists starting from purmorphamine, SAG, and its derivatives as reference Smo agonists (Fig. 1A).

A pharmacophoric model based on the structure of these molecules was built in accordance with a previously described computational protocol (Manetti et al., 2010). This resulted in a model constituted by two hydrogen bond acceptor groups (HBA1-2) and four hydrophobic regions (HY1-4) (Supplemental Fig. 1). Analysis of the superposition pattern of SAG showed a good fit between the Smo agonist and the pharmacophoric model (Supplemental Fig. 1A). In particular, the chlorobenzothiophene moiety and the central phenyl ring matched the hydrophobic regions HY2-HY3-HY4 and HY1, respectively, and the amide carbonyl group and the pyridine nitrogen atom were hydrogen bond acceptors, filling the HBA2 and HBA1 features, respectively. As expected, purmorphamine was also able to fit the pharmacophoric model (Supplemental Fig. 1B). In detail, the hydrophobic features were mapped by the central phenyl (HY1), the cyclohexyl (HY2), and the naphthyl rings (HY3 and HY4). Moreover, the oxygen atom at the morpholine ring was accommodated in HBA1, and the oxygen atom bridging the naphthyl ring and the purinyl heterocycle corresponded to HBA2.

The Asinex Gold collection of diverse drug-like molecules was screened virtually for fitting to the six-feature model developed for Smo agonists. Then, 20 compounds were visually selected and analyzed at 10 μ M in a primary screening procedure using the differentiation of the mesenchymal pluripotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts with use of measurement of AP enzymatic activity, which is a readout for Smo agonists activity (Sinha and Chen, 2006; Manetti et al., 2010). One compound, GSA-10 ([propyl 4-(1-hexyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamido)benzoate] (Fig. 1B), shows structural differences with the chlorobenzothiophene SAG and the purine derivative purmorphamine. However, GSA-10 fits well to the pharmacophoric model, with all six key features being satisfied by different functional groups (Fig. 2). The HBA1-2 groups of the pharmacophore are represented by the carbonyl oxygen of the ester side chain and by the carbonyl oxygen of the quinolinone fragment, respectively. The hydrophobic groups are matched by the central phenyl ring (HY1), the terminal methyl group of the N1 hexyl side chain (HY2), the condensed phenyl ring (HY3), and the C2-C3 atoms of the same chain (HY4). GSA-10 stimulated the AP response by more than 16-fold above the basal level (Fig. 3A; Supplemental Table 1). GSA-10 was as potent (half-maximal effective concentration EC₅₀, $\sim 1.2 \mu$ M) as purmorphamine (EC₅₀, $\sim 0.8 \mu$ M) in the differentiation assay. We observed that SAG was more potent (EC₅₀, $\sim 0.13 \mu$ M) than GSA-10, whereas SAG maximal response represented only $\sim 75\%$ of GSA-10 maximal response ($n = 18$). Both molecules induced the transcription of the AP gene in C3H10T1/2 cells, as measured by semiquantitative reverse-transcription PCR (RT-PCR) (Fig. 3B). AP was also identified

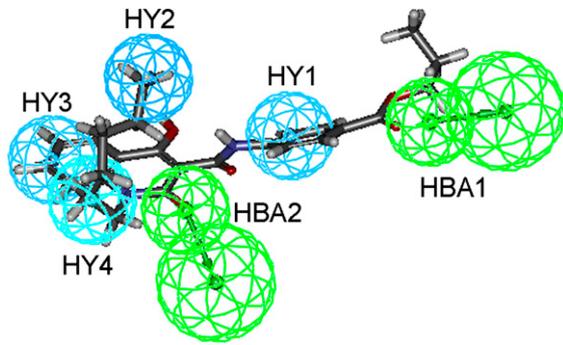


Fig. 2. Proposed pharmacophoric model for GSA-10. Graphical representation of GSA-10 fitted to the proposed pharmacophoric model for Smo agonists. Pharmacophoric features are color coded: hydrogen bond acceptor groups (HBA1 and HBA2) in green; hydrophobic regions for aromatic rings (HY1 and HY3) in light blue; aliphatic group (HY2) in dark blue; generic hydrophobic (HY4) in cyan. Each of the HBA features is constituted by two green spheres; the smaller is filled by the hydrogen bond acceptor atom of the agonist, and the largest sphere is located at the end of a vector and represents the region where the corresponding hydrogen bond donor group of the receptor counterpart should be located. The atoms are color coded: black, carbon; gray, hydrogen; red, oxygen; and blue, nitrogen.

by histochemical staining in cells treated with GSA-10 or SAG, compared with control-treated C3H10T1/2 cells (data not shown). These results demonstrate that GSA-10 promotes the differentiation of multipotent mesenchymal progenitor cells into osteoblasts and, therefore, represents a novel potent osteogenic molecule.

GSA-10 Mediates Differentiation of Mesenchymal Cells through Smo. We then investigated the effects of both Smo and Ptc depletion in C3H10T1/2 cells on the GSA-10- and SAG-mediated differentiation response through the use of specific shRNAs (Fig. 3, C and D). The efficiency of Smo and Ptc shRNAs to induce Smo or Ptc depletion, respectively, was validated by Western blot analysis of membrane extracts from HEK-293 over-expressing these proteins (Supplemental Fig. 2). We compared the differentiation activity of GSA-10 and SAG with that of CHIR-99021, which was shown to mimic Wnt signaling and to induce osteoblast differentiation through GSK3 inhibition (Bennett et al., 2002). Smo shRNA blocked both GSA-10- (60%) and SAG- (85%) induced differentiation of C3H10T1/2 cells into osteoblasts, compared with control shRNA (Fig. 3C). These data are in agreement with the model that GSA-10 binds and activates Smo. Ptc shRNA increased both GSA-10- (2.4-fold) and SAG- (15-fold) induced AP activity, compared with control shRNA (Fig. 3D). These data are consistent with the model in which Ptc represses Smo and that suppression of this blockade results in the increase of Smo activity. It also supports the hypothesis that Ptc modulates the Smo activity, which is triggered by both SAG and GSA-10 in C3H10T1/2 cells.

GSA-10 Does Not Display the Hallmarks of SAG at Hh Signaling. We further compared SAG and GSA-10 activity in other Hh cell-based assays. We first tested these compounds at a large range of doses in NIH3T3 cells stably transfected with a Gli-dependent firefly luciferase reporter (Taipale et al., 2000). This mouse embryonic fibroblast cell line has been widely used for measuring Hh signaling activity through Smo (Solinas et al., 2012). We observed that, as expected (Masdeu et al., 2006), SAG potently stimulated Hh reporter gene transcription with an EC_{50} of $\sim 0.15 \mu\text{M}$,

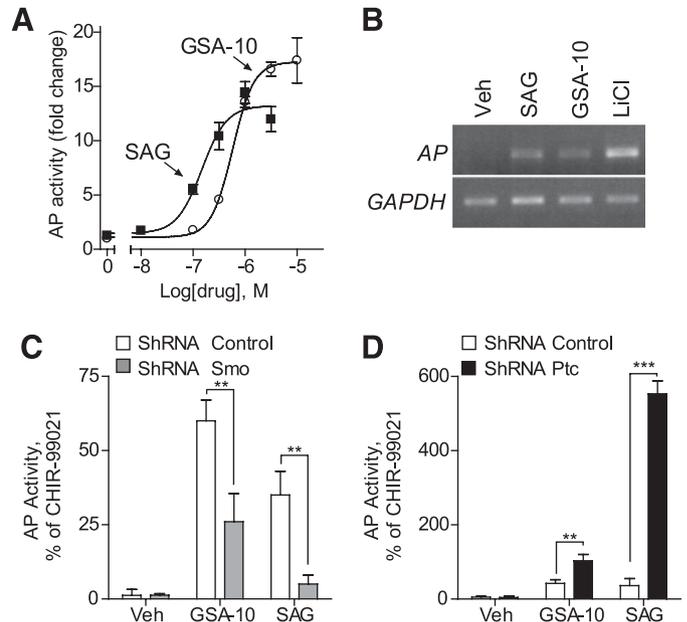


Fig. 3. Characterization of GSA-10. (A) Both GSA-10 and the Smo agonist SAG stimulate differentiation of the mesenchymal pluripotent C3H10T1/2 cells. Data are expressed in fold change of AP activity. (B) AP and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase expression in C3H10T1/2 cells tested by semiquantitative RT-PCR. Total RNAs were prepared from cells treated for 48 hours with vehicle (Veh), SAG ($1 \mu\text{M}$), GSA-10 ($10 \mu\text{M}$), or LiCl (20mM), which induces differentiation through inhibition of GSK3. (C and D) Opposite effect of Smo or Ptc knockdown on GSA-10 and SAG activity. C3H10T1/2 cells infected with shRNA Smo (C), ShRNA Ptc (D), or control shRNA were treated with GSA-10 ($3 \mu\text{M}$), SAG ($1 \mu\text{M}$), the GSK3 inhibitor CHIR-99021 ($3 \mu\text{M}$), or vehicle alone for 6 days. The AP activity was then measured. Data are expressed as percentage of AP activity induced by CHIR-99021 and are mean \pm S.E.M. of 3–4 experiments performed in quadruplicates. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$, compared with control shRNA.

whereas GSA-10 displayed no stimulatory effect, even at $10 \mu\text{M}$ (Fig. 4A). Abnormal Hh signaling in the cerebellum has been proposed to be responsible for medulloblastoma both in mice and in humans (Low and de Sauvage, 2010). Cerebellar GCPs proliferate in response to Hh pathway activation (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Roudaut et al., 2011). Increasing concentrations of SAG caused a dose-dependent increase in the proliferation of rat GCPs measured by [^3H]thymidine incorporation and corresponding to a near 90-fold increase over basal level (EC_{50} , $\sim 5 \text{nM}$) (Fig. 4B). Relative to DMSO vehicle, the treatment by GSA-10 up to $10 \mu\text{M}$ did not significantly modify GCP proliferation (Fig. 4B).

Hh pathway activation has been demonstrated to depend on Smo accumulation at the primary cilium (Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007; Roudaut et al., 2011; Ruat et al., 2012). Thus, we assayed GSA-10 to induce accumulation of endogenous Smo in the primary cilium of C3H10T1/2 cells that are responsive to GSA-10 (Fig. 4, C and D). In DMSO vehicle-treated cells, Smo was not detected at the primary cilium visualized by the acetylated tubulin-positive signal (Fig. 4C). The number of Smo-positive cilia was increased from 3% for vehicle to 5.8% and 50% in cells treated with GSA-10 ($10 \mu\text{M}$) or SAG ($1 \mu\text{M}$), respectively (Fig. 4D). We also observed that Smo trafficking to the primary cilium was achieved by cyclopamine and purmorphamine, in agreement with previously published data (Wang et al., 2009; Wilson et al., 2009; Roudaut et al., 2011). The effect of GSA-10 on Smo trafficking to the primary

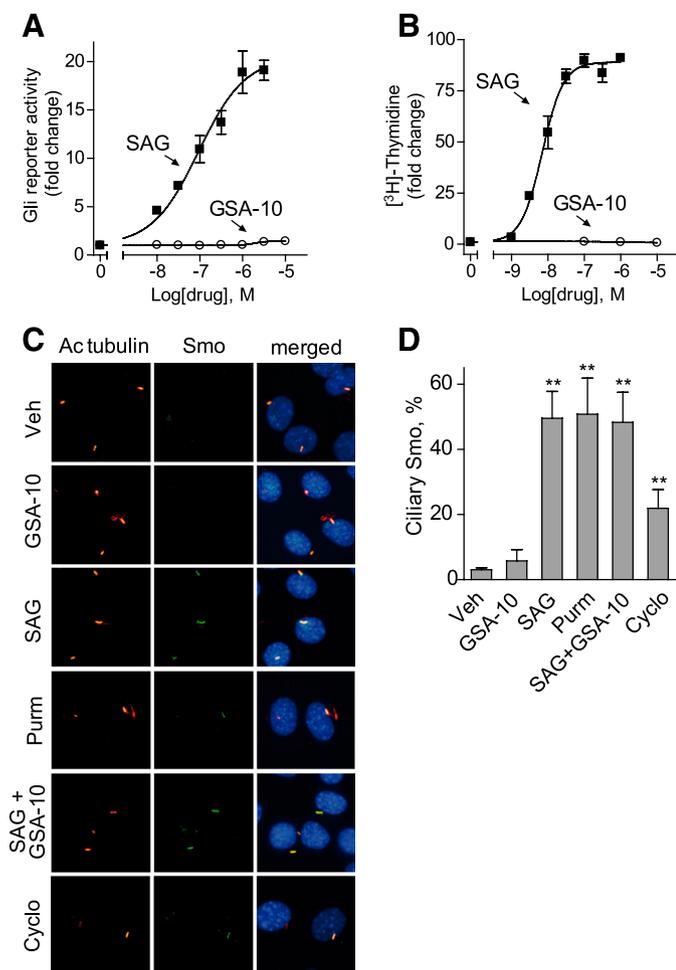


Fig. 4. Modulation of Hh signaling by GSA-10. (A) Gli-luciferase reporter activity in Shh-light2 cells was measured at increasing concentrations of SAG or GSA-10 and plotted as fold change, compared with cells treated with vehicle alone. (B) Effect on rat cerebellar granule cell precursors proliferation. [³H]Thymidine incorporation is increased in response to SAG but not to GSA-10 and is expressed as fold change, compared with proliferation in vehicle treated cells. (C and D) Smo ciliary translocation analysis. (C) Representative immunofluorescent images of C3H10T1/2 cells treated overnight with vehicle (Veh), GSA-10 (10 μ M), SAG (1 μ M), purmorphamine (5 μ M), or cyclopamine (Cyclo, 3 μ M) or by a combination of SAG and GSA-10 were stained with antibodies against endogenous Smo (green) and acetylated (Ac) tubulin (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). (D) The percentage of Smo-positive cilia was calculated for each drug in three independent fields for each point. Data are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. GSA-10 does not induce Smo trafficking to the cilium nor modify the activity of SAG. ** $P \leq 0.01$, compared with Veh.

cilium was not significant, contrary to the effect of the other compounds (Fig. 4D). We confirmed these results with use of the NIH3T3 Hh-responsive cell line (Supplemental Fig. 3). We did not evidence inhibition of SAG-induced accumulation of Smo at the primary cilium by GSA-10 (Fig. 4, C and D). Thus, GSA-10 is not an antagonist of this response.

Remarkably, altogether these results demonstrate that GSA-10 does not display the hallmarks of a conventional Smo agonist; it induces neither Gli-dependent reporter gene transcription nor GCP proliferation, and it does not regulate the subcellular localization of Smo at the primary cilium.

GSA-10 Does Not Stimulate Wnt and BMP Signaling. We analyzed then the ability of GSA-10 and SAG to modify the Wnt and BMP signaling pathways reported to be implicated in C3H10T1/2 differentiation (Jackson et al., 2005;

Kang et al., 2009). To this aim, HEK293 cells were transiently transfected with a Tcf/lef- or Bre-dependent firefly luciferase reporter together with a *Renilla reniformis* luciferase control reporter (Masdeu et al., 2006) (Fig. 5, A and B). GSA-10 (10 μ M) and SAG (1 μ M) did not significantly modify Tcf/lef- or Bre-dependent luciferase activities, which were increased significantly when Wnt3a and BMP4 were transfected in these cells, respectively. Together, these results suggest that GSA-10 does not modify the expression of Wnt and BMP target genes.

Opposite Effects of GSA-10 and SAG on *Gli1* Transcript Levels. Because GSA-10 failed to induce Gli-reporter luciferase transcription, the mechanism of action of GSA-10 on the differentiation of C3H10T1/2 was puzzling. Therefore, we compared the effects of GSA-10 (10 μ M) and SAG (1 μ M) with DMSO vehicle on the transcription of genes likely to be regulated by Hh signaling, such as *Gli1-3*, *Ptc1*, and *Smo*. We also tested the effect of LiCl (20 mM), which activates Wnt signaling and induces C3H10T1/2 differentiation (Jackson et al., 2005). Semiquantitative PCR was done at various time points starting as early as 15 hours to 4 days after stimulation. As expected, an increase in *Gli1* and *Ptc1* transcription was observed in SAG-treated samples and was already maximal at 48 hours, whereas no significant change in *Gli2-3* and *Smo* transcription was observed (Supplemental Fig. 4). By contrast, GSA-10 treatment did not increase the transcription of any of these genes but rather slightly decreased the transcription of *Gli1* and *Ptc1* at 48 hours (Supplemental Fig. 4). To confirm these data, we performed quantitative RT-PCR at 48 hours of treatment, the time when maximal decrease in *Gli1* expression was seen for GSA-10, and we enlarged the list of tested genes linked to the Hh pathway (primer references in Supplemental Table 2). We observed that *Gli1* (~59-fold), *Hip* (~48-fold), *Ptc1* (5.9-fold), and *Ptc2* (5.3-fold) were up-regulated after SAG treatment. We noticed a significant decrease of *Gli1* (3.3-fold) transcript level after GSA-10 treatment in agreement with our previous semiquantitative PCR experiment, whereas the transcription of the other tested genes did not change significantly, compared with control sample (Table 1). These results indicate an opposite effect of GSA-10 and SAG on *Gli1* transcript levels, which again suggests a different mechanism of action for the two molecules on Hh signaling.

GSA-10 and SAG Actions Are Differentially Regulated by cAMP Modulators. We then investigated the effects of forskolin, a positive regulator of the cAMP/PKA transduction pathways and a negative regulator of Hh signaling (Ruiz i Altaba, 1999; Wang et al., 2000), on GSA-10- and SAG-mediated differentiation of C3H10T1/2 cells. In these experiments, the 10-fold stimulation of AP activity induced by SAG (0.3 μ M) was completely abolished when forskolin (10 μ M) was added (Fig. 6A). More remarkably, the 5-fold increase of AP activity induced by GSA-10 (1 μ M) was potentiated by ~3.8-fold in the presence of forskolin (Fig. 6A). We then constructed a dose-response curve of forskolin effect on GSA-10- and SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 (Fig. 6B). Increasing concentrations of forskolin caused a dose-dependent potentiation of the AP response induced by GSA-10 (EC₅₀, 0.7 μ M), whereas an inhibition of this response was observed when SAG was used (IC₅₀, 0.4 μ M).

To identify whether modulation of G α subunits impacts GSA-10- and SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells,

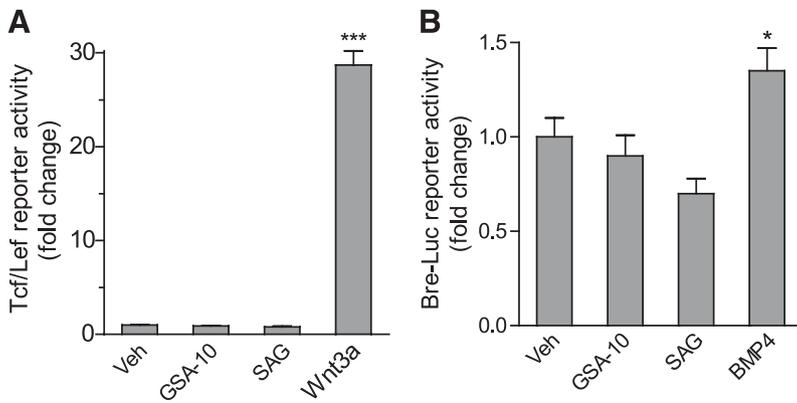


Fig. 5. GSA-10 and SAG do not modify the Wnt and BMP signaling pathways. Tcf/Lef (A) and Bre-Luc (B) reporter activities in HEK293 transfected cells. One hour after cell transfection, vehicle (Veh), GSA-10 (10 μ M), or SAG (1 μ M) were added, and luciferase activities were measured 48 hours later. When indicated, Wnt3a- or BMP4-expressing plasmids were cotransfected with the reporters. The values (mean \pm S.E.M. from three experiments in triplicates) are expressed as fold change, compared with Veh treated cells. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$

we treated the cells with these molecules together with either CTX, which activates adenylate cyclase through $G_{\alpha s}$, resulting in the production of cAMP or pertussis toxin PTX, which impairs receptor-G protein interactions by ADP-ribosylating $G_{\alpha i/o}$ (Fig. 6, C and D). The dose-response curve to SAG was abolished by CTX and forskolin treatment, whereas it was potentiated by PTX with no significant modification of its EC_{50} but with a nearly 3-fold increase in the maximal stimulation. In contrast, EC_{50} of GSA-10 response was left shifted (from 1.1 to 0.4 μ M) in the presence of forskolin and CTX, with an increase in the maximal stimulation (by $\sim 125\%$), but was not affected by PTX treatment. PTX was found to decrease SAG-induced activation of the Gli-luciferase reporter in Shh-light2 cells (Supplemental Fig. 5) as previously reported (Wilson et al., 2009). These results further argue that GSA-10 and SAG are two Smo agonists with different transduction mechanisms. Together, these data demonstrate that CTX and forskolin, two known activators of adenylate cyclase, are positive and negative regulators of GSA-10- and SAG-mediated C3H10T1/2 cell differentiation, respectively.

GSA-10 and SAG Act Synergistically on the Differentiation of C3H10T1/2 Cells. Several models could be proposed for GSA-10 and SAG action at Smo. First, the two molecules are interacting in an allosteric manner on Smo, and the final response could be synergistic or not. However,

because of the opposite effects that forskolin exerts on SAG- and GSA-10-mediated AP response presented above, this seems unlikely. The second hypothesis would be that these molecules act on different forms of Smo independently in the cell, with the final response being additive or synergistic if different transduction mechanisms are involved.

To determine whether GSA-10 and SAG act synergistically or not on the differentiation of C3H10T1/2 cells, we established the dose-response curve corresponding to the AP activity induced by SAG in the presence or the absence of GSA-10. In the presence of GSA-10 (1 μ M), the EC_{50} of SAG was shifted to the left by more than 14-fold, from 0.14 μ M to 0.01 μ M (Fig. 6E), providing strong evidence for a synergistic interaction between the two Smo agonists. In the reciprocal experiment, we observed that the EC_{50} of GSA-10 in the presence of SAG (0.3 μ M) was also left-shifted by 2-fold, from 0.9 μ M to 0.4 μ M (Fig. 6F), further confirming the synergistic effect of the two molecules. Of interest, the maximal increase of AP activity obtained in the presence of GSA-10 and SAG was not additive but rather strongly potentiated in the two experiments (Fig. 6, E and F). Those data provide further evidence for a distinct mechanism of action for the two molecules. We did not detect any potentiation of GSA-10 and SAG when we analyzed the accumulation of Smo at the primary cilia in C3H10T1/2 cells, suggesting that the synergistic effect was not linked to modification of Smo translocation to the primary cilium (Fig. 4D).

GSA-10 and SAG Exhibit Distinct Pharmacology at Smo. We investigated the site of action of these molecules at Smo. Inhibition of Bodipy-cyclopamine (BC) binding to Smo has been used as an assay for the identification of Smo modulators, including both agonists and antagonists (Chen et al., 2002; Sinha and Chen, 2006). Thus, the GSA-10 potential inhibition of BC binding to human Smo (hSmo) stably expressed in HEK293 cells (HEK-hSmo) was investigated and compared with the one of SAG (Roudaut et al., 2011). As expected, SAG (3 μ M) inhibited BC binding to Smo, and GSA-10 did not, even at 30 μ M, a concentration 25-fold higher than its EC_{50} (Fig. 7A). These data indicate that GSA-10, unlike SAG, does not compete with the BC site at Smo.

We then tested whether the differentiation of C3H10T1/2 cells observed after addition of GSA-10 and SAG could be blocked by antagonizing Smo. The concentration of SAG and GSA-10 used in these experiments was near their respective EC_{50} . The potent Smo antagonist MRT-83 (Roudaut et al., 2011; Solinas et al., 2012) displayed a similar potency to block

TABLE 1

Expression level of Hh pathway genes tested by qPCR
Vehicle (DMSO), SAG (1 μ M), and GSA-10 (10 μ M) were applied on C3H10T1/2 cells for 48 hours. Fold regulation is relative to cells treated with vehicle alone.

Gene Symbol	Fold Change	
	SAG	GSA-10
<i>Boc</i>	0.9	0.9
<i>Cdo</i>	0.5	1.1
<i>Gli1</i>	58.6**	0.3*
<i>Gli2</i>	1.7	1.6
<i>Gli3</i>	0.7	1.2
<i>Ptc1</i>	5.9**	0.6
<i>Ptc2</i>	5.3**	1.8
<i>Hip</i>	48.4**	1.1
<i>Smo</i>	0.9	1
<i>Shh</i>	0.9	1.1
<i>Dhh</i>	0.9	1.1
<i>Ihh</i>	0.7	1.4

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

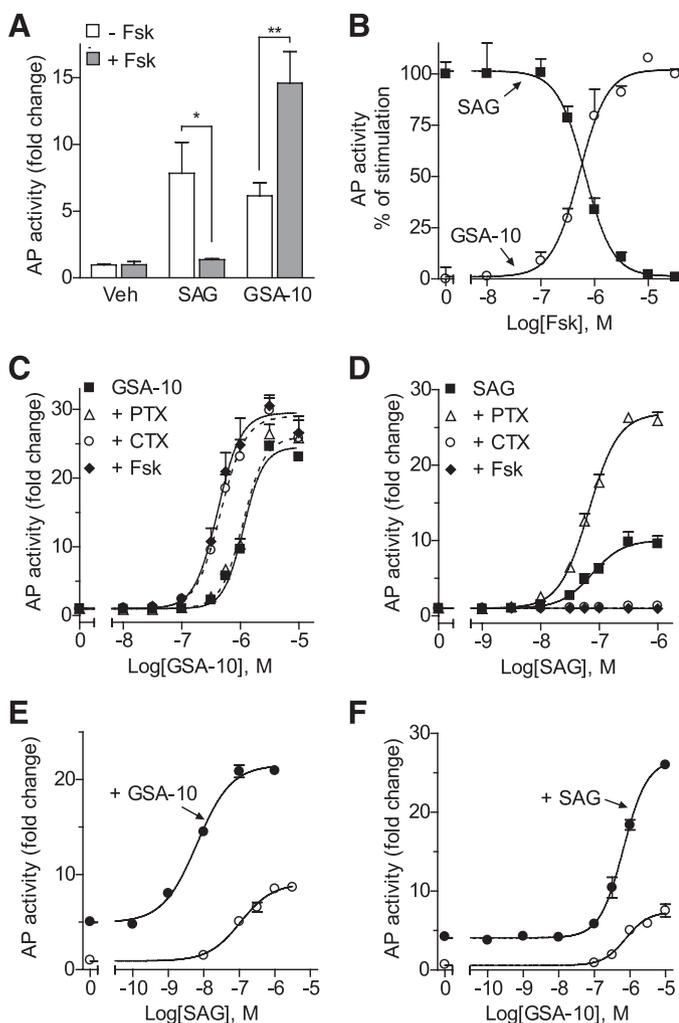


Fig. 6. GSA-10 and SAG display distinct mechanisms of action. The differentiation of C3H10T1/2 cells is expressed (A and C–F) in fold changes, compared with vehicle (Veh) or (B) in percentage of the stimulation observed in the absence or in the presence of forskolin (Fsk; 30 μ M). (A) Cells were treated with Veh, GSA-10 (1 μ M), or SAG (0.3 μ M) with or without Fsk (10 μ M). Data are mean \pm S.E.M. from four to six independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$. (B) Dose–response curve to Fsk in the presence of GSA-10 (1 μ M) or SAG (0.3 μ M). Although Fsk inhibits the activity of SAG, it potentiates the response to GSA-10. (C and D) Dose–response curve to GSA-10 or SAG with or without PTX (100 ng/ml), CTX (100 ng/ml), or Fsk (10 μ M). The cAMP modulators Fsk and CTX display opposite effects on GSA-10 or SAG. GSA-10 curves in the presence of PTX and CTX are dashed lines. (E and F) Dose–response curve to SAG in the presence of GSA-10 (1 μ M; E) or to GSA-10 in the presence of SAG (0.1 μ M; F). Potentiation and synergistic effect on AP activity are observed in both experiments.

GSA-10 (1 μ M) and SAG (0.1 μ M) response (IC_{50} , ~38 and 11 nM, respectively) (Fig. 7, B and C). MRT-83 showed a competitive antagonism at both molecules. Increasing concentrations of GSA-10 and SAG led to a progressive rightward shift in the MRT-83 inhibition curves and an approximately 3–6-fold increase in their IC_{50} (Fig. 7, B and C). The ability of MRT-83 to competitively inhibit GSA-10- and SAG-mediated AP response is consistent with a direct action of each molecule on Smo for pathway activation.

The pharmacological characterization of SAG and GSA-10 agonist sites, called here Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10} , respectively (Fig. 8), was then performed using a panel of potent Smo

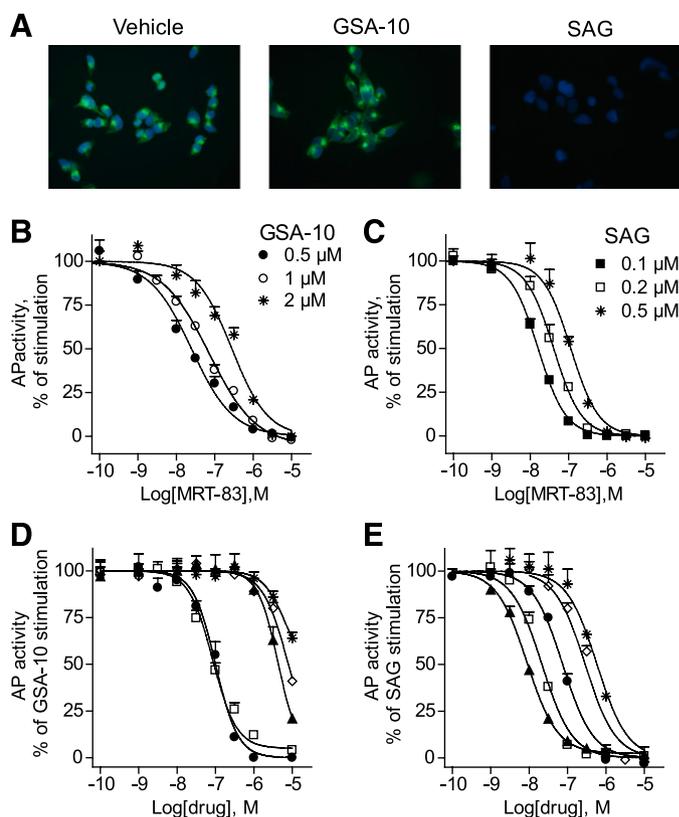


Fig. 7. Pharmacological characterization of GSA-10. (A) Bodipy-cyclopamine (BC) binding to human Smo. HEK-hSmo cells were incubated with BC (5 nM) in the presence of vehicle (DMSO), GSA-10 (30 μ M), or SAG (3 μ M). BC binding (green) and nucleus (DAPI) are visualized using fluorescence microscopy in a representative field. SAG but not GSA-10 is able to compete with BC binding (B and C) The Smo antagonist MRT-83 potently blocks GSA-10- (B) and SAG- (C) induced AP activity (expressed as percentage of stimulation). Its IC_{50} increases with higher doses of both stimulating compounds, indicating a competitive inhibition. (D and E) Inhibition curves of GSA-10- (1 μ M) and SAG- (0.1 μ M) induced differentiation of C3H10T1/2 cells by cyclopamine (star), CUR61414 (diamond), GDC-0449 (filled triangle), LDE225 (square), and M25 (filled circle). The values are expressed as a percentage of the maximal response induced by GSA-10 or SAG, respectively. Data (mean \pm S.E.M. of quadruplicates) are from a representative experiment of three.

antagonists of different structures (Supplemental Fig. 6; Fig. 7, D and E; Table 2) (Ng and Curran, 2011). LDE225, SANT-1, and M25 blocked GSA-10- and SAG-induced AP activity with similar potencies. These drugs displayed IC_{50} in the nanomolar range, indicating that they are potent antagonists at both Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10} . GDC-0449, which was with MRT-83, the most potent antagonist at Smo^{SAG} , was found as a low affinity antagonist at Smo^{GSA-10} with an IC_{50} of 3300 nM. CUR61414 and cyclopamine inhibited SAG-induced cell differentiation with IC_{50} of 330 and 620 nM, respectively. However, at 10 μ M, they blocked less than 50% of GSA-10-induced response, clearly indicating that they lost their antagonist potency. The loss of cyclopamine antagonist property is also consistent with the lack of effect of GSA-10 to compete for the BC binding site observed previously. Therefore, our data establish, for the first time to our knowledge, the existence of two pharmacologically distinct Smo agonist sites that can be discriminated by the use of various antagonists; we identify potent antagonists of Smo^{GSA-10} , such as MRT-83, and demonstrate that reference

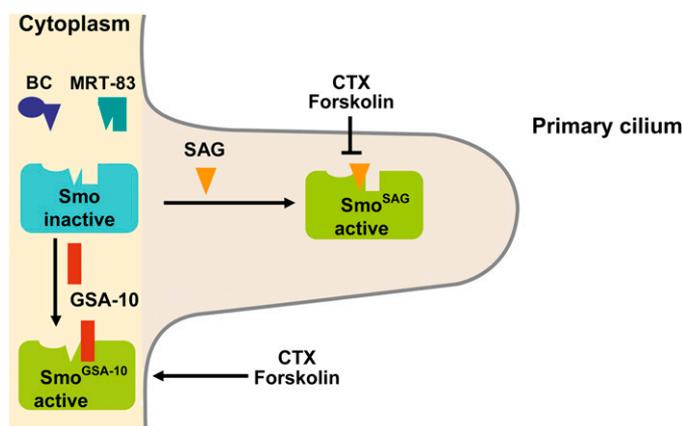


Fig. 8. A model for small molecule regulation of Smo activity. Smo is found in an inactive form in the cytoplasm of C3H10T1/2 cells. SAG stabilizes an active form in the primary cilium called Smo^{SAG}. GSA-10 stabilizes an active form of Smo in the cytoplasm called Smo^{GSA-10}. Forskolin and CTX block Smo^{SAG} response and potentiate Smo^{GSA-10} response. MRT-83 potently blocks GSA-10- and SAG-induced AP activity, whereas purmorphamine and SAG but not GSA-10 block BC binding to Smo.

Smo antagonists, such as GDC-0449 and LDE225, currently in clinical trials, or cyclopamine, display different pharmacological properties at Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}.

The distinct and even opposite effects of GSA-10 and SAG on Gli-luciferase reporter activity and on Gli1 transcript levels, respectively (Fig. 4; Supplemental Fig. 4; Table 1), suggest that GSA-10 may display antagonist properties at Smo^{SAG}. Therefore, we established in Shh-light2 cells the dose-response curve corresponding to the Gli-dependent luciferase reporter induced by SAG in the presence of GSA-10 (1 μ M). We observed a marked reduction of the maximal response (42% \pm 7%) without significant modification of its EC₅₀ (0.13 \pm 0.02 μ M versus 0.17 \pm 0.05 μ M, mean \pm S.E.M. of four independent experiments), indicating that GSA-10 behaved as a noncompetitive antagonist at this response level (Supplemental Fig. 7).

Discussion

To allow the characterization of new Smo modulators, we developed a Smo pharmacophore for agonists based on the structure of purmorphamine and SAG derivatives. We then used this pharmacophore for in silico screening of a virtual library of commercially available compounds and identified

TABLE 2

IC₅₀ of Hh inhibitors on GSA-10- and SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells

IC₅₀ and n_H (Hill coefficient) are mean \pm S.E.M. from $n \geq 3$.

Compound	Smo ^{SAG}		Smo ^{GSA-10}	
	IC ₅₀	n _H	IC ₅₀	n _H
	nM		nM	
MRT-83	11 \pm 3	1.2 \pm 0.1	38 \pm 7	1.0 \pm 0.1
SANT-1	37 \pm 8	2.2 \pm 0.3	80 \pm 20	1.3 \pm 0.2
M25	69 \pm 12	1.3 \pm 0.2	115 \pm 18	1.4 \pm 0.3
LDE225	22 \pm 3	1.4 \pm 0.1	92 \pm 12	1.2 \pm 0.1
GDC-0449	11 \pm 1	1.0 \pm 0.1	3 300 \pm 600	nd
Cyclopamine	620 \pm 30	1.3 \pm 0.1	>5000	nd
CUR61414	330 \pm 50	1.3 \pm 0.2	> 5000	nd

nd, not determined.

GSA-10, which does not display the hallmarks of a conventional Smo agonist. GSA-10 should be considered as a novel osteogenic molecule for multipotent mesenchymal cells and, therefore, may be of therapeutic interest in bone-related diseases.

Our molecular and biochemical studies provide strong evidence for the direct effect of GSA-10 at Smo. First, GSA-10, SAG, and purmorphamine share a common pharmacophore, despite some notable differences in their chemical structures. Second, GSA-10- and SAG-induced C3H10T1/2 cell differentiation were impaired in the presence of selective Smo shRNA. Third, the powerful Smo inhibitor MRT-83 blocks GSA-10- and SAG-mediated AP response in C3H10T1/2 cells in a competitive manner and with similar IC₅₀ values. Moreover, several Smo antagonists of different structures, such as LDE225, SANT-1, and M25, antagonize GSA-10 activity with IC₅₀ in the nanomolar range. Therefore, these molecules, such as MRT-83, should constitute interesting drug scaffold for further developing more potent and selective drugs acting at Smo^{GSA-10}. Our data also clearly indicate the presence of two distinct binding sites for SAG and for GSA-10 on Smo that we have named Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}, respectively (Fig. 8). GSA-10 and SAG differ in their capacity to act at the canonical BC binding site previously identified on Smo, because GSA-10 does not recognize this site and SAG and purmorphamine do. Moreover, we provide a pharmacological discrimination of GSA-10- and SAG-induced responses at Smo, as shown by the highly reduced sensitivity of GSA-10 to several Smo reference antagonists, including GDC-0449, CUR61414, and cyclopamine. Because GDC-0449 and LDE225 display different antagonist potency at Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}, it will be important to see to what extent their effects in cancer, as well as those of other Smo antagonists in clinical trials, are related to inhibition of Smo^{GSA-10} and to identify whether blockade of this binding site participates in the adverse effects of these molecules in humans (Sekulic et al., 2012; Tang et al., 2012).

Smo has been shown to adopt several conformations, both in the cytoplasm and in the cilium. Various classes of Smo modulators stabilize distinct conformations. For example, cyclopamine drives Smo from the cytoplasm into the cilium in an inactive state, whereas SAG and purmorphamine stabilize an active conformation in the cilium (Rohatgi et al., 2009; Rominger et al., 2009; Wilson et al., 2009; Yang et al., 2009; Belgacem and Borodinsky, 2011; Roudaut et al., 2011).

One simple model is that SAG and GSA-10 act to stabilize different active forms of Smo (Fig. 8) that promote, in a synergistic manner, the differentiation of multipotent mesenchymal progenitor cells into osteoblasts. The first active form, Smo^{SAG}, is addressed to the primary cilium after stimulation by SAG, leading to activation of the Hh pathway and transcription of Hh-related genes. Smo^{SAG} response is negatively regulated by forskolin and CTX, in agreement with previous reports using the evaluation of the Gli-luciferase reporter activity (Wilson et al., 2009). On the other hand, we hypothesize that GSA-10 stabilizes a yet unidentified Smo active form, called Smo^{GSA-10}, which does not translocate to the primary cilium and is strongly potentiated by forskolin and CTX. An alternative model would be that GSA-10 interacts with an unknown protein acting downstream of Ptc and upstream of Smo, to promote the cellular secretion of an, as yet, unidentified Smo ligand that would be responsible for C3H10T1/2 cell differentiation. Such ligand would have

the biologic and pharmacological properties described above for GSA-10. It should differ from the oxysterol derivatives proposed to interact with Smo and to induce its trafficking to the primary cilium (Nachtergaele et al., 2012).

Moreover, we show that GSA-10 displays no significant agonist BMP and Wnt signaling activity despite the structural resemblance of Smo with the Frizzled receptors (Schulte, 2010).

To our knowledge, GSA-10 is the first small-molecule Smo agonist that does not promote Smo translocation to the primary cilium. This feature questions the proposed theory according to which Smo localization to the cilium is necessary (but not sufficient) for activation of the Hh pathway (Wilson et al., 2009). In agreement with this questioning, the Shh-mediated chemotactic response that requires neither de novo gene transcription nor Gli protein functions was found to be mediated by Smo located outside the primary cilium (Chinchilla et al., 2010; Bijlsma et al., 2012).

We speculate that the potentiation of GSA-10-mediated AP response by forskolin and CTX reflects a direct effect on adenylyl cyclase and, thus, PKA stimulation. In *Drosophila*, PKA-mediated Smo phosphorylation at multiple serine/threonine residues in the Smo carboxyl-terminal cytoplasmic tail is proposed to antagonize arginine clusters responsible for Smo inactivation. Such a conformational switch is responsible for Smo cell surface accumulation and activation (Zhao et al., 2007). Because arginine clusters but not the PKA sites are conserved in vertebrates and are critical for maintenance of Smo in an inhibited state, further investigation is required to clarify the mechanism of action of forskolin and CTX at vertebrate Smo and, in particular, their opposite effects on Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10} conformations.

During development, forskolin has been shown to inhibit Hh signaling in brain, feather bud, tooth, and testis (Fan et al., 1995; Hynes et al., 1995; Cobourne et al., 2001; Yao and Capel, 2002). This is consistent with the negative effect of forskolin and CTX on the differentiation of C3H10T1/2 cells by SAG (present data) and on activation of the Hh reporter (Fan et al., 1995; Epstein et al., 1996; Hammerschmidt et al., 1996; Pan et al., 2009). On the other hand, a positive role for cAMP and PKA in Smo regulation has been observed both in *Drosophila* and in mammals (Jia et al., 2004; Zhao et al., 2007; Milenkovic et al., 2009; Wilson et al., 2009). Both forskolin and PKA treatments induced extra digits in vertebrate limbs, suggesting that they display a positive role in Hh signaling (Tiecke et al., 2007). If Smo^{GSA-10} may be physiologically relevant, nevertheless, an endogenous Hh-stabilized Smo^{GSA-10} form mediating such response yet remains to be demonstrated.

In vitro studies in insect or mammalian cells have previously indicated that Smo specifically stimulates GTP binding to G α i family members (Riobo et al., 2006) and can also interact with G α ₁₅ protein (Masdeu et al., 2006). The absence of PTX effect on the GSA-10-induced response suggests that Gi/o proteins are not implicated in this response. Whether Smo^{GSA-10} interacts with other G-proteins and β -arrestin at the cell membrane merits further work.

Investigation of the effect of GSA-10 on GCPs does not result in an increase of cell proliferation, as observed with SAG, suggesting either that GSA-10 is not able to stabilize a Smo-active form in these cells or that such active form is not linked to GCP proliferation. Consequently, GSA-10 mechanism of action differs from that of selected glucocorticoids

proposed to bind Smo, to activate Gli, and to promote mouse GCP proliferation (Wang et al., 2010). Numerous other physiologic roles are associated with Hh signaling and, potentially, with Smo modulation in the developing or adult brain. These ones include proliferative and survival activities toward neural stem cells, axonal chemoattraction implicated in guidance of commissural axons (Charron and Tessier-Lavigne, 2005), retention activity for adult neural precursors (Angot et al., 2008), or control of oligodendroglial precursors with potential therapeutic interest in demyelinating diseases (Traiffort et al., 2010; Ferent et al., 2013). In addition, Hh also mediates pathfinding of commissural axons through a non-canonical pathway involving Smo but not related to gene transcription (Yam et al., 2009). Finally, a Smo-dependent noncanonical pathway involving Camkk2/Ampk and recognizing the classic Hh antagonist cyclopamine as a potent selective partial agonist, was reported to induce acute glucose uptake in vitro and in vivo (Teperino et al., 2012). Of interest, we found that GSA-10 serves also as an antagonist to SAG-induced Gli-dependent luciferase, further showing the level of complexity of several drugs acting at Smo with important mechanistic and, potentially, therapeutic significance.

Together with the recent report showing activation of the noncanonical Smo-Ampk axis by both SAG and cyclopamine (Teperino et al., 2012), the present work adds a new level of complexity by which a cell can establish downstream signaling diversity and, consequently, cell type specificity. As a whole, our findings demonstrate a significant variability in Smo conformations induced by different ligands that has clearly important implications for the development of novel and more selective therapeutic agents.

Acknowledgments

The authors thank Gisèle Froment, Didier Nègre, and Caroline Costa from the lentivectors production facility/SFR BioSciences Gerland-Lyon Sud (UMS3444/US) and Plateforme de qPCR, IMAGIF, Gif/Yvette, France.

Authorship Contributions

Participated in research design: Gorojankina, Faure, Hoch, Roudaut, Mann, Manetti, Taddei, Ruat.

Conducted experiments: Gorojankina, Faure, Hoch, Roudaut.

Contributed new reagents or analytic tools: Girard, Manetti, Schoenfelder, Solinas, Petricci.

Performed data analysis: Gorojankina, Faure, Hoch, Roudaut, Traiffort, Schoenfelder, Girard, Mann, Manetti, Solinas, Petricci, Taddei, Ruat.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Ruat.

References

- Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M, and Traiffort E (2008) Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* **26**:2311–2320.
- Belgacem YH and Borodinsky LN (2011) Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 4482–4487.
- Bennett CN, Ross SE, Longo KA, Bajnok L, Hemati N, Johnson KW, Harrison SD, and MacDougald OA (2002) Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* **277**:30998–31004.
- Bidet M, Joubert O, Lacombe B, Cianciar M, Nehmé R, Mollat P, Brétillon L, Faure H, Bittman R, and Ruat M et al. (2011) The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS ONE* **6**:e23834.
- Bijlsma MF, Damhofer H, and Roelink H (2012) Hedgehog-stimulated chemotaxis is mediated by smoothened located outside the primary cilium. *Sci Signal* **5**:ra60.
- Brunton SA, Stibbard JH, Rubin LL, Guicherit OM, Kruse LI, Price S, di Lucrezia R, MacKinnon CH, Avery A, and Park Y et al. (2009) Potent agonists of the Hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem Lett* **19**:4308–4311.

- Charron F and Tessier-Lavigne M (2005) Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* **132**: 2251–2262.
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, and Beachy PA (2002) Small molecule modulation of Smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14071–14076.
- Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, and Riobo NA (2010) Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* **9**:570–579.
- Cobourne MT, Hardcastle Z, and Sharpe PT (2001) Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res* **80**: 1974–1979.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, and Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**:1018–1021.
- Corcoran RB and Scott MP (2006) Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:8408–8413.
- Dahmane N and Ruiz i Altaba A (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**:3089–3100.
- Danjo T, Eiraku M, Muguruma K, Watanabe K, Kawada M, Yanagawa Y, Rubenstein JL, and Sasai Y (2011) Subregional specification of embryonic stem cell-derived ventral telencephalic tissues by timed and combinatory treatment with extrinsic signals. *J Neurosci* **31**:1919–1933.
- Dessolle G, Branca D, Ferrigno F, Kinzel O, Muraglia E, Palumbi MC, Rowley M, Serafini S, Steinkühler C, and Jones P (2009) Discovery of N-[(1-aryl-1H-indazol-5-yl)methyl]amides derivatives as smoothed antagonists for inhibition of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett* **19**:4191–4195.
- Epstein DJ, Marti E, Scott MP, and McMahon AP (1996) Antagonizing cAMP-dependent protein kinase A in the dorsal CNS activates a conserved Sonic hedgehog signaling pathway. *Development* **122**:2885–2894.
- Fan CM, Porter JA, Chiang C, Chang DT, Beachy PA, and Tessier-Lavigne M (1995) Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* **81**:457–465.
- Ferent J, Zimmer C, Durbec P, Ruat M, and Traiffort E (2013) Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination. *J Neurosci* **33**:1759–1772.
- Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, and Shulok J et al. (2002) Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol* **1**:10.
- Goetz SC and Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**:331–344.
- Hammerschmidt M, Bitgood MJ, and McMahon AP (1996) Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev* **10**:647–658.
- Heine VM, Griveau A, Chapin C, Ballard PL, Chen JK, and Rowitch DH (2011) A small-molecule smoothed agonist prevents glucocorticoid-induced neonatal cerebellar injury. *Sci Transl Med* **3**:105ra104.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L, and Giannis A (2010) Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem* **18**:6613–6624.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA, and Rosenthal A (1995) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* **15**:35–44.
- Jackson A, Vayssières B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, and Rawadi G (2005) Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. *Bone* **36**: 585–598.
- Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, and Jiang J (2004) Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* **432**:1045–1050.
- Jönsson S, Andersson G, Fex T, Fristedt T, Hedlund G, Jansson K, Abramo L, Fritzon I, Pekarski O, and Runström A et al. (2004) Synthesis and biological evaluation of new 1,2-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-3-quinolinecarboxamides for treatment of autoimmune disorders: structure-activity relationship. *J Med Chem* **47**: 2075–2088.
- Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, Luo X, Chen J, Bi Y, He BC, and Park JK et al. (2009) A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* **18**:545–559.
- Low JA and de Sauvage FJ (2010) Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol* **28**:5321–5326.
- Manetti F, Faure H, Roudaut H, Gorojankina T, Traiffort E, Schoenfelder A, Mann A, Solinas A, Taddei M, and Ruat M (2010) Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothed antagonists. *Mol Pharmacol* **78**:658–665.
- Masdeu C, Faure H, Coulombe J, Schoenfelder A, Mann A, Brabet I, Pin JP, Traiffort E, and Ruat M (2006) Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothed to G15. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:471–479.
- Milenkovic L, Scott MP, and Rohatgi R (2009) Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* **187**:365–374.
- Nachtergaele S, Mydock LK, Krishnan K, Rammohan J, Schlesinger PH, Covey DF, and Rohatgi R (2012) Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat Chem Biol* **8**:211–220.
- Ng JM and Curran T (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer* **11**:493–501.
- Pan Y, Wang C, and Wang B (2009) Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol* **326**:177–189.
- Riobo NA, Saucy B, Dilizio C, and Manning DR (2006) Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:12607–12612.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, and Scott MP (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:3196–3201.
- Rohatgi R, Milenkovic L, and Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**:372–376.
- Rominger CM, Bee WL, Copeland RA, Davenport EA, Gilmartin A, Gontarek R, Hornberger KR, Kallal LA, Lai Z, and Lawrie K et al. (2009) Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothed receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:995–1005.
- Roudaut H, Traiffort E, Gorojankina T, Vincent L, Faure H, Schoenfelder A, Mann A, Manetti F, Solinas A, and Taddei M et al. (2011) Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent Smoothed antagonist. *Mol Pharmacol* **79**:453–460.
- Ruat M, Roudaut H, Ferent J, and Traiffort E (2012) Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation* **83**:S97–S104.
- Ruiz i Altaba A (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**:3205–3216.
- Schulte G (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* **62**:632–667.
- Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, and Friedlander PA et al. (2012) Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **366**:2171–2179.
- Sinha S and Chen JK (2006) Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat Chem Biol* **2**:29–30.
- Solinas A, Faure H, Roudaut H, Traiffort E, Schoenfelder A, Mann A, Manetti F, Taddei M, and Ruat M (2012) Acylthiourea, acylurea, and acylguanidine derivatives with potent hedgehog inhibiting activity. *J Med Chem* **55**:1559–1571.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, and Beachy PA (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**:1005–1009.
- Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K, Coppola C, Chanana AM, Marji J, and Bickers DR et al. (2012) Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med* **366**:2180–2188.
- Teperino R, Amann S, Bayer M, McGee SL, Loipetzberger A, Connor T, Jaeger C, Kammerer B, Winter L, and Wiche G et al. (2012) Hedgehog partial agonism drives Warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell* **151**:414–426.
- Tiecke E, Turner R, Sanz-Ezquerro JJ, Warner A, and Tickle C (2007) Manipulations of PKA in chick limb development reveal roles in digit patterning including a positive role in Sonic Hedgehog signaling. *Dev Biol* **305**:312–324.
- Traiffort E, Angot E, and Ruat M (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* **113**:576–590.
- Wang B, Fallon JF, and Beachy PA (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* **100**:423–434.
- Wang J, Lu J, Bond MC, Chen M, Ren XR, Lyerly HK, Barak LS, and Chen W (2010) Identification of select glucocorticoids as Smoothed agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:9323–9328.
- Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, and McMahon AP (2009) Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:2623–2628.
- Wilson CW, Chen MH, and Chuang PT (2009) Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS ONE* **4**:e5182.
- Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, and Schultz PG (2002) A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J Am Chem Soc* **124**:14520–14521.
- Yam PT, Langlois SD, Morin S, and Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**:349–362.
- Yang H, Xiang J, Wang N, Zhao Y, Hyman J, Li S, Jiang J, Chen JK, Yang Z, and Lin S (2009) Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *J Biol Chem* **284**:20876–20884.
- Yao HH and Capel B (2002) Disruption of testis cords by cyclopamine or forskolin reveals independent cellular pathways in testis organogenesis. *Dev Biol* **246**: 356–365.
- Zhao Y, Tong C, and Jiang J (2007) Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**:252–258.

Address correspondence to: Martial Ruat, CNRS, UPR-3294, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2118, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology team, 1 avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France. E-mail: ruat@inaf.cnrs-gif.fr

Discovery, Molecular and Pharmacological Characterization of GSA-10, a Novel Small Molecule Positive Modulator of Smoothed

**Tatiana Gorojankina, Lucile Hoch, Hélène Faure, Hermine Roudaut, Elisabeth
Traiffort, Angèle Schoenfelder, Nicolas Girard, André Mann, Fabrizio Manetti, Antonio
Solinas, Elena Petricci, Maurizio Taddei and Martial Ruat**

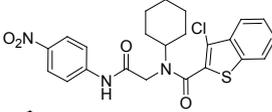
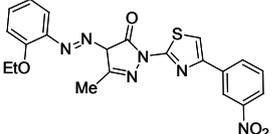
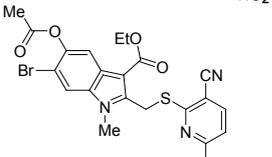
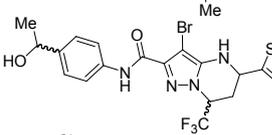
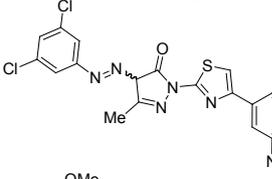
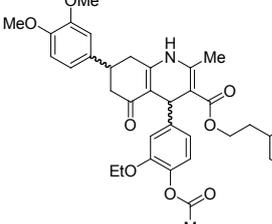
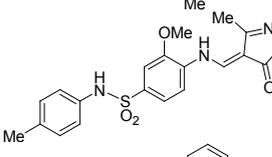
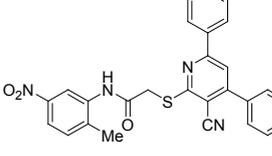
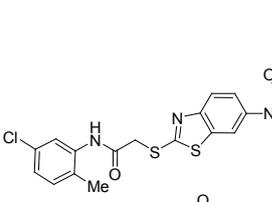
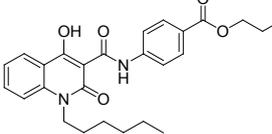
MOLECULAR PHARMACOLOGY

SUPPLEMENTAL DATA

Table of Content:

Supplemental Table 1.....	S2
Supplemental Table 2.....	S4
Supplemental Figure 1.....	S5
Supplemental Figure 2.....	S6
Supplemental Figure 3.....	S7
Supplemental Figure 4.....	S8
Supplemental Figure 5.....	S9
Supplemental Figure 6.....	S10
Supplemental Figure 7.....	S11

Supplemental Table 1: Comparison of the stimulatory activity of the compounds issued from the initial screen on the differentiation of C3H10T1/2 cells.

Compound	Structure	AP activity at 10 μ M, fold basal
1		0.9 \pm 0.1
2		1.0 \pm 0.1
3		0.8 \pm 0.1
4		0.8 \pm 0.1
5		1.2 \pm 0.2
6		1.0 \pm 0.1
7		1.0 \pm 0.2
8		1.1 \pm 0.1
9		0.8 \pm 0.1
10, (GSA-10)		17 \pm 2

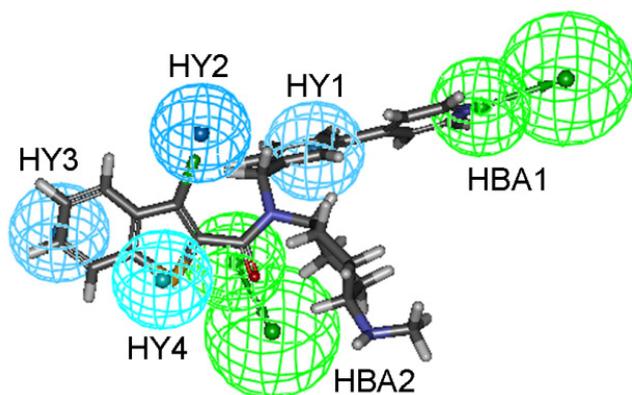
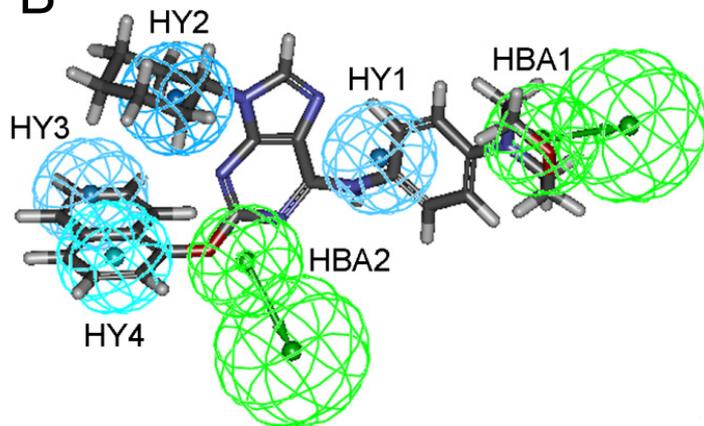
11		1.0 ± 0.1
12		1.0 ± 0.1
13		1.0 ± 0.1
14		0.9 ± 0.1
15		0.9 ± 0.1
16		0.9 ± 0.1
17		0.9 ± 0.1
18		0.9 ± 0.2
19		1.0 ± 0.1
20		1.0 ± 0.1
SAG*		9 ± 2

Values are mean ± SEM of at least 3 independent experiments expressed relative to vehicle.

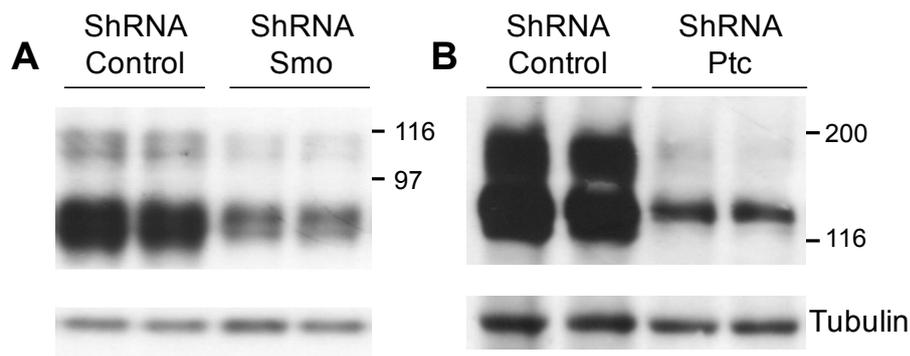
* at 0.1 μM. AP, alkaline phosphatase

Supplemental Table 2: Applied Biosystem references for qPCR primers used in this study.

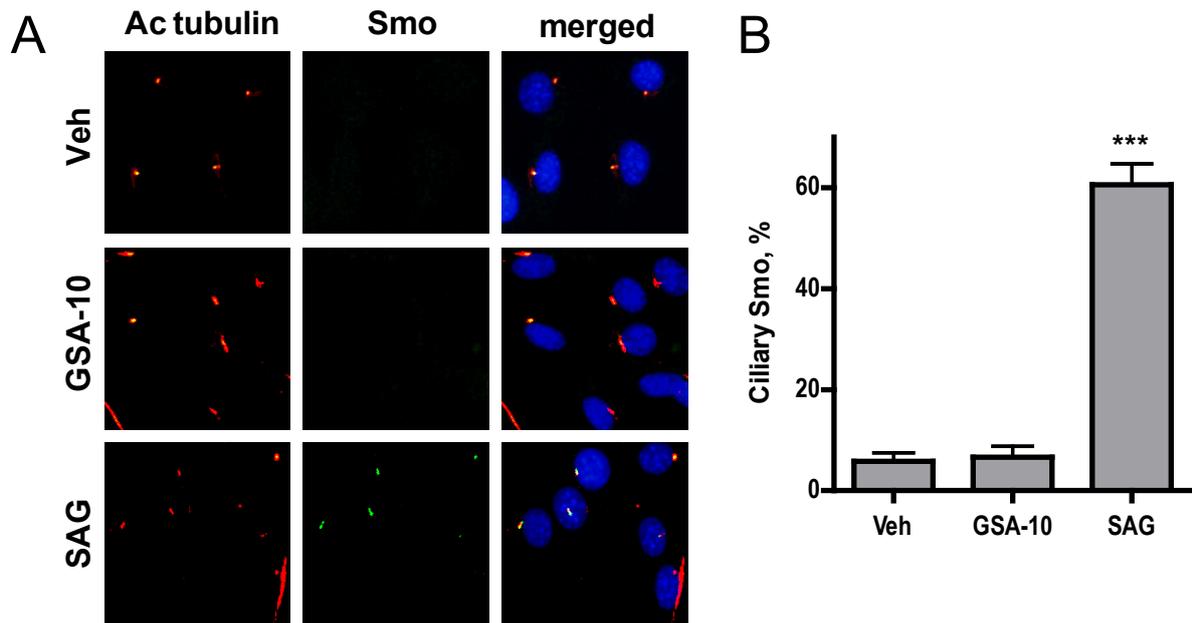
Gene symbol	Primer Reference
<i>Boc</i>	Mm00552900_m1
<i>Cdo</i>	Mm00491190_m1
<i>Gli1</i>	Mm00494645_m1
<i>Gli2</i>	Mm01293117_m1
<i>Gli3</i>	Mm00492333_m1
<i>Ptc1</i>	Mm00436026_m1
<i>Ptc2</i>	Mm00436047_m1
<i>Hip</i>	Mm00469572_m1
<i>Smo</i>	Mm01162710_m1
<i>Shh</i>	Mm00436528_m1
<i>Dhh</i>	Mm01310203_m1
<i>Ihh</i>	Mm00439613_m1

A**B**

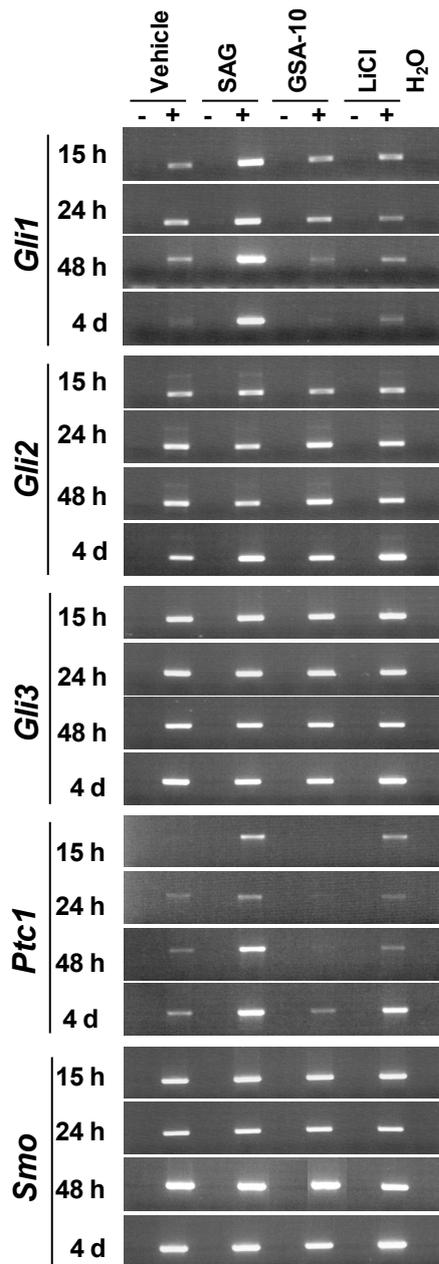
Supplemental Figure 1. Proposed pharmacophoric model for Smo agonists. Graphical representation of SAG (A) and purmorphamine (B) fitted to the proposed pharmacophoric model for Smo agonists. Pharmacophoric features are color coded: hydrogen bond acceptor groups (HBA1 and HBA2) in green; hydrophobic regions for aromatic rings (HY1 and HY3) in light blue; aliphatic or halogen hydrophobic groups (HY2) in dark blue; generic hydrophobic (HY4) in cyan. Each of the HBA features is constituted by two green spheres: the smaller is filled by the hydrogen bond acceptor atom of the agonist, while the largest sphere is located at the end of a vector and represents the region where the corresponding hydrogen bond donor group of the receptor counterpart should be located. The atoms are color coded: black: carbon, grey: hydrogen, red: oxygen, blue: nitrogen, yellow: sulfur, and green: chlorine.



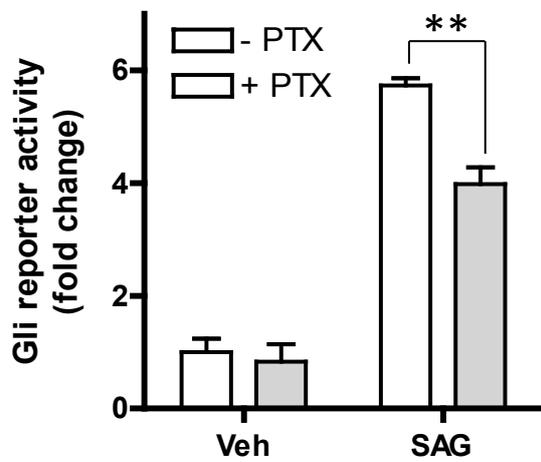
Supplemental Figure 2. Smo and Ptc shRNA activity in HEK293 transfected cells. HEK293 cells were co-transfected with pRK5-SP-myc-Smo or prK5-Ptc and the corresponding shRNA pLKO-vectors (shRNA Smo or shRNA Ptc) or the control shRNA. Efficiency of inhibition was estimated by Western blotting using C-myc antibody 9E10 for Smo (A) or specific Ab130 for Ptc (B) (See M&M for details). The position of the molecular mass markers is shown on the right (kDa).



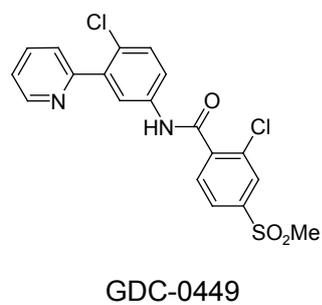
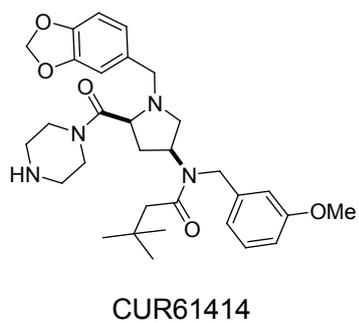
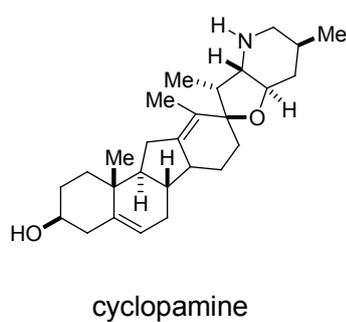
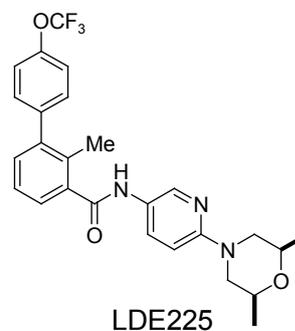
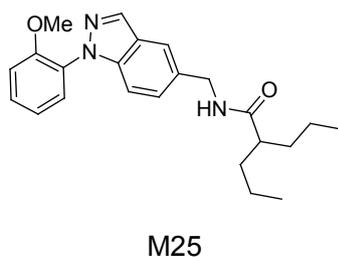
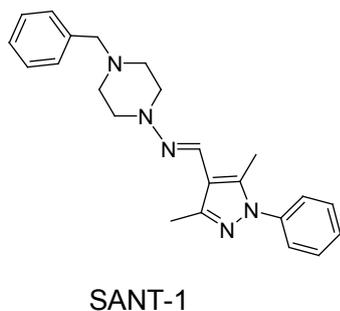
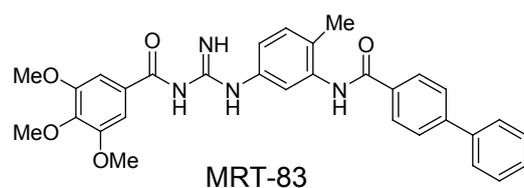
Supplemental Figure 3. GSA-10 does not translocate Smo to the primary cilium in NIH3T3 cells. (A) Representative immunofluorescent images of NIH3T3 cells treated overnight with vehicle (Veh), GSA-10 (10 μ M) or SAG (1 μ M) were stained with antibodies against endogenous Smo (green), acetylated (Ac) tubulin (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). (B) The percentage of Smo-positive cilia was calculated for each drug in three independent fields. Mean \pm SEM of three independent experiments is presented. GSA-10 does not induce Smo trafficking to cilia. *** $p \leq 0.001$ compared to Veh.



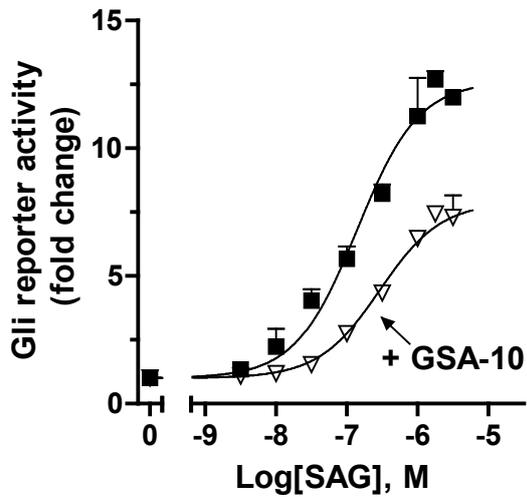
Supplemental Figure 4: Shh pathway genes expression evaluated by semi-quantitative RT-PCR. C3H10T1/2 cells were treated with vehicle (DMSO), GSA-10 (10 μ M), SAG (1 μ M), LiCl (20 mM) or GSA-10 + SAG for 15 h, 24 h, 48 h or 4 days. Total RNAs were prepared, reverse-transcribed (+) or not (-) and tested for expression of the indicated genes by PCR using specific primers. Water (H₂O) was used as a control. PCR products of the expected size were identified on agarose gel and photographed under UV light.



Supplemental Figure 5: Pertussis toxin (PTX) inhibits Hh pathway activation in Shh-light2 cells. Cells were treated with vehicle (Veh), SAG (0.3 μ M) and with or without PTX (100 ng/ml). Luciferase activities were measured 48h later. The values are expressed as fold change compared to Veh treated cells and are means \pm SEM from three independent experiments. ** $p < 0.01$.



Supplemental Figure 6: Structures of Smoothed antagonists used in the pharmacological study.



Supplemental Figure 7: Effect of GSA-10 on SAG-induced Gli-luciferase reporter activity.

A dose response curve to SAG was constructed in Shh-light2 cells in the presence of 1 μ M GSA-10 or the corresponding vehicle. Data are plotted as fold change compared to vehicle treated cells and are mean \pm SD of triplicates from a representative experiment out of four. The maximum of inhibition was significantly reduced by $42 \pm 7\%$, $p < 0.03$. The EC_{50} of SAG in the presence of GSA-10 ($0.17 \pm 0.05 \mu\text{M}$) or of the vehicle ($0.13 \pm 0.02 \mu\text{M}$) was not significantly modified ($p = 0.9$; mean \pm SEM; $n = 4$ independent experiments).

DISCUSSION

DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a conduit à l'identification de nouveaux puissants antagonistes de Smo, dont le MRT-92. Le développement de sa forme tritiée a permis la mise en évidence d'un nouveau site de liaison au niveau du domaine TM de Smo et offre de nouvelles perspectives pour son étude pharmacologique. Ces travaux de thèse ont également mené à la découverte d'un nouvel agoniste de ce récepteur, le GSA-10, agissant sur une voie non canonique. Ainsi, je discuterai dans les prochains paragraphes : 1) l'intérêt des techniques de cristallisation et de modélisation moléculaire pour l'identification de nouveaux ligands de Smo ; 2) l'apport du [³H]MRT-92 comme outil pharmacologique utile à la compréhension des interactions des composés avec le domaine TM de Smo et au développement de nouveaux modulateurs ; 3) l'intérêt thérapeutique potentiel du composé GSA-10.

I. Identification d'un nouveau composé antagoniste, le MRT-92

1. Intérêt des techniques de cristallisation et de modélisation moléculaire pour la recherche de nouveaux ligands de Smo.

Le génome humain comprend environ 800 RCPG qui forment la plus vaste famille de récepteurs membranaires. Depuis la cristallisation de la rhodopsine (Palczewski *et al.*, 2000), seulement 28 autres membres de la famille des RCPG ont pu être cristallisés ; pour revue, (Milic and Veprintsev, 2015). En effet, la cristallisation par rayons X des RCPG est rendue difficile par leur nature très flexible et leur instabilité une fois extraits des membranes lipidiques à l'aide de détergents. L'obtention des structures tridimensionnelles des différents RCPG a nécessité l'amélioration des conditions de cristallisation. Plusieurs approches comme

la liaison du ligand, la fusion de protéines, l'hydrolyse des parties N- et C- terminales, l'utilisation de nanobodies (anticorps de camélidés) ou la mutation de sites de glycolysation ont été utilisées pour stabiliser les RCPG (**Figure 23**). Différentes méthodes ont également été développées pour exprimer les RCPG dans des bicelles ou en phases lipidiques (Ghosh *et al.*, 2015).

Jusqu'à très récemment, la structure tridimensionnelle du récepteur Smo n'était pas connue. Sa cristallisation a nécessité l'hydrolyse d'une partie de l'ECD et du domaine C-terminal ainsi que la fusion d'une protéine BRIL au domaine N-terminal pour stabiliser le récepteur, et a été réalisée en phase lipidique cubique (Wang *et al.*, 2013). Les cristallisations du récepteur hSmo complexé au composé LY2940680 et SANT-1 ont permis de mettre en évidence deux sites de liaison différents au niveau du domaine TM de Smo. Cette découverte devrait faciliter la recherche de nouveaux ligands par modélisation moléculaire et homologie des sites de liaison identifiés et par criblage virtuel de banques de composés.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons modélisé l'amarrage d'un composé antagoniste préalablement développé au laboratoire, le MRT-83, aux deux structures cristallographiques de Smo complexé avec le LY2940680 ou le SANT-1. L'originalité de cette approche nous a permis d'identifier le site de liaison présumé du composé MRT-83 délimité par les acides aminés des sites 1 et 2, préalablement mis en évidence. L'optimisation de cette poche de liaison par une étude de structure-activité nous a permis d'identifier le MRT-92, le plus puissant antagoniste de Smo connu à ce jour, dont la structure se superpose aux sites 1 et 2. La découverte du site de liaison 3 du MRT-92 est supportée par : i) l'inhibition de la liaison de la BC (un antagoniste de type 1) à Smo ; ii) la capacité des antagonistes de type 1 et 2 à inhiber la liaison du [³H]MRT-92 à Smo ; iii) l'observation que

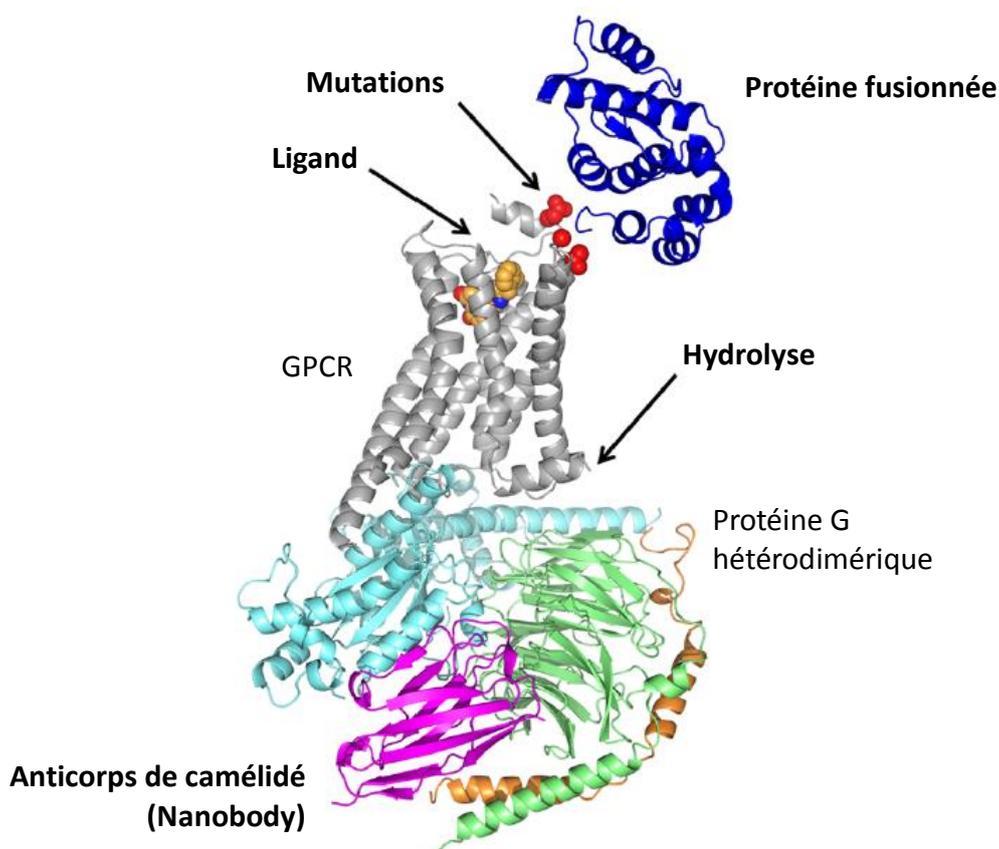


Figure 23 : Structure cristallographique du récepteur adrénergique $\beta 2$ complexé à une protéine Gs (PDB ID 3SN6) illustrant les différentes stratégies disponibles pour l'étude structurale des RCPG.

Le récepteur adrénergique $\beta 2$ (gris) a été fusionné à la protéine T4L (bleu foncé) au niveau de son domaine N-terminal et complexé à une molécule agoniste (orange). Le complexe avec la protéine Gs hétérodimérique (sous-unité α , bleu clair ; sous-unité β , vert ; sous-unité γ , orange) a été mimé par l'ajout d'un anticorps de camélidé (nanobody, violet). Trois mutations ont été introduites afin d'éliminer un site de glycosylation (mutation N187E) et d'augmenter le niveau d'expression du récepteur chimère T4L- $\beta 2$ (mutations M96T et M98T). Enfin, le domaine C-terminal a été hydrolysé, d'après (Milic *et al.*, Front Pharmacol, 2015).

des mutations spécifiques affectant le site 1 ou le site 2 réduisent de façon significative la liaison du [³H]MRT-92 à Smo ; iv) l'inhibition compétitive de la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 induite par le SAG.

2. Intérêt thérapeutique du composé MRT-92

Le MRT-92 bloque la prolifération des GCP de cervelet de raton ainsi que la prolifération de cultures primaires de MB suggérant un fort intérêt thérapeutique de cette molécule pour le traitement de MB associés à la voie de signalisation Hh. Des antagonistes du récepteur Smo sont actuellement en phase clinique pour le traitement des tumeurs liées à la voie Hh (Ruat and Hoch, 2015). Cependant plusieurs essais avec les composés TAK-441 et l'IPI-926 ont été interrompus, et d'autres comme le traitement par le GDC-0449 de métastases de carcinomes colorectaux ou de cancers ovariens ont des résultats négatifs (Lin and Matsui, 2012 ; McMillan and Matsui, 2012 ; Hadden, 2013). Afin de mieux comprendre ces échecs, il faudra comprendre si l'efficacité clinique des antagonistes de Smo est liée à leur mode de liaison et de vérifier si un antagoniste de type 3, comme le MRT-92, peut présenter certains avantages de liaison vis-à-vis des antagonistes de type 1 ou 2. Mon travail a aussi mis en évidence des analogues du MRT-92 tels que le MRT-95, une acylthiourée, qui présente une affinité nanomolaire pour Smo.

Nos travaux démontrent l'existence dans la cellule de nouvelles conformations du récepteur Smo (Smo^{GSA-10}) résistantes à certains antagonistes tels que le MRT-92, la Cyclopamine ou le GDC-0449. Il sera donc très important de déterminer la présence de ces différentes formes de Smo dans les cellules tumorales ou dans leur microenvironnement. À ce jour, il n'existe pas d'outils disponibles pour marquer ces différentes formes de Smo. Nous ne

connaissons pas d'antagoniste spécifique de la forme Smo^{GSA-10}. Il conviendra d'identifier des antagonistes puissants et sélectifs de ces formes conformationnelles afin d'obtenir des composés fluorescents ou tritiés qui seront ensuite caractérisés comme ligands et radioligands spécifiques des formes Smo^{GSA10} et Smo^{SAG}. Il sera également important de déterminer si les effets indésirables des composés en phase clinique tels que la perte de cheveux, les spasmes musculaires, la fatigue, la perte de poids et d'appétit, sont associés à l'inhibition d'une conformation spécifique de Smo. Ces hypothèses renforcent l'idée de comprendre l'implication des différentes formes de Smo dans les cancers et de développer des inhibiteurs spécifiques de ces formes.

II. [³H]MRT-92, un nouvel outil pharmacologique puissant

Le [³H]MRT-92 constitue un outil de choix pour étudier les interactions des composés avec le domaine TM de Smo. Le [³H]MRT-92 présente les caractéristiques d'un radioligand de très haute affinité ($K_d = 0.3$ nM). De plus, le pourcentage de liaison non spécifique aux membranes et de contamination sur le filtre est très faible, ce qui favorise son utilisation.

1. Étude des mutations résistantes du récepteur Smo

La mutation du résidu aspartate 473 en histidine dans le 6^e domaine TM de Smo entraîne une résistance au traitement par le GDC-0449 (Yauch *et al.*, 2009). Mes travaux démontrent que le MRT-92 est capable de se lier au récepteur muté SmoD473H, ce qui suggère un intérêt thérapeutique du MRT-92 dans le traitement de cette résistance. De plus, le [³H]MRT-92 représente un outil puissant pour étudier la pharmacologie des antagonistes de référence sur le récepteur SmoD473H, en comparaison aux composés [³H]Cyclopamine et

[³H]GDC-0449 qui ne lie pas ce récepteur muté. Ces données renforcent les résultats précédemment obtenus à partir des expériences de cristallographie suggérant un rôle important de l'acide aminé D473, en liaison avec les acides aminés R400 et E518, pour l'interaction des antagonistes de type 1 (GDC-0449, Cyclopamine) avec Smo, mais qui était moins apprécié pour le composé LY2940680 (Wang *et al.*, 2013).

De nouvelles mutations du récepteur Smo ont été identifiées lors de traitement de BCC par le composé GDC-0449 (Atwood *et al.*, 2015 ; Sharpe *et al.*, 2015). Ces mutations sont multiples et peuvent se distinguer en deux classes : les mutations se situant dans le site de liaison du GDC-0449 à Smo ou très proches (H231R, W281C, I408V, C469Y, Q477E), comme la mutation D473H ; ou les mutations se situant hors du site de liaison du GDC-0449 (T241M, V321M, L412F, A459V, F460L, S533N, Q635E) mais affectant la structure tridimensionnelle des sept domaines TM de Smo et limitant l'effet de l'antagoniste GDC-0449. Les premiers résultats concernant cette deuxième classe de mutations suggèrent qu'elles entraîneraient une activation constitutive du récepteur Smo, comme la mutation préalablement identifiée W535L (mutation M2). Par des techniques de mutagenèse et des expériences de radioligand du [³H]MRT-92 aux récepteurs Smo mutés, nous pourrions identifier si le MRT-92 est capable de se lier aux mutations H231R, W281C, I408V, C469Y et Q477E décrites dans ces études (**Figure 24**).

2. Identification de nouveaux modulateurs du récepteur Smo

À l'aide du radioligand [³H]MRT-92, nous avons démontré que l'itraconazole, une molécule actuellement mise sur le marché en tant qu'agent antifongique, et identifiée comme un nouvel inhibiteur de la voie Hh (Kim *et al.*, 2010), est un puissant ligand de Smo avec une

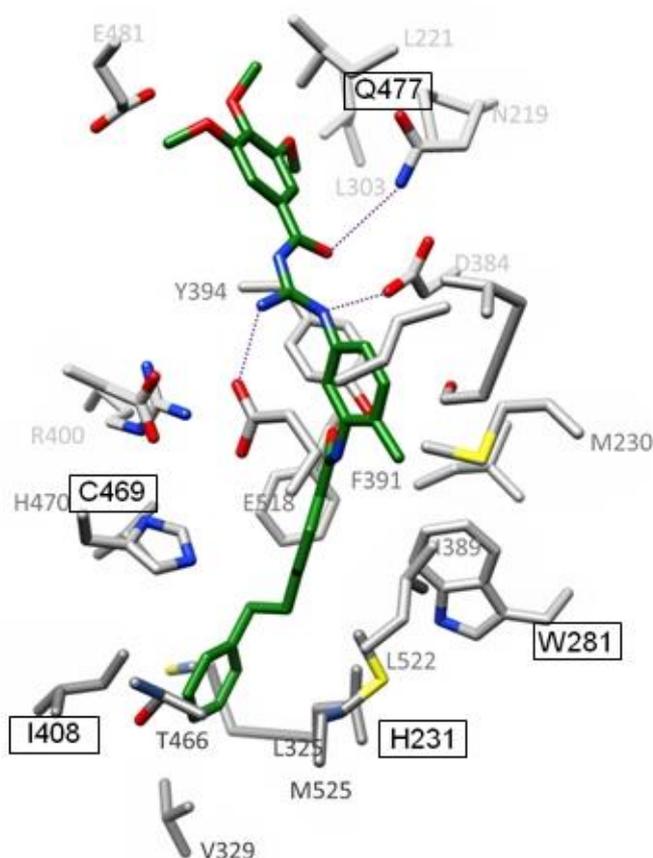


Figure 24 : Site de liaison du MRT-92 sur le récepteur Smoothened.

Modélisation moléculaire du site de liaison du MRT-92 sur la structure cristallographique du récepteur Smo complexé au SANT-1 (PDB 4N4W). Le MRT-92 et les chaînes latérales des acides aminés de Smo impliqués dans la fixation du MRT-92 sont représentés avec le code couleur suivant : carbone- vert (MRT-92) et gris (Smo), azote- bleu, oxygène- rouge et soufre- jaune. Les chaînes latérales de Smo sont colorées. Les acides aminés impliqués dans les résistances au traitement au GDC-0449 sont identifiés et encadrés en noir, adapté de (Hoch *et al.*, Faseb J., 2015).

affinité de l'ordre du nanomolaire. Il sera intéressant de caractériser le site de liaison de l'itraconazole à Smo et de démontrer s'il entre en compétition avec le site du MRT-92 par des expériences de radioliasion. Par modélisation moléculaire et par des études de mutagenèse, il sera également possible d'identifier si l'itraconazole appartient aux antagonistes de type 1, 2 ou 3 de Smo. Il peut également être envisagé que le site de liaison de l'itraconazole se situe au niveau de l'ECD de Smo ou à l'interface des domaines TM du dimère de Smo où une poche de liaison potentielle pour des petites molécules a été identifiée par modélisation moléculaire (Ruat *et al.*, 2014 ; Rognan and Mus-Veteau, 2015). Le [³H]MRT-92 est un outil puissant pour la recherche de nouveaux modulateurs du récepteur Smo, capable de se fixer au site 1 et/ou au site 2. Ce radioligand pourrait être aussi utilisé à grande échelle et permettre le criblage à haut débit de banques de molécules, y compris des composés approuvés par la FDA.

Le rôle du domaine SSD du récepteur Ptc dans la régulation de l'activation de Smo, par le biais de la concentration de cholestérol intracellulaire, est suggéré depuis plusieurs années (Bidet *et al.*, 2011). Récemment, l'oxystérol 20(S)-OHC a été proposé comme modulateur du récepteur Smo par une liaison directe au niveau du CRD (Nachtergaele *et al.*, 2012 ; Nachtergaele *et al.*, 2013). Néanmoins, à ce jour, le ligand endogène du récepteur Smo n'est toujours pas connu. Le [³H]MRT-92 constitue un outil intéressant pour la recherche de ce ligand. En effet, lors de mes travaux de thèse, j'ai pu détecter à l'aide du [³H]MRT-92 l'allostérie entre le site de liaison 1 du SAG et le site de liaison du 20(S)-OHC dans le CRD (résultats non publiés). Le [³H]MRT-92 peut donc permettre la recherche d'un ligand endogène du site CRD de Smo. Les endocannabinoïdes ont récemment été proposés comme de nouveaux inhibiteurs de la voie de signalisation Hh (Khaliullina *et al.*, 2015). L'utilisation du [³H]MRT-92 pourrait apporter des informations sur la liaison directe de ces composés sur

le récepteur Smo. Il faut cependant noter l'existence de sites de liaison supplémentaires sur Smo non reconnus par le [³H]MRT-92, comme le site de liaison de la purmorphamine dont l'interaction avec Smo a pourtant été démontrée (Sinha and Chen, 2006).

III. Découverte du composé GSA-10

1. Le GSA-10, un antagoniste de la voie Hh canonique ?

Le développement d'un modèle pharmacophorique de Smo basé sur la structure du SAG et de ses dérivés nous a permis d'identifier le composé quinolone GSA-10, parmi une banque de plus de 400 000 composés. Le GSA-10 ne présente pas les caractéristiques classiques d'un agoniste de Smo. Le GSA-10 induit la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 mais n'induit pas la prolifération des GCP de cervelet de raton, ni la translocation de Smo dans le cil primaire. Nous avons aussi démontré que le GSA-10 possède des propriétés antagonistes. En effet, le GSA-10 inhibe l'activité Gli-luciférase basale ou induite par le SAG dans les cellules Shh-light. Nous avons également identifié que le GSA-10 inhibe la prolifération des GCP de cervelet de raton induite par la signalisation Hh *in vitro* et l'activation constitutive de la voie Hh de cultures primaires de cellules dérivant de MB (résultats non publiés).

D'autres modulateurs de Smo présentent des propriétés agonistes et antagonistes. Le GDC-0449 et la Cyclopamine sont deux molécules antagonistes du récepteur Smo qui ont été rapportées comme agonistes d'une voie Hh non canonique permettant l'absorption de glucose par la mobilisation du calcium intracellulaire (Teperino *et al.*, 2012). Néanmoins, tous les antagonistes de Smo ne partagent pas cette double propriété. La mise en évidence des effets

de certains ligands de Smo sur des voies Hh non canoniques renforce le niveau de complexité des mécanismes de régulation de Smo.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai aussi participé à l'identification et à la caractérisation des propriétés agonistes d'une trentaine de composés appartenant à la famille des GSA synthétisés par nos collaborateurs chimistes (Petricci *et al.*, manuscrit en cours de rédaction). Parmi ces composés, des molécules plus puissantes que le GSA-10 vis-à-vis de la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 ont été identifiées. L'identification de ces composés va permettre de mieux caractériser les réponses non canoniques liées à l'activation de Smo. Le développement d'une forme tritiée du GSA-10 pourrait également être un outil pour la recherche de nouveaux composés de plus haute affinité et ayant les mêmes propriétés.

2. Site de liaison du GSA-10 au récepteur Smoothened

Malgré les effets différents du SAG et du GSA-10 observés sur la liaison de la BC, nos études sur la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en présence des shRNA Smo et Ptc ont fourni des preuves solides de l'effet direct du composé GSA-10 sur Smo. À la suite de ces travaux, j'ai pu mettre en évidence que le composé GSA-10 inhibe la liaison du [³H]MRT-92 au récepteur Smo, démontrant clairement l'interaction du GSA-10 avec Smo (résultats non publiés).

Les récents travaux de cristallisation du récepteur Smo complexé au SAG mettent en évidence que le SAG se fixe aux sept domaines TM de Smo, au niveau du site 1 identifié pour le composé LY2940680 (Wang *et al.*, 2014). La liaison du SAG implique néanmoins

des réarrangements des acides aminés différents de la liaison d'un antagoniste. En collaboration avec le bioinformaticien D. Rognan, nous avons réalisé l'amarrage moléculaire du GSA-10 dans le cristal de Smo complexé au SAG. Cette modélisation moléculaire fait apparaître un site de liaison potentiel au GSA-10 qui se superpose, mais qui n'est pas identique à celui décrit pour le composé SAG avec une partie plus profonde pour la chaîne latérale du GSA-10. Cette hypothèse est légitime du fait que le composé GSA-10 ait été identifié par un pharmacophore basé sur la structure du SAG et de ses dérivés. Cette hypothèse est également en accord avec la démonstration d'un antagonisme compétitif entre le GSA-10 et le MRT-83 dont le site de liaison se superpose également à celui du SAG, ainsi qu'avec les différences des effets du SAG et du GSA-10 observées, notamment les différences de compétition avec la BC. Il est possible que les deux molécules partagent un site de liaison très proche mais qu'elles interagissent avec des acides aminés distincts.

Des effets de potentialisation entre le SAG et le GSA-10 ont également été observés sur l'induction de la différenciation ostéoblastique de cellules mésenchymateuses C3H10T1/2. Ils suggèrent que les deux composés peuvent se fixer en même temps sur le récepteur Smo. Structurellement, il est peu envisageable que le SAG et le GSA-10 se fixent en même temps sur deux sites superposables pour induire les effets de potentialisation. Lors de la cristallisation du récepteur Smo, certaines formes du récepteur ont été identifiées sous la forme d'un dimère (Wang *et al.*, 2013). Ces données suggèrent que le SAG et le GSA-10 pourraient se lier au récepteur Smo sur chaque monomère, et que la liaison d'un composé à l'un des monomères potentialiserait la fixation de l'autre composé sur le deuxième monomère et ainsi les composés auraient un effet synergique entre eux. Le rôle des dimères a précédemment été identifié pour l'activation des récepteurs métabotropiques (Xu *et al.*, 2014 ; Rondard and Pin, 2015).

Une autre hypothèse demeure que la cristallisation du récepteur Smo complexé au composé SAG n'aurait pas permis d'identifier le site de liaison de l'agoniste dans la forme active du récepteur, et pourrait remettre en question la modélisation moléculaire réalisée à l'aide de ce cristal de Smo. En effet, bien que les récepteurs de la rhodopsine et de l'adénosine A_{2A} aient été cristallisés sous leur forme active uniquement en présence de leur agoniste (Park *et al.*, 2008), cette approche n'a pas été suffisante pour la cristallisation de la forme active du récepteur adrénergique β 2. Malgré la présence de son agoniste, le récepteur adrénergique β 2 a été cristallisé sous sa forme native (Rosenbaum *et al.*, 2011). Concernant la cristallisation du récepteur Smo complexé au SAG, elle a été réalisée avec un récepteur Smo tronqué et les modifications d'orientation des hélices V et VI, typiques de l'activation d'un RCPG, n'ont pas été observées (Wang *et al.*, 2014), suggérant que le site de liaison SAG identifié ne correspondrait pas au site de liaison de l'agoniste de la forme active de Smo. Comme pour le récepteur adrénergique β 2 (Rasmussen *et al.*, 2011), l'utilisation de nanobodies pourrait représenter une approche intéressante pour obtenir la cristallisation du récepteur Smo sous sa forme active. Les nanobodies sont de petits fragments (13 kDa) correspondant aux domaines variables des chaînes lourdes des anticorps de camélidés, comme le lama ou le chameau. Leurs propriétés étonnantes concernant la stabilité et la reconnaissance d'épitopes enfouis, inaccessibles aux anticorps monoclonaux conventionnels, permettent de les utiliser pour mimer l'effet d'une protéine G et de cristalliser les RCPG sous leur forme active. Cette étude pourrait permettre l'identification de nouveaux sites de liaison pour les composés agonistes de Smo.

IV. Conclusions et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse aura permis la découverte d'un nouveau site de liaison au niveau du domaine TM de Smo qui ouvre la voie pour la recherche de nouveaux modulateurs du récepteur Smo et la compréhension des relations entre l'efficacité des composés et leur site de liaison. La mise en évidence de ce nouveau site de liaison a conduit au développement du composé MRT-92, le plus puissant antagoniste du récepteur Smo connu à ce jour. Sa capacité à inhiber la prolifération cellulaire des précurseurs des cellules granulaires du cervelet induite par la signalisation Hh *in vitro* et l'activation constitutive de la voie de signalisation Hh de cultures primaires de cellules dérivant de MB, laissent supposer que le MRT-92 pourrait être une molécule utilisable en thérapeutique pour le traitement de tumeurs Hh-dépendantes. De plus, son efficacité à inhiber la forme SmoD473H, résistante au traitement par le GDC-0449, suggère son utilisation pour le traitement de cette résistance. Il conviendra d'étudier la capacité du MRT-92 à inhiber les mutants de Smo résistants au traitement par le GDC-0449 ou à d'autres antagonistes. L'investigation du profil pharmacocinétique du MRT-92 et de ses dérivés, ainsi que leur efficacité à réprimer le développement de tumeurs Hh-dépendantes sur des modèles murins demeurent la prochaine étape.

Ces travaux ont également conduit à la découverte du composé GSA-10 qui possède une activité agoniste vis-à-vis d'une voie Hh non canonique encore non caractérisée, et à la mise en évidence des formes conformationnelles Smo^{SAG} et Smo^{GSA-10}. La recherche d'antagonistes sélectifs de ces formes est importante pour le développement de marqueurs utiles à la détection de ces différentes formes de Smo dans les cellules tumorales ou dans leur microenvironnement. Les propriétés de modulateur négatif du GSA-10 sur la prolifération

cellulaire des précurseurs des cellules granulaires du cervelet induite par la signalisation Hh *in vitro* et sur l'activation constitutive de la voie Hh de cultures primaires de cellules dérivant de MB, suggèrent de tester l'efficacité du GSA-10 à bloquer le développement de tumeurs Hh-dépendantes sur des modèles murins. Il conviendra de déterminer le mécanisme moléculaire de régulation du récepteur Smo par le GSA-10.

L'utilisation du [³H]MRT-92 comme outil pharmacologique va, d'une part, permettre de réaliser des criblages de banques de molécules pour identifier de nouveaux modulateurs du récepteur Smo et, d'autre part, permettre d'identifier les sites de liaison des différents composés, notamment du GSA-10, grâce à des études de radioliation sur des récepteurs Smo mutés. La cristallisation du récepteur Smo complexé au MRT-92 et au GSA-10 sera également envisagée et permettra d'apporter des renseignements structurels supplémentaires que les techniques de modélisation moléculaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aanstad, P., N. Santos, K. C. Corbit, P. J. Scherz, A. Trinh le, W. Salvenmoser, J. Huisken, J. F. Reiter and D. Y. Stainier (2009). The extracellular domain of Smoothed regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol* **19**(12): 1034-1039.
- Adamski, J., V. Ramaswamy, A. Huang and E. Bouffet (2014). Advances in managing medulloblastoma and intracranial primitive neuro-ectodermal tumors. *F1000Prime Rep* **6**: 56.
- Ahn, K. H., A. Nishiyama, D. F. Mierke and D. A. Kendall (2010). Hydrophobic residues in helix 8 of cannabinoid receptor 1 are critical for structural and functional properties. *Biochemistry* **49**(3): 502-511.
- Ahn, S. and A. L. Joyner (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**(7060): 894-897.
- Akazawa, C., H. Tsuzuki, Y. Nakamura, Y. Sasaki, K. Ohsaki, S. Nakamura, Y. Arakawa and S. Kohsaka (2004). The upregulated expression of sonic hedgehog in motor neurons after rat facial nerve axotomy. *J Neurosci* **24**(36): 7923-7930.
- Alvarez-Medina, R., J. Cayuso, T. Okubo, S. Takada and E. Marti (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* **135**(2): 237-247.
- Amador-Arjona, A., J. Elliott, A. Miller, A. Ginbey, G. J. Pazour, G. Enikolopov, A. J. Roberts and A. V. Terskikh (2011). Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J Neurosci* **31**(27): 9933-9944.
- Amakye, D., Z. Jagani and M. Dorsch (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med* **19**(11): 1410-1422.
- Angot, E., K. Loulier, K. T. Nguyen-Ba-Charvet, A. P. Gadeau, M. Ruat and E. Traiffort (2008). Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* **26**(9): 2311-2320.
- Aratake, Y., T. Okuno, T. Matsunobu, K. Saeki, R. Takayanagi, S. Furuya and T. Yokomizo (2012). Helix 8 of leukotriene B4 receptor 1 inhibits ligand-induced internalization. *FASEB J* **26**(10): 4068-4078.
- Athar, M., C. Li, A. L. Kim, V. S. Spiegelman and D. R. Bickers (2014). Sonic Hedgehog Signaling in Basal Cell Nevus Syndrome. *Cancer Res* **74**(18): 4967-4975.
- Atwood, S. X., M. Li, A. Lee, J. Y. Tang and A. E. Oro (2013). GLI activation by atypical protein kinase C iota/lambda regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature* **494**(7438): 484-488.
- Atwood, S. X., K. Y. Sarin, R. J. Whitson, J. R. Li, G. Kim, M. Rezaee, M. S. Ally, J. Kim, C. Yao, A. L. Chang, A. E. Oro and J. Y. Tang (2015). Smoothed variants explain the majority of drug resistance in Basal cell carcinoma. *Cancer Cell* **27**(3): 342-353.
- Awwad, H. O., E. E. Millman, E. Alpizar-Foster, R. H. Moore and B. J. Knoll (2010). Mutating the dileucine motif of the human beta(2)-adrenoceptor reduces the high initial rate of receptor phosphorylation by GRK without affecting postendocytic sorting. *Eur J Pharmacol* **635**(1-3): 9-15.
- Balordi, F. and G. Fishell (2007). Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* **27**(22): 5936-5947.
- Balordi, F. and G. Fishell (2007). Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci* **27**(52): 14248-14259.

- Banerjee, S. B., R. Rajendran, B. G. Dias, U. Ladiwala, S. Tole and V. A. Vaidya (2005). Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci* **22**(7): 1570-1580.
- Bar, E. E., A. Chaudhry, A. Lin, X. Fan, K. Schreck, W. Matsui, S. Piccirillo, A. L. Vescovi, F. DiMeco, A. Olivi and C. G. Eberhart (2007). Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* **25**(10): 2524-2533.
- Barzi, M., D. Kostrz, A. Menendez and S. Pons (2011). Sonic Hedgehog-induced proliferation requires specific Galpha inhibitory proteins. *J Biol Chem* **286**(10): 8067-8074.
- Beachy, P. A., S. G. Hymowitz, R. A. Lazarus, D. J. Leahy and C. Siebold (2010). Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes Dev* **24**(18): 2001-2012.
- Beachy, P. A., S. S. Karhadkar and D. M. Berman (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**(7015): 324-331.
- Beauchamp, E. M., L. Ringer, G. Bulut, K. P. Sajwan, M. D. Hall, Y. C. Lee, D. Peaceman, M. Ozdemirli, O. Rodriguez, T. J. Macdonald, C. Albanese, J. A. Toretsky and A. Uren (2011). Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *J Clin Invest* **121**(1): 148-160.
- Belgacem, Y. H. and L. N. Borodinsky (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(11): 4482-4487.
- Belgacem, Y. H. and L. N. Borodinsky (2015). Inversion of Sonic hedgehog action on its canonical pathway by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(13): 4140-4145.
- Beloti, M. M., L. S. Bellesini and A. L. Rosa (2005). The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. *Biomaterials* **26**(20): 4245-4248.
- Beloti, M. M., L. S. Bellesini and A. L. Rosa (2005). Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells. *Cell Biol Int* **29**(7): 537-541.
- Berman, D. M., S. S. Karhadkar, A. R. Hallahan, J. I. Pritchard, C. G. Eberhart, D. N. Watkins, J. K. Chen, M. K. Cooper, J. Taipale, J. M. Olson and P. A. Beachy (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**(5586): 1559-1561.
- Berman, D. M., S. S. Karhadkar, A. Maitra, R. Montes De Oca, M. R. Gerstenblith, K. Briggs, A. R. Parker, Y. Shimada, J. R. Eshleman, D. N. Watkins and P. A. Beachy (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**(6960): 846-851.
- Bettencourt-Dias, M., F. Hildebrandt, D. Pellman, G. Woods and S. A. Godinho (2011). Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet* **27**(8): 307-315.
- Bezard, E., J. Baufreton, G. Owens, A. R. Crossman, H. Dudek, A. Taupignon and J. M. Brotchie (2003). Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus. *Faseb J* **17**(15): 2337-2338.
- Bibliowicz, J. and J. M. Gross (2011). Ectopic proliferation contributes to retinal dysplasia in the juvenile zebrafish patched2 mutant eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**(12): 8868-8877.
- Bidet, M., O. Joubert, B. Lacombe, M. Ciantar, R. Nehme, P. Mollat, L. Bretillon, H. Faure, R. Bittman, M. Ruat and I. Mus-Veteau (2011). The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* **6**(9): e23834.

- Bidet, M., A. Tomico, P. Martin, H. Guizouarn, P. Mollat and I. Mus-Veteau (2012). The Hedgehog receptor patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance. *Mol Cancer Res* 10(11): 1496-1508.
- Bijlsma, M. F., K. S. Borensztajn, H. Roelink, M. P. Peppelenbosch and C. A. Spek (2007). Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell Signal* 19(12): 2596-2604.
- Bijlsma, M. F., H. Damhofer and H. Roelink (2012). Hedgehog-stimulated chemotaxis is mediated by smoothed located outside the primary cilium. *Sci Signal* 5(238): ra60.
- Bishop, B., A. R. Aricescu, K. Harlos, C. A. O'Callaghan, E. Y. Jones and C. Siebold (2009). Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nat Struct Mol Biol* 16(7): 698-703.
- Bitgood, M. J. and A. P. McMahon (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172(1): 126-138.
- Bitgood, M. J., L. Y. Shen and A. P. McMahon (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology* 6(3): 298-304.
- Bourikas, D., V. Pekarik, T. Baeriswyl, A. Grunditz, R. Sadhu, M. Nardo and E. T. Stoeckli (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci* 8(3): 297-304.
- Bredesen, D. E., P. Mehlen and S. Rabizadeh (2004). Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. *Physiol Rev* 84(2): 411-430.
- Breunig, J. J., M. R. Sarkisian, J. I. Arellano, Y. M. Morozov, A. E. Ayoub, S. Sojitra, B. Wang, R. A. Flavell, P. Rakic and T. Town (2008). Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 13127-13132.
- Brill, M. S., J. Ninkovic, E. Winpenny, R. D. Hodge, I. Ozen, R. Yang, A. Lepier, S. Gascon, F. Erdelyi, G. Szabo, C. Parras, F. Guillemot, M. Frotscher, B. Berninger, R. F. Hevner, O. Raineteau and M. Gotz (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12(12): 1524-1533.
- Briscoe, J., Y. Chen, T. M. Jessell and G. Struhl (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell* 7(6): 1279-1291.
- Briscoe, J. and P. P. Therond (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(7): 416-429.
- Brunton, S. A., J. H. Stibbard, L. L. Rubin, O. M. Guicherit, L. I. Kruse, S. Price, R. di Lucrezia, C. H. MacKinnon, A. Avery, Y. Park, D. Buxton and E. A. Boyd (2009). Potent agonists of the Hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem Lett* 19(15): 4308-4311.
- Buglino, J. A. and M. D. Resh (2008). Hhat is a palmitoyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J Biol Chem* 283(32): 22076-22088.
- Buglino, J. A. and M. D. Resh (2012). Palmitoylation of Hedgehog proteins. *Vitam Horm* 88: 229-252.
- Buonamici, S., J. Williams, M. Morrissey, A. Wang, R. Guo, A. Vattay, K. Hsiao, J. Yuan, J. Green, B. Ospina, Q. Yu, L. Ostrom, P. Fordjour, D. L. Anderson, J. E. Monahan, J. F. Kelleher, S. Peukert, S. Pan, X. Wu, S. M. Maira, C. Garcia-Echeverria, K. J. Briggs, D. N. Watkins, Y. M. Yao, C. Lengauer, M. Warmuth, W. R. Sellers and M. Dorsch (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2(51): 51-70.

- Burke, R., D. Nellen, M. Bellotto, E. Hafen, K. A. Senti, B. J. Dickson and K. Basler (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* **99**(7): 803-815.
- Buttner, A., K. Seifert, T. Cottin, V. Sarli, L. Tzagkaroulaki, S. Scholz and A. Giannis (2009). Synthesis and biological evaluation of SANT-2 and analogues as inhibitors of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem* **17**(14): 4943-4954.
- Callejo, A., C. Torroja, L. Quijada and I. Guerrero (2006). Hedgehog lipid modifications are required for Hedgehog stabilization in the extracellular matrix. *Development* **133**(3): 471-483.
- Capdevila, J., F. Pariente, J. Sampedro, J. L. Alonso and I. Guerrero (1994). Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in *Drosophila* embryos. *Development* **120**(4): 987-998.
- Carpenter, D., D. M. Stone, J. Brush, A. Ryan, M. Armanini, G. Frantz, A. Rosenthal and F. J. de Sauvage (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13630-13634.
- Chamberlain, C. E., J. Jeong, C. Guo, B. L. Allen and A. P. McMahon (2008). Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development* **135**(6): 1097-1106.
- Chamoun, Z., R. K. Mann, D. Nellen, D. P. von Kessler, M. Bellotto, P. A. Beachy and K. Basler (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* **293**(5537): 2080-2084.
- Chan, J. A., S. Balasubramanian, R. M. Witt, K. J. Nazemi, Y. Choi, M. F. Pazyra-Murphy, C. O. Walsh, M. Thompson and R. A. Segal (2009). Proteoglycan interactions with Sonic Hedgehog specify mitogenic responses. *Nat Neurosci* **12**(4): 409-417.
- Charron, F., E. Stein, J. Jeong, A. P. McMahon and M. Tessier-Lavigne (2003). The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell* **113**(1): 11-23.
- Charron, F. and M. Tessier-Lavigne (2005). Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development* **132**(10): 2251-2262.
- Charytoniuk, D., E. Traiffort, P. Hantraye, J. M. Hermel, A. Galdes and M. Ruat (2002). Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur J Neurosci* **16**(12): 2351-2357.
- Chechneva, O. V., F. Mayrhofer, D. J. Daugherty, R. G. Krishnamurthy, P. Bannerman, D. E. Pleasure and W. Deng (2014). A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis* **5**: e1481.
- Chen, J. K., J. Taipale, M. K. Cooper and P. A. Beachy (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* **16**(21): 2743-2748.
- Chen, J. K., J. Taipale, K. E. Young, T. Maiti and P. A. Beachy (2002). Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(22): 14071-14076.
- Chen, M. H., Y. J. Li, T. Kawakami, S. M. Xu and P. T. Chuang (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev* **18**(6): 641-659.
- Chen, W., X. R. Ren, C. D. Nelson, L. S. Barak, J. K. Chen, P. A. Beachy, F. de Sauvage and R. J. Lefkowitz (2004). Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science* **306**(5705): 2257-2260.
- Chen, X., A. Horiuchi, N. Kikuchi, R. Osada, J. Yoshida, T. Shiozawa and I. Konishi (2007). Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell

- proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer Sci* **98**(1): 68-76.
- Chen, X., H. Tukachinsky, C. H. Huang, C. Jao, Y. R. Chu, H. Y. Tang, B. Mueller, S. Schulman, T. A. Rapoport and A. Salic (2011). Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **192**(5): 825-838.
- Chen, Y., S. Li, C. Tong, Y. Zhao, B. Wang, Y. Liu, J. Jia and J. Jiang (2010). G protein-coupled receptor kinase 2 promotes high-level Hedgehog signaling by regulating the active state of Smo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms in *Drosophila*. *Genes Dev* **24**(18): 2054-2067.
- Chen, Y., N. Sasai, G. Ma, T. Yue, J. Jia, J. Briscoe and J. Jiang (2011). Sonic Hedgehog dependent phosphorylation by CK1alpha and GRK2 is required for ciliary accumulation and activation of smoothened. *PLoS Biol* **9**(6): e1001083.
- Chinchilla, P., L. Xiao, M. G. Kazanietz and N. A. Riobo (2010). Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* **9**(3): 570-579.
- Christ, A., A. Christa, E. Kur, O. Lioubinski, S. Bachmann, T. E. Willnow and A. Hammes (2012). LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev Cell* **22**(2): 268-278.
- Chuang, P. T. and A. P. McMahon (1999). Vertebrate hedgehog signalling modulated by induction of a hedgehog-binding protein. *Nature* **397**: 617-621.
- Clement, V., P. Sanchez, N. de Tribolet, I. Radovanovic and A. Ruiz i Altaba (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* **17**(2): 165-172.
- Cooper, M. K., J. A. Porter, K. E. Young and P. A. Beachy (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling [see comments]. *Science* **280**(5369): 1603-1607.
- Cooper, M. K., C. A. Wassif, P. A. Krakowiak, J. Taipale, R. Gong, R. I. Kelley, F. D. Porter and P. A. Beachy (2003). A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet* **33**(4): 508-513.
- Corbit, K. C., P. Aanstad, V. Singla, A. R. Norman, D. Y. Stainier and J. F. Reiter (2005). Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**(7061): 1018-1021.
- Corcoran, R. B. and M. P. Scott (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8408-8413.
- Corrales, J. D., G. L. Rocco, S. Blaess, Q. Guo and A. L. Joyner (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* **131**(22): 5581-5590.
- Coulombe, J., E. Traiffort, K. Loulier, H. Faure and M. Ruat (2004). Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Mol Cell Neurosci* **25**(2): 323-333.
- Creanga, A., T. D. Glenn, R. K. Mann, A. M. Saunders, W. S. Talbot and P. A. Beachy (2012). Scube/You activity mediates release of dually lipid-modified Hedgehog signal in soluble form. *Genes Dev* **26**(12): 1312-1325.
- Dafinger, C., M. C. Liebau, S. M. Elsayed, Y. Hellenbroich, E. Boltshauser, G. C. Korenke, F. Fabretti, A. R. Janecke, I. Ebermann, G. Nurnberg, P. Nurnberg, H. Zentgraf, F. Koerber, K. Addicks, E. Elsobky, T. Benzing, B. Schermer and H. J. Bolz (2011). Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest* **121**(7): 2662-2667.

- Dahmane, N., J. Lee, P. Robins, P. Heller and A. Ruiz i Altaba (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**(6653): 876-881.
- Dahmane, N. and A. Ruiz-i-Altaba (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* **126**(14): 3089-3100.
- Daniel, V. C., C. D. Peacock and D. N. Watkins (2006). Developmental signalling pathways in lung cancer. *Respirology* **11**(3): 234-240.
- Dann, C. E., J. C. Hsieh, A. Rattner, D. Sharma, J. Nathans and D. J. Leahy (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* **412**(6842): 86-90.
- Dass, B., M. M. Iravani, M. J. Jackson, T. M. Engber, A. Galdes and P. Jenner (2002). Behavioural and immunohistochemical changes following supranigral administration of sonic hedgehog in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmosets. *Neuroscience* **114**(1): 99-109.
- Davey, M. G., J. James, I. R. Paton, D. W. Burt and C. Tickle (2007). Analysis of talpid3 and wild-type chicken embryos reveals roles for Hedgehog signalling in development of the limb bud vasculature. *Dev Biol* **301**(1): 155-165.
- Dawson, M. R., A. Polito, J. M. Levine and R. Reynolds (2003). NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* **24**(2): 476-488.
- Day, P. W., S. G. Rasmussen, C. Parnot, J. J. Fung, A. Masood, T. S. Kobilka, X. J. Yao, H. J. Choi, W. I. Weis, D. K. Rohrer and B. K. Kobilka (2007). A monoclonal antibody for G protein-coupled receptor crystallography. *Nat Methods* **4**(11): 927-929.
- Delos Santos, N. M., L. A. Gardner, S. W. White and S. W. Bahouth (2006). Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *J Biol Chem* **281**(18): 12896-12907.
- Denef, N., D. Neubuser, L. Perez and S. M. Cohen (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed. *Cell* **102**(4): 521-531.
- Dessaud, E., A. P. McMahon and J. Briscoe (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**(15): 2489-2503.
- Dessaud, E., V. Ribes, N. Balaskas, L. L. Yang, A. Pierani, A. Kicheva, B. G. Novitsch, J. Briscoe and N. Sasai (2010). Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol* **8**(6): e1000382.
- Dessole, G., D. Branca, F. Ferrigno, O. Kinzel, E. Muraglia, M. C. Palumbi, M. Rowley, S. Serafini, C. Steinkuhler and P. Jones (2009). Discovery of N-[(1-aryl-1H-indazol-5-yl)methyl]amides derivatives as smoothed antagonists for inhibition of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett* **19**(15): 4191-4195.
- Dierks, C., R. Beigi, G. R. Guo, K. Zirlik, M. R. Stegert, P. Manley, C. Trussell, A. Schmitt-Graeff, K. Landwerlin, H. Veelken and M. Warmuth (2008). Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* **14**(3): 238-249.
- Dijkgraaf, G. J., B. Aliche, L. Weinmann, T. Januario, K. West, Z. Modrusan, D. Burdick, R. Goldsmith, K. Robarge, D. Sutherlin, S. J. Scales, S. E. Gould, R. L. Yauch and F. J. de Sauvage (2011). Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer Res* **71**(2): 435-444.
- Dimou, L. and M. Gotz (2014). Glial cells as progenitors and stem cells: new roles in the healthy and diseased brain. *Physiol Rev* **94**(3): 709-737.

- Dorn, K. V., C. E. Hughes and R. Rohatgi (2012). A Smoothened-Evc2 complex transduces the Hedgehog signal at primary cilia. *Dev Cell* **23**(4): 823-835.
- Douglas, A. E., J. A. Heim, F. Shen, L. L. Almada, N. A. Riobo, M. E. Fernandez-Zapico and D. R. Manning (2011). The alpha subunit of the G protein G13 regulates activity of one or more Gli transcription factors independently of smoothened. *J Biol Chem* **286**(35): 30714-30722.
- Dwyer, J. R., N. Sever, M. Carlson, S. F. Nelson, P. A. Beachy and F. Parhami (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *J Biol Chem* **282**(12): 8959-8968.
- Dyer, M. A., S. M. Farrington, D. Mohn, J. R. Munday and M. H. Baron (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* **128**(10): 1717-1730.
- Eaton, S. (2008). Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(6): 437-445.
- Echelard, Y., D. J. Epstein, B. St-Jacques, L. Shen, J. Mohler, J. A. McMahon and A. P. McMahon (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* **75**(7): 1417-1430.
- Edgar, N. and E. Sibille (2012). A putative functional role for oligodendrocytes in mood regulation. *Transl Psychiatry* **2**: e109.
- Ekker, S. C., A. R. Ungar, P. Greenstein, D. P. von Kessler, J. A. Porter, R. T. Moon and P. A. Beachy (1995). Patterning activities of vertebrate hedgehog proteins in the developing eye and brain. *Curr Biol* **5**(8): 944-955.
- Epstein, E. H. (2008). Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* **8**(10): 743-754.
- Ericson, J., S. Morton, A. Kawakami, H. Roelink and T. M. Jessell (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**(4): 661-673.
- Eugster, C., D. Panakova, A. Mahmoud and S. Eaton (2007). Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev Cell* **13**(1): 57-71.
- Fabre, P. J., T. Shimogori and F. Charron (2010). Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci* **30**(1): 266-275.
- Feldmann, G., V. Fendrich, K. McGovern, D. Bedja, S. Bisht, H. Alvarez, J. B. Koorstra, N. Habbe, C. Karikari, M. Mullendore, K. L. Gabrielson, R. Sharma, W. Matsui and A. Maitra (2008). An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* **7**(9): 2725-2735.
- Fellay, C. N., D. Frappaz, M. P. Sunyach, E. Franceschi, A. A. Brandes and R. Stupp (2011). Medulloblastomas in adults: prognostic factors and lessons from paediatrics. *Curr Opin Neurol* **24**(6): 626-632.
- Ferent, J., L. Cochard, H. Faure, M. Taddei, H. Hahn, M. Ruat and E. Traiffort (2014). Genetic activation of Hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Reports* **3**(2): 312-323.
- Ferent, J., C. Zimmer, P. Durbec, M. Ruat and E. Traiffort (2013). Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination. *J Neurosci* **33**(5): 1759-1772.
- Fiorini, L., M. A. Tribalat, L. Sauvard, J. Cazareth, E. Lalli, I. Broutin, O. P. Thomas and I. Mus-Veteau (2015). Natural paniceins from mediterranean sponge inhibit the multidrug resistance activity of Patched and increase chemotherapy efficiency on melanoma cells. *Oncotarget* **6**(26): 22282-22297.

- Fontaine, C., W. Cousin, M. Plaisant, C. Dani and P. Peraldi (2008). Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**(4): 1037-1046.
- Frank-Kamenetsky, M., X. M. Zhang, S. Bottega, O. Guicherit, H. Wichterle, H. Dudek, D. Bumcrot, F. Y. Wang, S. Jones, J. Shulok, L. L. Rubin and J. A. Porter (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol* **1**(2): 10.
- Frappart, P. O., Y. Lee, H. R. Russell, N. Chalhoub, Y. D. Wang, K. E. O'rii, J. Zhao, N. Kondo, S. J. Baker and P. J. McKinnon (2009). Recurrent genomic alterations characterize medulloblastoma arising from DNA double-strand break repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(6): 1880-1885.
- Fry, A. M., M. J. Leaper and R. Bayliss (2014). The primary cilium: guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis* **10**(1): 62-68.
- Fuccillo, M., A. L. Joyner and G. Fishell (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**(10): 772-783.
- Gabay, L., S. Lowell, L. L. Rubin and D. J. Anderson (2003). Deregulation of dorsoventral patterning by FGF confers trilineage differentiation capacity on CNS stem cells in vitro. *Neuron* **40**(3): 485-499.
- Gallet, A. (2011). Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends Cell Biol* **21**(4): 238-246.
- Gallet, A., R. Rodriguez, L. Ruel and P. P. Therond (2003). Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev Cell* **4**(2): 191-204.
- Gallet, A., L. Ruel, L. Staccini-Lavenant and P. P. Therond (2006). Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in Drosophila epithelia. *Development* **133**(3): 407-418.
- Galvin, K. E., H. Ye, D. J. Erstad, R. Feddersen and C. Wetmore (2008). Gli1 induces G2/M arrest and apoptosis in hippocampal but not tumor-derived neural stem cells. *Stem Cells* **26**(4): 1027-1036.
- Garcia, A. D., R. Petrova, L. Eng and A. L. Joyner (2010). Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **30**(41): 13597-13608.
- Ghosh, E., P. Kumari, D. Jaiman and A. K. Shukla (2015). Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**(2): 69-81.
- Giannis, A., P. Heretsch, V. Sarli and A. Stossel (2009). Synthesis of cycloamine using a biomimetic and diastereoselective approach. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**(42): 7911-7914.
- Goetz, S. C. and K. V. Anderson (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**(5): 331-344.
- Gongal, P. A., C. R. French and A. J. Waskiewicz (2011). Aberrant forebrain signaling during early development underlies the generation of holoprosencephaly and coloboma. *Biochim Biophys Acta* **1812**(3): 390-401.
- Gonzalez-Reyes, L. E., M. Verbitsky, J. Blesa, V. Jackson-Lewis, D. Paredes, K. Tillack, S. Phani, E. R. Kramer, S. Przedborski and A. H. Kottmann (2012). Sonic hedgehog maintains cellular and neurochemical homeostasis in the adult nigrostriatal circuit. *Neuron* **75**(2): 306-319.
- Goodrich, L. V., R. L. Johnson, L. Milenkovic, J. A. McMahon and M. P. Scott (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev* **10**(3): 301-312.

- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, K. M. Higgins and M. P. Scott (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**(5329): 1109-1113.
- Gorojankina, T., L. Hoch, H. Faure, H. Roudaut, E. Traiffort, A. Schoenfelder, N. Girard, A. Mann, F. Manetti, A. Solinas, E. Petricci, M. Taddei and M. Ruat (2013). Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothed. *Mol Pharmacol* **83**(5): 1020-1029.
- Grachtchouk, M., J. Pero, S. H. Yang, A. N. Ermilov, L. E. Michael, A. Wang, D. Wilbert, R. M. Patel, J. Ferris, J. Diener, M. Allen, S. Lim, L. J. Syu, M. Verhaegen and A. A. Dlugosz (2011). Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest* **121**(5): 1768-1781.
- Grover, V. K., J. G. Valadez, A. B. Bowman and M. K. Cooper (2011). Lipid modifications of Sonic hedgehog ligand dictate cellular reception and signal response. *PLoS One* **6**(7): e21353.
- Guo, Z., L. Zhang, Z. Wu, Y. Chen, F. Wang and G. Chen (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* **14**(2): 188-202.
- Hadden, M. K. (2013). Hedgehog pathway inhibitors: a patent review (2009--present). *Expert Opin Ther Pat* **23**(3): 345-361.
- Hadden, M. K. (2014). Hedgehog pathway agonism: therapeutic potential and small-molecule development. *ChemMedChem* **9**(1): 27-37.
- Hadden, M. K. (2015). Targeting GLI proteins in human cancer by small molecules (WO2014116651 A1): a patent evaluation. *Expert Opin Ther Pat*: 1-5.
- Hahn, H., C. Wicking, P. G. Zaphiropoulos, M. R. Gailani, S. Shanley, A. Chidambaram, I. Vorechovsky, E. Holmberg, A. B. Unden, S. Gillies, K. Negus, I. Smyth, C. Pressman, D. J. Leffell, B. Gerrard, A. M. Goldstein, M. Dean, R. Toftgard, G. Chenevix-Trench, B. Wainwright and A. E. Bale (1996). Mutations of the human homolog of drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**: 841-851.
- Hahn, H., L. Wojnowski, A. M. Zimmer, J. Hall, G. Miller and A. Zimmer (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome [see comments]. *Nat Med* **4**(5): 619-622.
- Hallahan, A. R., J. I. Pritchard, S. Hansen, M. Benson, J. Stoeck, B. A. Hatton, T. L. Russell, R. G. Ellenbogen, I. D. Bernstein, P. A. Beachy and J. M. Olson (2004). The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* **64**(21): 7794-7800.
- Hammerschmidt, M. and A. P. McMahon (1998). The effect of pertussis toxin on zebrafish development: a possible role for inhibitory G-proteins in hedgehog signaling. *Dev Biol* **194**(2): 166-171.
- Han, Y. G., N. Spassky, M. Romaguera-Ros, J. M. Garcia-Verdugo, A. Aguilar, S. Schneider-Maunoury and A. Alvarez-Buylla (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* **11**(3): 277-284.
- Hatayama, M. and J. Aruga (2012). Gli protein nuclear localization signal. *Vitam Horm* **88**: 73-89.
- Hatten, M. E. and M. F. Roussel (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* **34**(3): 134-142.
- Hatton, B. A., E. H. Villavicencio, K. D. Tsuchiya, J. I. Pritchard, S. Ditzler, B. Pullar, S. Hansen, S. E. Knoblauch, D. Lee, C. G. Eberhart, A. R. Hallahan and J. M. Olson (2008). The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res* **68**(6): 1768-1776.

- Haycraft, C. J., B. Banizs, Y. Aydin-Son, Q. Zhang, E. J. Michaud and B. K. Yoder (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet* **1**(4): e53.
- Heine, V. M. and D. H. Rowitch (2009). Hedgehog signaling has a protective effect in glucocorticoid-induced mouse neonatal brain injury through an 11betaHSD2-dependent mechanism. *J Clin Invest* **119**(2): 267-277.
- Heretsch, P., L. Tzagkaroulaki and A. Giannis (2010). Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem* **18**(18): 6613-6624.
- Hime, G. R., H. Lada, M. J. Fietz, S. Gillies, A. Passmore, C. Wicking and B. J. Wainwright (2004). Functional analysis in *Drosophila* indicates that the NBCCS/PTCH1 mutation G509V results in activation of smoothed through a dominant-negative mechanism. *Dev Dyn* **229**(4): 780-790.
- Hoch, L., H. Faure, H. Roudaut, A. Schoenfelder, A. Mann, N. Girard, L. Bihannic, O. Ayrault, E. Petricci, M. Taddei, D. Rognan and M. Ruat (2015). MRT-92 inhibits Hedgehog signaling by blocking overlapping binding sites in the transmembrane domain of the Smoothed receptor. *FASEB J* **29**(5): 1817-1829.
- Hooper, J. E. and M. P. Scott (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* **59**(4): 751-765.
- Hosoya, T., M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn and M. Ishibashi (2008). Naturally occurring small-molecule inhibitors of hedgehog/GLI-mediated transcription. *Chembiochem* **9**(7): 1082-1092.
- Huangfu, D. and K. V. Anderson (2005). Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11325-11330.
- Huangfu, D. and K. V. Anderson (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* **133**(1): 3-14.
- Huangfu, D., A. Liu, A. S. Rakeman, N. S. Murcia, L. Niswander and K. V. Anderson (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**(6962): 83-87.
- Hui, C. C. and S. Angers (2011). Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**: 513-537.
- Hyman, J. M., A. J. Firestone, V. M. Heine, Y. Zhao, C. A. Ocasio, K. Han, M. Sun, P. G. Rack, S. Sinha, J. J. Wu, D. E. Solow-Cordero, J. Jiang, D. H. Rowitch and J. K. Chen (2009). Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(33): 14132-14137.
- Ihrie, R. A., J. K. Shah, C. C. Harwell, J. H. Levine, C. D. Guinto, M. Lezameta, A. R. Kriegstein and A. Alvarez-Buylla (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* **71**(2): 250-262.
- Incardona, J. P., W. Gaffield, R. P. Kapur and H. Roelink (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**(18): 3553-3562.
- Incardona, J. P., J. Gruenberg and H. Roelink (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol* **12**(12): 983-995.
- Infante, P., M. Mori, R. Alfonsi, F. Ghirga, F. Aiello, S. Toscano, C. Ingallina, M. Siler, D. Cucchi, A. Po, E. Miele, D. D'Amico, G. Canettieri, E. De Smaele, E. Ferretti, I. Screpanti, G. Uccello Barretta, M. Botta, B. Botta, A. Gulino and L. Di Marcotullio (2015). Gli1/DNA interaction is a druggable target for Hedgehog-dependent tumors. *EMBO J* **34**(2): 200-217.
- Ingham, P. W., A. M. Taylor and Y. Nakano (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* **353**(6340): 184-187.

- Janda, C. Y., D. Waghay, A. M. Levin, C. Thomas and K. C. Garcia (2012). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* **337**(6090): 59-64.
- Jeong, J. and A. P. McMahon (2005). Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development* **132**(1): 143-154.
- Johnson, R. L., A. L. Rothman, J. Xie, L. V. Goodrich, J. W. Bare, J. M. Bonifas, A. G. Quinn, R. M. Myers, D. R. Cox, E. H. Epstein, Jr. and M. P. Scott (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* **272**(5268): 1668-1671.
- Johnson, R. L., L. Zhou and E. C. Bailey (2002). Distinct consequences of sterol sensor mutations in *Drosophila* and mouse patched homologs. *Dev Biol* **242**(2): 224-235.
- Kanda, S., Y. Mochizuki, T. Suematsu, Y. Miyata, K. Nomata and H. Kanetake (2003). Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **278**(10): 8244-8249.
- Karhadkar, S. S., G. S. Bova, N. Abdallah, S. Dhara, D. Gardner, A. Maitra, J. T. Isaacs, D. M. Berman and P. A. Beachy (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**(7009): 707-712.
- Kasai, K., M. Takahashi, N. Osumi, S. Sinnarajah, T. Takeo, H. Ikeda, J. H. Kehrl, G. Itoh and H. Arnheiter (2004). The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* **9**(1): 49-58.
- Katritch, V., V. Cherezov and R. C. Stevens (2013). Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **53**: 531-556.
- Kessaris, N., F. Jamen, L. L. Rubin and W. D. Richardson (2004). Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development* **131**(6): 1289-1298.
- Khaliullina, H., M. Bilgin, J. L. Sampaio, A. Shevchenko and S. Eaton (2015). Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11): 3415-3420.
- Kim, J., J. J. Lee, J. Kim, D. Gardner and P. A. Beachy (2010). Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(30): 13432-13437.
- Kim, J., J. Y. Tang, R. Gong, J. Kim, J. J. Lee, K. V. Clemons, C. R. Chong, K. S. Chang, M. Fereshteh, D. Gardner, T. Reya, J. O. Liu, E. H. Epstein, D. A. Stevens and P. A. Beachy (2010). Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* **17**(4): 388-399.
- Kirchberg, K., T. Y. Kim, M. Moller, D. Skegro, G. Dasara Raju, J. Granzin, G. Buldt, R. Schlesinger and U. Alexiev (2011). Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(46): 18690-18695.
- Kniazeff, J. and J. P. Pin (2012). G-protein-coupled receptors dimers and oligomers: for which purpose? The GABA(B) receptor under investigation. *Med Sci (Paris)* **28**(10): 858-863.
- Kool, M., J. Koster, J. Bunt, N. E. Hasselt, A. Lakeman, P. van Sluis, D. Troost, N. S. Meeteren, H. N. Caron, J. Cloos, A. Mrcic, B. Ylstra, W. Grajkowska, W. Hartmann, T. Pietsch, D. Ellison, S. C. Clifford and R. Versteeg (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* **3**(8): e3088.
- Kovacs, J. J., E. J. Whalen, R. Liu, K. Xiao, J. Kim, M. Chen, J. Wang, W. Chen and R. J. Lefkowitz (2008). Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science* **320**(5884): 1777-1781.

- Krauss, S., J. P. Concordet and P. W. Ingham (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* **75**(7): 1431-1444.
- Kubo, M., M. Nakamura, A. Tasaki, N. Yamanaka, H. Nakashima, M. Nomura, S. Kuroki and M. Katano (2004). Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* **64**(17): 6071-6074.
- Lacarrubba, F., M. C. Potenza, S. Gurgone and G. Micali (2011). Successful treatment and management of large superficial basal cell carcinomas with topical imiquimod 5% cream: a case series and review. *J Dermatolog Treat* **22**(6): 353-358.
- Lai, K., B. K. Kaspar, F. H. Gage and D. V. Schaffer (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci* **6**(1): 21-27.
- Lam, C. W., J. Xie, K. F. To, H. K. Ng, K. C. Lee, N. W. Yuen, P. L. Lim, L. Y. Chan, S. F. Tong and F. McCormick (1999). A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* **18**(3): 833-836.
- Lauth, M., A. Bergstrom, T. Shimokawa and R. Toftgard (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(20): 8455-8460.
- Lee, J. J., S. C. Ekker, D. P. von Kessler, J. A. Porter, B. I. Sun and P. A. Beachy (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* **266**(5190): 1528-1537.
- Lee, J. J., D. P. von Kessler, S. Parks and P. A. Beachy (1992). Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* **71**(1): 33-50.
- Lee, Y., H. L. Miller, H. R. Russell, K. Boyd, T. Curran and P. J. McKinnon (2006). Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res* **66**(14): 6964-6971.
- Lewis, P. M., M. P. Dunn, J. A. McMahon, M. Logan, J. F. Martin, B. St-Jacques and A. P. McMahon (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**(5): 599-612.
- Li, B., D. L. Fei, C. A. Flaveny, N. Dahmane, V. Baubet, Z. Wang, F. Bai, X. H. Pei, J. Rodriguez-Blanco, B. Hang, D. Orton, L. Han, B. Wang, A. J. Capobianco, E. Lee and D. J. Robbins (2014). Pyrvinium attenuates Hedgehog signaling downstream of smoothed. *Cancer Res* **74**(17): 4811-4821.
- Li, C., S. Chi and J. Xie (2011). Hedgehog signaling in skin cancers. *Cell Signal* **23**(8): 1235-1243.
- Li, J. J., V. Shanmugasundaram, S. Reddy, L. L. Fleischer, Z. Wang, Y. Smith, W. G. Harter, W. S. Yue, M. Swaroop, L. Li, C. X. Ji, D. Dettling, B. Osak, L. R. Fitzgerald and R. Conradi (2010). Smoothed antagonists for hair inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **20**(16): 4932-4935.
- Li, S., Y. Chen, Q. Shi, T. Yue, B. Wang and J. Jiang (2012). Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothed trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS Biol* **10**(1): e1001239.
- Li, Y., H. Zhang, Y. Litingtung and C. Chiang (2006). Cholesterol modification restricts the spread of Shh gradient in the limb bud. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(17): 6548-6553.
- Lin, T. L. and W. Matsui (2012). Hedgehog pathway as a drug target: Smoothed inhibitors in development. *Onco Targets Ther* **5**: 47-58.
- Lindstrom, E., T. Shimokawa, R. Toftgard and P. G. Zaphiropoulos (2006). PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat* **27**(3): 215-219.

- Liu, S., G. Dontu, I. D. Mantle, S. Patel, N. S. Ahn, K. W. Jackson, P. Suri and M. S. Wicha (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* **66**(12): 6063-6071.
- Loulier, K., M. Ruat and E. Traiffort (2006). Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *J Neurochem* **98**(2): 530-542.
- Louvi, A. and E. A. Grove (2011). Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* **69**(6): 1046-1060.
- Low, W. C., C. Wang, Y. Pan, X. Y. Huang, J. K. Chen and B. Wang (2008). The decoupling of Smoothed from Gα_q proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Dev Biol* **321**(1): 188-196.
- Lu, Q. R., T. Sun, Z. Zhu, N. Ma, M. Garcia, C. D. Stiles and D. H. Rowitch (2002). Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* **109**(1): 75-86.
- Lu, Q. R., D. Yuk, J. A. Alberta, Z. Zhu, I. Pawlitzky, J. Chan, A. P. McMahon, C. D. Stiles and D. H. Rowitch (2000). Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**(2): 317-329.
- Ma, Y., A. Erkner, R. Gong, S. Yao, J. Taipale, K. Basler and P. A. Beachy (2002). Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of Dispatched. *Cell* **111**(1): 63-75.
- Machold, R., S. Hayashi, M. Rutlin, M. D. Muzumdar, S. Nery, J. G. Corbin, A. Gritli-Linde, T. Dellovade, J. A. Porter, L. L. Rubin, H. Dudek, A. P. McMahon and G. Fishell (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**(6): 937-950.
- Manetti, F., H. Faure, H. Roudaut, T. Gorojankina, E. Traiffort, A. Schoenfelder, A. Mann, A. Solinas, M. Taddei and M. Ruat (2010). Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothed antagonists. *Mol Pharmacol* **78**(4): 658-665.
- Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**(4): 704-715.
- Mann, R. K. and P. A. Beachy (2004). Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem* **73**: 891-923.
- Mao, L., Y. P. Xia, Y. N. Zhou, R. L. Dai, X. Yang, S. J. Duan, X. Qiao, Y. W. Mei, B. Hu and H. Cui (2009). A critical role of Sonic Hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Cancer Sci* **100**(10): 1848-1855.
- Marigo, V., R. A. Davey, Y. Zuo, J. M. Cunningham and C. J. Tabin (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**(6605): 176-179.
- Marigo, V., D. J. Roberts, S. M. Lee, O. Tsukurov, T. Levi, J. M. Gastier, D. J. Epstein, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, C. E. Seidman and et al. (1995). Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog. *Genomics* **28**(1): 44-51.
- Masdeu, C., H. Faure, J. Coulombe, A. Schoenfelder, A. Mann, I. Brabet, J. P. Pin, E. Traiffort and M. Ruat (2006). Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothed to G15. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(2): 471-479.

- Matusek, T., F. Wendler, S. Poles, S. Pizette, G. D'Angelo, M. Furthauer and P. P. Therond (2014). The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature* 516(7529): 99-103.
- Maun, H. R., X. Wen, A. Lingel, F. J. de Sauvage, R. A. Lazarus, S. J. Scales and S. G. Hymowitz (2010). Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem* 285(34): 26570-26580.
- May, S. R., A. M. Ashique, M. Karlen, B. Wang, Y. Shen, K. Zarbalis, J. Reiter, J. Ericson and A. S. Peterson (2005). Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 287(2): 378-389.
- McLellan, J. S., S. Yao, X. Zheng, B. V. Geisbrecht, R. Ghirlando, P. A. Beachy and D. J. Leahy (2006). Structure of a heparin-dependent complex of Hedgehog and Ihog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17208-17213.
- McLellan, J. S., X. Zheng, G. Hauk, R. Ghirlando, P. A. Beachy and D. J. Leahy (2008). The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* 455(7215): 979-983.
- McMahon, A. P., P. W. Ingham and C. J. Tabin (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 53: 1-114.
- McMillan, R. and W. Matsui (2012). Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 18(18): 4883-4888.
- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, C. Yaschine, O. Gonzalez-Perez, D. Rowitch and A. Alvarez-Buylla (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26(30): 7907-7918.
- Merchant, A. A. and W. Matsui (2010). Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res* 16(12): 3130-3140.
- Mierzwa, A. J., G. M. Sullivan, L. A. Beer, S. Ahn and R. C. Armstrong (2014). Comparison of cortical and white matter traumatic brain injury models reveals differential effects in the subventricular zone and divergent Sonic hedgehog signaling pathways in neuroblasts and oligodendrocyte progenitors. *ASN Neuro* 6(5).
- Milic, D. and D. B. Veprintsev (2015). Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies. *Front Pharmacol* 6: 66.
- Milenkovic, L., M. P. Scott and R. Rohatgi (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *J Cell Biol* 187(3): 365-374.
- Mille, F., L. Tamayo-Orrego, M. Levesque, M. Remke, A. Korshunov, J. Cardin, N. Bouchard, L. Izzi, M. Kool, P. A. Northcott, M. D. Taylor, S. M. Pfister and F. Charron (2014). The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. *Dev Cell* 31(1): 34-47.
- Mille, F., C. Thibert, J. Fombonne, N. Rama, C. Guix, H. Hayashi, V. Corset, J. C. Reed and P. Mehlen (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 11(6): 739-746.
- Miyano, K., Y. Sudo, A. Yokoyama, K. Hisaoka-Nakashima, N. Morioka, M. Takebayashi, Y. Nakata, Y. Higami and Y. Uezono (2014). History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. *J Pharmacol Sci* 126(4): 302-309.
- Monje, M., S. S. Mitra, M. E. Freret, T. B. Ravesh, J. Kim, M. Masek, J. L. Attema, G. Li, T. Haddix, M. S. Edwards, P. G. Fisher, I. L. Weissman, D. H. Rowitch, H. Vogel, A. J. Wong and P. A. Beachy (2011). Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(11): 4453-4458.
- Mukherjee, S., N. Frolova, A. Sadlonova, Z. Novak, A. Steg, G. P. Page, D. R. Welch, S. M. Lobo-Ruppert, J. M. Ruppert, M. R. Johnson and A. R. Frost (2006). Hedgehog

- signaling and response to cyclopamine differ in epithelial and stromal cells in benign breast and breast cancer. *Cancer Biol Ther* **5**(6): 674-683.
- Myers, B. R., N. Sever, Y. C. Chong, J. Kim, J. D. Belani, S. Rychnovsky, J. F. Bazan and P. A. Beachy (2013). Hedgehog pathway modulation by multiple lipid binding sites on the smoothed effector of signal response. *Dev Cell* **26**(4): 346-357.
- Nachtergaele, S., L. K. Mydock, K. Krishnan, J. Rammohan, P. H. Schlesinger, D. F. Covey and R. Rohatgi (2012). Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothened. *Nat Chem Biol* **8**(2): 211-220.
- Nachtergaele, S., D. M. Whalen, L. K. Mydock, Z. Zhao, T. Malinauskas, K. Krishnan, P. W. Ingham, D. F. Covey, C. Siebold and R. Rohatgi (2013). Structure and function of the Smoothened extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *Elife* **2**: e01340.
- Nedelcu, D., J. Liu, Y. Xu, C. Jao and A. Salic (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothened in Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* **9**(9): 557-564.
- Nery, S., H. Wichterle and G. Fishell (2001). Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development* **128**(4): 527-540.
- Ng, J. M. and T. Curran (2011). The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer* **11**(7): 493-501.
- Northcott, P. A., L. A. Fernandez, J. P. Hagan, D. W. Ellison, W. Grajkowska, Y. Gillespie, R. Grundy, T. Van Meter, J. T. Rutka, C. M. Croce, A. M. Kenney and M. D. Taylor (2009). The miR-17/92 polycistron is up-regulated in sonic hedgehog-driven medulloblastomas and induced by N-myc in sonic hedgehog-treated cerebellar neural precursors. *Cancer Res* **69**(8): 3249-3255.
- Northcott, P. A., D. J. Shih, J. Peacock, L. Garzia, A. S. Morrissy, T. Zichner, A. M. Stutz, A. Korshunov, J. Reimand, S. E. Schumacher, R. Beroukhi, D. W. Ellison, C. R. Marshall, A. C. Lionel, S. Mack, A. Dubuc, Y. Yao, V. Ramaswamy, B. Luu, A. Rolider, F. M. Cavalli, X. Wang, M. Remke, X. Wu, R. Y. Chiu, A. Chu, E. Chuah, R. D. Corbett, G. R. Hoad, S. D. Jackman, Y. Li, A. Lo, K. L. Mungall, K. M. Nip, J. Q. Qian, A. G. Raymond, N. T. Thiessen, R. J. Varhol, I. Birol, R. A. Moore, A. J. Mungall, R. Holt, D. Kawauchi, M. F. Roussel, M. Kool, D. T. Jones, H. Witt, L. A. Fernandez, A. M. Kenney, R. J. Wechsler-Reya, P. Dirks, T. Aviv, W. A. Grajkowska, M. Perek-Polnik, C. C. Haberler, O. Delattre, S. S. Reynaud, F. F. Doz, S. S. Pernet-Fattet, B. K. Cho, S. K. Kim, K. C. Wang, W. Scheurlen, C. G. Eberhart, M. Fevre-Montange, A. Jouvét, I. F. Pollack, X. Fan, K. M. Muraszko, G. Y. Gillespie, C. Di Rocco, L. Massimi, E. M. Michiels, N. K. Kloosterhof, P. J. French, J. M. Kros, J. M. Olson, R. G. Ellenbogen, K. Zitterbart, L. Kren, R. C. Thompson, M. K. Cooper, B. Lach, R. E. McLendon, D. D. Bigner, A. Fontebasso, S. Albrecht, N. Jabado, J. C. Lindsey, S. Bailey, N. Gupta, W. A. Weiss, L. Bogner, A. Klekner, T. E. Van Meter, T. Kumabe, T. Tominaga, S. K. Elbabaa, J. R. Leonard, J. B. Rubin, L. M. Liau, E. G. Van Meir, M. Fouladi, H. Nakamura, G. Cinalli, M. Garami, P. Hauser, A. G. Saad, A. Iolascon, S. Jung, C. G. Carlotti, R. Vibhakar, Y. S. Ra, S. Robinson, M. Zollo, C. C. Faria, J. A. Chan, M. L. Levy, P. H. Sorensen, M. Meyerson, S. L. Pomeroy, Y. J. Cho, G. D. Bader, U. Tabori, C. E. Hawkins, E. Bouffet, S. W. Scherer, J. T. Rutka, D. Malkin, S. C. Clifford, S. J. Jones, J. O. Korbel, S. M. Pfister, M. A. Marra and M. D. Taylor (2012). Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* **488**(7409): 49-56.
- Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**(5785): 795-801.
- Ogden, S. K., D. L. Fei, N. S. Schilling, Y. F. Ahmed, J. Hwa and D. J. Robbins (2008). G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature* **456**(7224): 967-970.

- Okada, A., F. Charron, S. Morin, D. S. Shin, K. Wong, P. J. Fabre, M. Tessier-Lavigne and S. K. McConnell (2006). Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* **444**(7117): 369-373.
- Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M. A. Goldgraben, M. E. Caldwell, D. Allard, K. K. Frese, G. Denicola, C. Feig, C. Combs, S. P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W. J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Ruckert, R. Grutzmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S. R. Hingorani, P. Huang, S. E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R. H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths and D. A. Tuveson (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**(5933): 1457-1461.
- Orentas, D. M., J. E. Hayes, K. L. Dyer and R. H. Miller (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **126**(11): 2419-2429.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**(5480): 739-745.
- Palma, V., D. A. Lim, N. Dahmane, P. Sanchez, T. C. Brionne, C. D. Herzberg, Y. Gitton, A. Carleton, A. Alvarez-Buylla and A. Ruiz i Altaba (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**(2): 335-344.
- Pan, S., X. Wu, J. Jiang, W. Gao, Y. Wan, D. Cheng, D. Han, J. Liu, N. P. Englund, Y. Wang, S. Peukert, K. Miller-Moslin, J. Yuan, R. Guo, M. Matsumoto, A. Vattay, Y. Jiang, J. Tsao, F. Sun, A. C. Pferdekamper, S. Dodd, T. Tuntland, W. Maniara, J. F. Kelleher, Y.-m. Yao, M. Warmuth, J. Williams and M. Dorsch (2010). Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**(3): 130-134.
- Pan, Y., C. Wang and B. Wang (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Dev Biol* **326**(1): 177-189.
- Panakova, D., H. Sprong, E. Marois, C. Thiele and S. Eaton (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**(7038): 58-65.
- Pandolfi, S. and B. Stecca (2015). Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* **17**: e5.
- Park, J. H., P. Scheerer, K. P. Hofmann, H. W. Choe and O. P. Ernst (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**(7201): 183-187.
- Pascual, O., E. Traiffort, D. P. Baker, A. Galdes, M. Ruat and J. Champagnat (2005). Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *Eur J Neurosci* **22**(2): 389-396.
- Pazzaglia, S., M. Mancuso, M. J. Atkinson, M. Tanori, S. Rebessi, V. D. Majo, V. Covelli, H. Hahn and A. Saran (2002). High incidence of medulloblastoma following X-ray-irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice. *Oncogene* **21**(49): 7580-7584.
- Peacock, C. D., Q. Wang, G. S. Gesell, I. M. Corcoran-Schwartz, E. Jones, J. Kim, W. L. Devereux, J. T. Rhodes, C. A. Huff, P. A. Beachy, D. N. Watkins and W. Matsui (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4048-4053.
- Peng, L. F., B. Z. Stanton, N. Maloof, X. Wang and S. L. Schreiber (2009). Syntheses of aminoalcohol-derived macrocycles leading to a small-molecule binder to and inhibitor of Sonic Hedgehog. *Bioorg Med Chem Lett* **19**(22): 6319-6325.

- Pepinsky, R. B., C. Zeng, D. Wen, P. Rayhorn, D. P. Baker, K. P. Williams, S. A. Bixler, C. M. Ambrose, E. A. Garber, K. Miatkowski, F. R. Taylor, E. A. Wang and A. Galdes (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* **273**(22): 14037-14045.
- Pereira Dias, G., R. Hollywood, M. C. Bevilacqua, A. C. da Luz, R. Hindges, A. E. Nardi and S. Thuret (2014). Consequences of cancer treatments on adult hippocampal neurogenesis: implications for cognitive function and depressive symptoms. *Neuro Oncol* **16**(4): 476-492.
- Petrova, R., A. D. Garcia and A. L. Joyner (2013). Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte functions. *J Neurosci* **33**(44): 17490-17505.
- Peukert, S., F. He, M. Dai, R. Zhang, Y. Sun, K. Miller-Moslin, M. McEwan, B. Lagu, K. Wang, N. Yusuff, A. Bourret, A. Ramamurthy, W. Maniara, A. Amaral, A. Vattay, A. Wang, R. Guo, J. Yuan, J. Green, J. Williams, S. Buonamici, J. F. Kelleher, 3rd and M. Dorsch (2013). Discovery of NVP-LEQ506, a second-generation inhibitor of smoothened. *ChemMedChem* **8**(8): 1261-1265.
- Peukert, S. and K. Miller-Moslin (2010). Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *ChemMedChem* **5**(4): 500-512.
- Po, A., E. Ferretti, E. Miele, E. De Smaele, A. Paganelli, G. Canettieri, S. Coni, L. Di Marcotullio, M. Biffoni, L. Massimi, C. Di Rocco, I. Screpanti and A. Gulino (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J* **29**(15): 2646-2658.
- Polizio, A. H., P. Chinchilla, X. Chen, S. Kim, D. R. Manning and N. A. Riobo (2011). Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem* **286**(22): 19589-19596.
- Polizio, A. H., P. Chinchilla, X. Chen, D. R. Manning and N. A. Riobo (2011). Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothened to Gi proteins. *Sci Signal* **4**(200): pt7.
- Poncet, C., C. Soula, F. Trousse, P. Kan, E. Hirsinger, O. Pourquie, A. M. Duprat and P. Cochard (1996). Induction of oligodendrocyte progenitors in the trunk neural tube by ventralizing signals: effects of notochord and floor plate grafts, and of sonic hedgehog. *Mech Dev* **60**(1): 13-32.
- Porter, F. D. and G. E. Herman (2011). Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J Lipid Res* **52**(1): 6-34.
- Porter, J. A., S. C. Ekker, W. J. Park, D. P. von Kessler, K. E. Young, C. H. Chen, Y. Ma, A. S. Woods, R. J. Cotter, E. V. Koonin and P. A. Beachy (1996). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* **86**(1): 21-34.
- Porter, J. A., K. E. Young and P. A. Beachy (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* **274**(5285): 255-259.
- Pringle, N. P., W. P. Yu, S. Guthrie, H. Roelink, A. Lumsden, A. C. Peterson and W. D. Richardson (1996). Determination of neuroepithelial cell fate: induction of the oligodendrocyte lineage by ventral midline cells and sonic hedgehog. *Dev Biol* **177**(1): 30-42.
- Proctor, A. E., L. A. Thompson and C. L. O'Bryant (2014). Vismodegib: an inhibitor of the Hedgehog signaling pathway in the treatment of basal cell carcinoma. *Ann Pharmacother* **48**(1): 99-106.
- Putoux, A., S. Thomas, K. L. Coene, E. E. Davis, Y. Alanay, G. Ogur, E. Uz, D. Buzas, C. Gomes, S. Patrier, C. L. Bennett, N. Elkhartoufi, M. H. Frison, L. Rigonnot, N. Joye, S. Pruvost, G. E. Utine, K. Boduroglu, P. Nitschke, L. Fertitta, C. Thauvin-Robinet, A.

- Munnich, V. Cormier-Daire, R. Hennekam, E. Colin, N. A. Akarsu, C. Bole-Feysot, N. Cagnard, A. Schmitt, N. Goudin, S. Lyonnet, F. Encha-Razavi, J. P. Siffroi, M. Winey, N. Katsanis, M. Gonzales, M. Vekemans, P. L. Beales and T. Attie-Bitach (2011). KIF7 mutations cause fetal hydroletharus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet* **43**(6): 601-606.
- Rabadan, M. A., J. Cayuso, G. Le Dreau, C. Cruz, M. Barzi, S. Pons, J. Briscoe and E. Marti (2012). Jagged2 controls the generation of motor neuron and oligodendrocyte progenitors in the ventral spinal cord. *Cell Death Differ* **19**(2): 209-219.
- Rana, R., C. E. Carroll, H. J. Lee, J. Bao, S. Marada, C. R. Grace, C. D. Guibao, S. K. Ogden and J. J. Zheng (2013). Structural insights into the role of the Smoothed cysteine-rich domain in Hedgehog signalling. *Nat Commun* **4**: 2965-2974.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. Schertler, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **450**(7168): 383-387.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor. *Nature* **469**(7329): 175-180.
- Razumilava, N., S. A. Gradilone, R. L. Smoot, J. C. Mertens, S. F. Bronk, A. E. Sirica and G. J. Gores (2014). Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **60**(3): 599-605.
- Reifenberger, J., M. Wolter, C. B. Knobbe, B. Kohler, A. Schonicke, C. Scharwachter, K. Kumar, B. Blaschke, T. Ruzicka and G. Reifenberger (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* **152**(1): 43-51.
- Reifenberger, J., M. Wolter, R. G. Weber, M. Megahed, T. Ruzicka, P. Lichter and G. Reifenberger (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* **58**(9): 1798-1803.
- Reilly, J. O., I. D. Karavanova, K. P. Williams, N. K. Mahanthappa and K. L. Allendoerfer (2002). Cooperative effects of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons. *Mol Cell Neurosci* **19**(1): 88-96.
- Riddle, R. D., R. L. Johnson, E. Laufer and C. Tabin (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* **75**(7): 1401-1416.
- Riobo, N. A. (2015). Canonical and non-canonical Hedgehog signaling pathways: role of G proteins. *Topics in Medicinal Chemistry*.
- Robinson, G., M. Parker, T. A. Kranenburg, C. Lu, X. Chen, L. Ding, T. N. Phoenix, E. Hedlund, L. Wei, X. Zhu, N. Chalhoub, S. J. Baker, R. Huether, R. Kriwacki, N. Curley, R. Thiruvankatam, J. Wang, G. Wu, M. Rusch, X. Hong, J. Becksfort, P. Gupta, J. Ma, J. Easton, B. Vadodaria, A. Onar-Thomas, T. Lin, S. Li, S. Pounds, S. Paugh, D. Zhao, D. Kawauchi, M. F. Roussel, D. Finkelstein, D. W. Ellison, C. C. Lau, E. Bouffet, T. Hassall, S. Gururangan, R. Cohn, R. S. Fulton, L. L. Fulton, D. J. Dooling, K. Ochoa, A. Gajjar, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing, J. Zhang and R. J. Gilbertson (2012). Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* **488**(7409): 43-48.
- Roelink, H., A. Augsburger, J. Heemskerk, V. Korzh, S. Norlin, A. Ruiz i Altaba, Y. Tanabe, M. Placzek, T. Edlund, T. M. Jessell and et al. (1994). Floor plate and motor neuron

- induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* **76**(4): 761-775.
- Rognan, D. and I. Mus-Veteau (2015). Three-dimensional structure of the Smoothened receptor: Implications for drug discovery. *Topics in Medicinal Chemistry*.
- Rohatgi, R., L. Milenkovic, R. B. Corcoran and M. P. Scott (2009). Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3196-3201.
- Rohatgi, R., L. Milenkovic and M. P. Scott (2007). Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**(5836): 372-376.
- Romer, J. and T. Curran (2005). Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res* **65**(12): 4975-4978.
- Romer, J. T., H. Kimura, S. Magdaleno, K. Sasai, C. Fuller, H. Baines, M. Connelly, C. F. Stewart, S. Gould, L. L. Rubin and T. Curran (2004). Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* **6**(3): 229-240.
- Rominger, C. M., W. L. Bee, R. A. Copeland, E. A. Davenport, A. Gilmartin, R. Gontarek, K. R. Hornberger, L. A. Kallal, Z. Lai, K. Lawrie, Q. Lu, L. McMillan, M. Truong, P. J. Tummino, B. Turunen, M. Will, W. J. Zuercher and D. H. Rominger (2009). Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothened receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **329**(3): 995-1005.
- Rondard, P. and J. P. Pin (2015). Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Pharmacol* **20**: 95-101.
- Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, M. A. Hanson, S. G. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H. J. Choi, X. J. Yao, W. I. Weis, R. C. Stevens and B. K. Kobilka (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science* **318**(5854): 1266-1273.
- Rosenbaum, D. M., C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. Rasmussen, H. J. Choi, B. T. Devree, R. K. Sunahara, P. S. Chae, S. H. Gellman, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, M. Caffrey, P. Gmeiner and B. K. Kobilka (2011). Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex. *Nature* **469**(7329): 236-240.
- Roudaut, H., E. Traiffort, T. Gorojankina, L. Vincent, H. Faure, A. Schoenfelder, A. Mann, F. Manetti, A. Solinas, M. Taddei and M. Ruat (2011). Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent Smoothened antagonist. *Mol Pharmacol* **79**(3): 453-460.
- Ruat, M., H. Faure and M. Daynac (2015). Smoothened, stem cell maintenance and brain diseases. *Topics in Medicinal Chemistry*.
- Ruat, M. and L. Hoch (2015). Smoothened inhibitors in cancer. *Topics in Medicinal Chemistry*.
- Ruat, M., L. Hoch, H. Faure and D. Rognan (2013). [Structure of the Smoothened receptor]. *Med Sci (Paris)* **29**(10): 855-860.
- Ruat, M., L. Hoch, H. Faure and D. Rognan (2014). Targeting of Smoothened for therapeutic gain. *Trends Pharmacol Sci* **35**(5): 237-246.
- Ruat, M. and C. Petrel (2004). New insights into the pharmacology of the extracellular calcium sensing receptor. *Med Sci (Paris)* **20**(11): 980-985.
- Ruat, M., H. Roudaut, J. Ferent and E. Traiffort (2012). Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation* **83**(2): S97-S104.
- Rubin, J. B., Y. Choi and R. A. Segal (2002). Cerebellar proteoglycans regulate sonic hedgehog responses during development. *Development* **129**(9): 2223-2232.

- Rudin, C. M., C. L. Hann, J. Laterra, R. L. Yauch, C. A. Callahan, L. Fu, T. Holcomb, J. Stinson, S. E. Gould, B. Coleman, P. M. LoRusso, D. D. Von Hoff, F. J. de Sauvage and J. A. Low (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* **361**(12): 1173-1178.
- Ruiz i Altaba, A., C. Mas and B. Stecca (2007). The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* **17**(9): 438-447.
- Rush, S. Z., T. W. Abel, J. G. Valadez, M. Pearson and M. K. Cooper (2010). Activation of the Hedgehog pathway in pilocytic astrocytomas. *Neuro Oncol* **12**(8): 790-798.
- Sanchez, P., A. M. Hernandez, B. Stecca, A. J. Kahler, A. M. DeGueme, A. Barrett, M. Beyna, M. W. Datta, S. Datta and A. Ruiz i Altaba (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(34): 12561-12566.
- Sanders, T. A., E. Llagostera and M. Barna (2013). Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* **497**(7451): 628-632.
- Scales, S. J. and F. J. de Sauvage (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**(6): 303-312.
- Seifert, K., A. Buttner, S. Rigol, N. Eilert, E. Wandel and A. Giannis (2012). Potent small molecule Hedgehog agonists induce VEGF expression in vitro. *Bioorg Med Chem* **20**(21): 6465-6481.
- Sharpe, H. J., G. Pau, G. J. Dijkgraaf, N. Basset-Seguín, Z. Modrusan, T. Januario, V. Tsui, A. B. Durham, A. A. Dlugosz, P. M. Haverly, R. Bourgon, J. Y. Tang, K. Y. Sarin, L. Dirix, D. C. Fisher, C. M. Rudin, H. Sofen, M. R. Migden, R. L. Yauch and F. J. de Sauvage (2015). Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in Basal cell carcinoma. *Cancer Cell* **27**(3): 327-341.
- Sharpe, H. J., W. Wang, R. N. Hannoush and F. J. de Sauvage (2015). Regulation of the oncoprotein Smoothed by small molecules. *Nat Chem Biol* **11**(4): 246-255.
- Shaw-Smith, C. (2010). Genetic factors in esophageal atresia, tracheo-esophageal fistula and the VACTERL association: roles for FOXF1 and the 16q24.1 FOX transcription factor gene cluster, and review of the literature. *Eur J Med Genet* **53**(1): 6-13.
- Shen, F., L. Cheng, A. E. Douglas, N. A. Riobo and D. R. Manning (2013). Smoothed is a fully competent activator of the heterotrimeric G protein G(i). *Mol Pharmacol* **83**(3): 691-697.
- Sheng, H., S. Goich, A. Wang, M. Grachtchouk, L. Lowe, R. Mo, K. Lin, F. J. de Sauvage, H. Sasaki, C. C. Hui and A. A. Dlugosz (2002). Dissecting the oncogenic potential of Gli2: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype. *Cancer Res* **62**(18): 5308-5316.
- Shi, D., X. Lv, Z. Zhang, X. Yang, Z. Zhou, L. Zhang and Y. Zhao (2013). Smoothed oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high hedgehog activity transduction. *J Biol Chem* **288**(18): 12605-12614.
- Shi, Q., S. Li, J. Jia and J. Jiang (2011). The Hedgehog-induced Smoothed conformational switch assembles a signaling complex that activates Fused by promoting its dimerization and phosphorylation. *Development* **138**(19): 4219-4231.
- Shinozaki, S., H. Ohnishi, K. Hama, H. Kita, H. Yamamoto, H. Osawa, K. Sato, K. Tamada, H. Mashima and K. Sugano (2008). Indian hedgehog promotes the migration of rat activated pancreatic stellate cells by increasing membrane type-1 matrix metalloproteinase on the plasma membrane. *J Cell Physiol* **216**(1): 38-46.
- Sicklick, J. K., Y. X. Li, A. Jayaraman, R. Kannangai, Y. Qi, P. Vivekanandan, J. W. Ludlow, K. Owzar, W. Chen, M. S. Torbenson and A. M. Diehl (2006). Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**(4): 748-757.

- Silva-Vargas, V., E. E. Crouch and F. Doetsch (2013). Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Curr Opin Neurobiol* **23**(6): 935-942.
- Simpson, F., M. C. Kerr and C. Wicking (2009). Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev* **126**(5-6): 279-288.
- Sims-Mourtada, J., J. G. Izzo, J. Ajani and K. S. Chao (2007). Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene* **26**(38): 5674-5679.
- Sinha, S. and J. K. Chen (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nat Chem Biol* **2**(1): 29-30.
- Sirko, S., G. Behrendt, P. A. Johansson, P. Tripathi, M. Costa, S. Bek, C. Heinrich, S. Tiedt, D. Colak, M. Dichgans, I. R. Fischer, N. Plesnila, M. Staufenbiel, C. Haass, M. Snaryan, A. Saghatelian, L. H. Tsai, A. Fischer, K. Grobe, L. Dimou and M. Gotz (2013). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell* **12**(4): 426-439.
- Skvara, H., F. Kalthoff, J. G. Meingassner, B. Wolff-Winiski, H. Aschauer, J. F. Kelleher, X. Wu, S. Pan, L. Mickel, C. Schuster, G. Stary, A. Jalili, O. J. David, C. Emotte, A. M. Antunes, K. Rose, J. Decker, I. Carlson, H. Gardner, A. Stuetz, A. P. Bertolino, G. Stingl and M. A. De Rie (2011). Topical treatment of Basal cell carcinomas in nevoid Basal cell carcinoma syndrome with a smoothed inhibitor. *J Invest Dermatol* **131**(8): 1735-1744.
- Stanton, B. Z., L. F. Peng, N. Maloof, K. Nakai, X. Wang, J. L. Duffner, K. M. Taveras, J. M. Hyman, S. W. Lee, A. N. Koehler, J. K. Chen, J. L. Fox, A. Mandinova and S. L. Schreiber (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* **5**(3): 154-156.
- Stecca, B., C. Mas, V. Clement, M. Zbinden, R. Correa, V. Pigué, F. Beermann and I. A. A. Ruiz (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5895-5900.
- Stone, D. M., M. Hynes, M. Armanini, T. A. Swanson, Q. Gu, R. L. Johnson, M. P. Scott, D. Pennica, A. Goddard, H. Phillips, M. Noll, J. E. Hooper, F. de Sauvage and A. Rosenthal (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**(6605): 129-134.
- Strahle, U., N. Fischer and P. Blader (1997). Expression and regulation of a netrin homologue in the zebrafish embryo. *Mech Dev* **62**(2): 147-160.
- Strutt, H., C. Thomas, Y. Nakano, D. Stark, B. Neave, A. M. Taylor and P. W. Ingham (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* **11**(8): 608-613.
- Tabis, S. and O. Avci (2004). Induction of the differentiation and apoptosis of tumor cells in vivo with efficiency and selectivity. *Eur J Dermatol* **14**(2): 96-102.
- Taipale, J., J. K. Chen, M. K. Cooper, B. Wang, R. K. Mann, L. Milenkovic, M. P. Scott and P. A. Beachy (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**(6799): 1005-1009.
- Tang, J. Y., T. Z. Xiao, Y. Oda, K. S. Chang, E. Shpall, A. Wu, P. L. So, J. Hebert, D. Bikle and E. H. Epstein, Jr. (2011). Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)* **4**(5): 744-751.
- Tang, T., J. Y. Tang, D. Li, M. Reich, C. A. Callahan, L. Fu, R. L. Yauch, F. Wang, K. Kotkow, K. S. Chang, E. Shpall, A. Wu, L. L. Rubin, J. C. Marsters, Jr., E. H. Epstein, Jr., I. Caro and F. J. de Sauvage (2011). Targeting superficial or nodular Basal cell carcinoma with topically formulated small molecule inhibitor of smoothed. *Clin Cancer Res* **17**(10): 3378-3387.

- Tang, Y., S. Gholamin, S. Schubert, M. I. Willardson, A. Lee, P. Bandopadhyay, G. Bergthold, S. Masoud, B. Nguyen, N. Vue, B. Balansay, F. Yu, S. Oh, P. Woo, S. Chen, A. Ponnuswami, M. Monje, S. X. Atwood, R. J. Whitson, S. Mitra, S. H. Cheshier, J. Qi, R. Beroukhim, J. Y. Tang, R. Wechsler-Reya, A. E. Oro, B. A. Link, J. E. Bradner and Y. J. Cho (2014). Epigenetic targeting of Hedgehog pathway transcriptional output through BET bromodomain inhibition. *Nat Med* **20**(7): 732-740.
- Tao, H., Q. Jin, D. I. Koo, X. Liao, N. P. Englund, Y. Wang, A. Ramamurthy, P. G. Schultz, M. Dorsch, J. Kelleher and X. Wu (2011). Small molecule antagonists in distinct binding modes inhibit drug-resistant mutant of smoothened. *Chem Biol* **18**(4): 432-437.
- Tekki-Kessaris, N., R. Woodruff, A. C. Hall, W. Gaffield, S. Kimura, C. D. Stiles, D. H. Rowitch and W. D. Richardson (2001). Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* **128**(13): 2545-2554.
- Teperino, R., S. Amann, M. Bayer, S. L. McGee, A. Loipetzberger, T. Connor, C. Jaeger, B. Kammerer, L. Winter, G. Wiche, K. Dalgaard, M. Selvaraj, M. Gaster, R. S. Lee-Young, M. A. Febbraio, C. Knauf, P. D. Cani, F. Aberger, J. M. Penninger, J. A. Pospisilik and H. Esterbauer (2012). Hedgehog Partial Agonism Drives Warburg-like Metabolism in Muscle and Brown Fat. *Cell* **151**(2): 414-426.
- Thayer, S. P., M. P. di Magliano, P. W. Heiser, C. M. Nielsen, D. J. Roberts, G. Y. Lauwers, Y. P. Qi, S. Gysin, C. Fernandez-del Castillo, V. Yajnik, B. Antoniu, M. McMahon, A. L. Warshaw and M. Hebrok (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**(6960): 851-856.
- Therond, P. P. (2012). Release and transportation of Hedgehog molecules. *Curr Opin Cell Biol* **24**(2): 173-180.
- Thibert, C., M. A. Teillet, F. Lapointe, L. Mazelin, N. M. Le Douarin and P. Mehlen (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* **301**(5634): 843-846.
- Thompson, M. C., C. Fuller, T. L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C. C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D. M. Ashley, S. J. Kellie, M. D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar and R. J. Gilbertson (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* **24**(12): 1924-1931.
- Touahri, Y., N. Escalas, B. Benazerf, P. Cochard, C. Danesin and C. Soula (2012). Sulfatase 1 promotes the motor neuron-to-oligodendrocyte fate switch by activating Shh signaling in Olig2 progenitors of the embryonic ventral spinal cord. *J Neurosci* **32**(50): 18018-18034.
- Traiffort, E., D. Charytoniuk, L. Watroba, H. Faure, N. Sales and M. Ruat (1999). Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neuroscience* **11**: 3199-3214.
- Traiffort, E., D. A. Charytoniuk, H. Faure and M. Ruat (1998). Regional distribution of sonic hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem* **70**(3): 1327-1330.
- Traiffort, E., C. Dubourg, H. Faure, D. Rognan, S. Odent, M. R. Durou, V. David and M. Ruat (2004). Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J Biol Chem* **279**(41): 42889-42897.
- Tremblay, M. R., A. Lescarbeau, M. J. Grogan, E. Tan, G. Lin, B. C. Austad, L. C. Yu, M. L. Behnke, S. J. Nair, M. Hagel, K. White, J. Conley, J. D. Manna, T. M. Alvarez-Diez, J. Hoyt, C. N. Woodward, J. R. Sydor, M. Pink, J. MacDougall, M. J. Campbell, J. Cushing, J. Ferguson, M. S. Curtis, K. McGovern, M. A. Read, V. J. Palombella, J. Adams and A. C. Castro (2009). Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *J Med Chem* **52**(14): 4400-4418.

- Trousse, F., E. Marti, P. Gruss, M. Torres and P. Bovolenta (2001). Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* **128**(20): 3927-3936.
- Tsuboi, K. and C. W. Shults (2002). Intrastratial injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **173**(1): 95-104.
- Tukachinsky, H., R. P. Kuzmickas, C. Y. Jao, J. Liu and A. Salic (2012). Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep* **2**(2): 308-320.
- Valente, E. M., R. O. Rosti, E. Gibbs and J. G. Gleeson (2014). Primary cilia in neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol* **10**(1): 27-36.
- van den Brink, G. R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev* **87**(4): 1343-1375.
- Varnat, F., A. Duquet, M. Malerba, M. Zbinden, C. Mas, P. Gervaz and A. Ruiz i Altaba (2009). Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* **1**(6-7): 338-351.
- Von Hoff, D. D., P. M. LoRusso, C. M. Rudin, J. C. Reddy, R. L. Yauch, R. Tibes, G. J. Weiss, M. J. Borad, C. L. Hann, J. R. Brahmer, H. M. Mackey, B. L. Lum, W. C. Darbonne, J. C. Marsters, Jr., F. J. de Sauvage and J. A. Low (2009). Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **361**(12): 1164-1172.
- Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G. V. Segre, H. M. Kronenberg and C. J. Tabin (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein [see comments]. *Science* **273**(5275): 613-622.
- Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* **9**(8): 445-448.
- Wang, C., Y. Jiang, J. Ma, H. Wu, D. Wacker, V. Katritch, G. W. Han, W. Liu, X. P. Huang, E. Vardy, J. D. McCorvy, X. Gao, X. E. Zhou, K. Melcher, C. Zhang, F. Bai, H. Yang, L. Yang, H. Jiang, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens and H. E. Xu (2013). Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* **340**(6132): 610-614.
- Wang, C., H. Wu, T. Evron, E. Vardy, G. W. Han, X. P. Huang, S. J. Hufeisen, T. J. Mangano, D. J. Urban, V. Katritch, V. Cherezov, M. G. Caron, B. L. Roth and R. C. Stevens (2014). Structural basis for Smoothed receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nat Commun* **5**: 4355.
- Wang, C., H. Wu, V. Katritch, G. W. Han, X. P. Huang, W. Liu, F. Y. Siu, B. L. Roth, V. Cherezov and R. C. Stevens (2013). Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **497**(7449): 338-343.
- Wang, G. Y., J. Wang, M. L. Mancianti and E. H. Epstein, Jr. (2011). Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in *Ptch1*(+/-) mice. *Cancer Cell* **19**(1): 114-124.
- Wang, J., J. Lu, M. C. Bond, M. Chen, X. R. Ren, H. K. Lyerly, L. S. Barak and W. Chen (2010). Identification of select glucocorticoids as Smoothed agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(20): 9323-9328.
- Wang, Y., L. Davidow, A. C. Arvanites, J. Blanchard, K. Lam, K. Xu, V. Oza, J. W. Yoo, J. M. Ng, T. Curran, L. L. Rubin and A. P. McMahon (2012). Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity. *Chem Biol* **19**(8): 972-982.

- Wang, Y., Q. Ding, C. J. Yen, W. Xia, J. G. Izzo, J. Y. Lang, C. W. Li, J. L. Hsu, S. A. Miller, X. Wang, D. F. Lee, J. M. Hsu, L. Huo, A. M. Labaff, D. Liu, T. H. Huang, C. C. Lai, F. J. Tsai, W. C. Chang, C. H. Chen, T. T. Wu, N. S. Buttar, K. K. Wang, Y. Wu, H. Wang, J. Ajani and M. C. Hung (2012). The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* **21**(3): 374-387.
- Wang, Y., Z. Zhou, C. T. Walsh and A. P. McMahon (2009). Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2623-2628.
- Watkins, D. N., D. M. Berman, S. G. Burkholder, B. Wang, P. A. Beachy and S. B. Baylin (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**(6929): 313-317.
- Watts, J. M. and M. S. Tallman (2014). Acute promyelocytic leukemia: What is the new standard of care? *Blood Rev* **28**(5): 205-212.
- Wechsler-Reya, R. and M. P. Scott (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* **24**: 385-428.
- Wechsler-Reya, R. J. and M. Scott (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**: 103-114.
- Weierstall, U., D. James, C. Wang, T. A. White, D. Wang, W. Liu, J. C. Spence, R. Bruce Doak, G. Nelson, P. Fromme, R. Fromme, I. Grotjohann, C. Kupitz, N. A. Zatsepin, H. Liu, S. Basu, D. Wacker, G. W. Han, V. Katritch, S. Boutet, M. Messerschmidt, G. J. Williams, J. E. Koglin, M. Marvin Seibert, M. Klinker, C. Gati, R. L. Shoeman, A. Barty, H. N. Chapman, R. A. Kirian, K. R. Beyerlein, R. C. Stevens, D. Li, S. T. Shah, N. Howe, M. Caffrey and V. Cherezov (2014). Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography. *Nat Commun* **5**: 3309-3318.
- Wen, X., C. K. Lai, M. Evangelista, J. A. Hongo, F. J. de Sauvage and S. J. Scales (2010). Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Mol Cell Biol* **30**(8): 1910-1922.
- Wetmore, C., D. E. Eberhart and T. Curran (2000). The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer Res* **60**(8): 2239-2246.
- Wetmore, C., D. E. Eberhart and T. Curran (2001). Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Res* **61**(2): 513-516.
- Wijgerde, M., M. Ooms, J. W. Hoogerbrugge and J. A. Grootegoed (2005). Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. *Endocrinology* **146**(8): 3558-3566.
- Williams, C. H., J. E. Hempel, J. Hao, A. Y. Frist, M. M. Williams, J. T. Fleming, G. A. Sulikowski, M. K. Cooper, C. Chiang and C. C. Hong (2015). An in vivo chemical genetic screen identifies phosphodiesterase 4 as a pharmacological target for hedgehog signaling inhibition. *Cell Rep* **11**(1): 43-50.
- Williams, E. H., W. N. Pappano, A. M. Saunders, M. S. Kim, D. J. Leahy and P. A. Beachy (2010). Dally-like core protein and its mammalian homologues mediate stimulatory and inhibitory effects on Hedgehog signal response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(13): 5869-5874.
- Williams, J. A., O. M. Guicherit, B. I. Zaharian, Y. Xu, L. Chai, H. Wichterle, C. Kon, C. Gatchalian, J. A. Porter, L. L. Rubin and F. Y. Wang (2003). Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4616-4621.
- Williams, R. (2013). Discontinued drugs in 2012: oncology drugs. *Expert Opin Investig Drugs* **22**(12): 1627-1644.

- Wolff, F., A. Loipetzberger, W. Gruber, H. Esterbauer, F. Aberger and A. M. Frischauf (2013). Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation. *Oncogene* **32**(50): 5574-5581.
- Wong, S. Y., A. D. Seol, P. L. So, A. N. Ermilov, C. K. Bichakjian, E. H. Epstein, Jr., A. A. Dlugosz and J. F. Reiter (2009). Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat Med* **15**(9): 1055-1061.
- Wong, K., J. Ma, A. Rothnie, P. C. Biggin and I. D. Kerr (2014). Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem Sci* **39**(1): 8-16.
- Wu, B., E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov and R. C. Stevens (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* **330**(6007): 1066-1071.
- Wu, X., S. Ding, Q. Ding, N. S. Gray and P. G. Schultz (2002). A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J Am Chem Soc* **124**(49): 14520-14521.
- Wu, X., J. Walker, J. Zhang, S. Ding and P. G. Schultz (2004). Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chem Biol* **11**(9): 1229-1238.
- Xia, R., H. Jia, J. Fan, Y. Liu and J. Jia (2012). USP8 promotes smoothed signaling by preventing its ubiquitination and changing its subcellular localization. *PLoS Biol* **10**(1): e1001238.
- Xie, J., M. Murone, S. M. Luoh, A. Ryan, Q. Gu, C. Zhang, J. M. Bonifas, C. W. Lam, M. Hynes, A. Goddard, A. Rosenthal, E. H. Epstein, Jr. and F. J. de Sauvage (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* **391**(6662): 90-92.
- Xu, C., W. Zhang, P. Rondard, J. P. Pin and J. Liu (2014). Complex GABAB receptor complexes: how to generate multiple functionally distinct units from a single receptor. *Front Pharmacol* **5**: 12.
- Yam, P. T., C. B. Kent, S. Morin, W. T. Farmer, R. Alchini, L. Lepelletier, D. R. Colman, M. Tessier-Lavigne, A. E. Fournier and F. Charron (2012). 14-3-3 proteins regulate a cell-intrinsic switch from sonic hedgehog-mediated commissural axon attraction to repulsion after midline crossing. *Neuron* **76**(4): 735-749.
- Yam, P. T., S. D. Langlois, S. Morin and F. Charron (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**(3): 349-362.
- Yan, D. and X. Lin (2009). Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(3): a002493.
- Yan, D., Y. Wu, Y. Yang, T. Y. Belenkaya, X. Tang and X. Lin (2010). The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development. *Development* **137**(12): 2033-2044.
- Yang, C., W. Chen, Y. Chen and J. Jiang (2012). Smoothed transduces Hedgehog signal by forming a complex with Evc/Evc2. *Cell Res* **22**(11): 1593-1604.
- Yang, H., J. Xiang, N. Wang, Y. Zhao, J. Hyman, S. Li, J. Jiang, J. K. Chen, Z. Yang and S. Lin (2009). Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *J Biol Chem* **284**(31): 20876-20884.
- Yao, H. H., W. Whoriskey and B. Capel (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* **16**(11): 1433-1440.
- Yauch, R. L., G. J. Dijkgraaf, B. Aliche, T. Januario, C. P. Ahn, T. Holcomb, K. Pujara, J. Stinson, C. A. Callahan, T. Tang, J. F. Bazan, Z. Kan, S. Seshagiri, C. L. Hann, S. E.

- Gould, J. A. Low, C. M. Rudin and F. J. de Sauvage (2009). Smoothened Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor in Medulloblastoma. *Science* **326**: 572-574.
- Yauch, R. L., S. E. Gould, S. J. Scales, T. Tang, H. Tian, C. P. Ahn, D. Marshall, L. Fu, T. Januario, D. Kallop, M. Nannini-Pepe, K. Kotkow, J. C. Marsters, L. L. Rubin and F. J. de Sauvage (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**: 406-410.
- Yin, Y., F. Bangs, I. R. Paton, A. Prescott, J. James, M. G. Davey, P. Whitley, G. Genikhovich, U. Technau, D. W. Burt and C. Tickle (2009). The Talpid3 gene (KIAA0586) encodes a centrosomal protein that is essential for primary cilia formation. *Development* **136**(4): 655-664.
- Youssef, K. K., A. Van Keymeulen, G. Lapouge, B. Beck, C. Michaux, Y. Achouri, P. A. Sotiropoulou and C. Blanpain (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol* **12**(3): 299-305.
- Yuan, Z., J. A. Goetz, S. Singh, S. K. Ogden, W. J. Petty, C. C. Black, V. A. Memoli, E. Dmitrovsky and D. J. Robbins (2007). Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene* **26**(7): 1046-1055.
- Zeng, X., J. A. Goetz, L. M. Suber, W. J. Scott, Jr., C. M. Schreiner and D. J. Robbins (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* **411**(6838): 716-720.
- Zhang, X., N. Harrington, R. C. Moraes, M. F. Wu, S. G. Hilsenbeck and M. T. Lewis (2009). Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothened (Smo). *Breast Cancer Res Treat* **115**(3): 505-521.
- Zhao, C., A. Chen, C. H. Jamieson, M. Fereshteh, A. Abrahamsson, J. Blum, H. Y. Kwon, J. Kim, J. P. Chute, D. Rizzieri, M. Munchhof, T. VanArsdale, P. A. Beachy and T. Reya (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**(7239): 776-779.
- Zhao, Y., C. Tong and J. Jiang (2007). Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**(7167): 252-258.
- Zheng, X., R. K. Mann, N. Sever and P. A. Beachy (2010). Genetic and biochemical definition of the Hedgehog receptor. *Genes Dev* **24**(1): 57-71.
- Zhou, Q. and D. J. Anderson (2002). The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* **109**(1): 61-73.
- Zhou, Q., S. Wang and D. J. Anderson (2000). Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**(2): 331-343.

ABSTRACT

MOLECULAR AND PHARMACOLOGICAL STUDIES OF THE SMOOTHENED RECEPTOR

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays a critical role during embryogenesis and participates to the maintenance of neural stem cells in the adult brain (Ruat *et al*, 2015). Its activation requires the binding of a Hh peptide to its receptor Patched (Ptc) which represses the constitutive activity of Smoothened (Smo), a member of class F G-protein-coupled receptors (Wang *et al*, 2013). Deregulation of the Hh pathway is associated with the development of tumors, such as medulloblastoma and basal cell carcinoma. Agonists and antagonists of Smo are candidates for the treatment of degenerative diseases and Hh-linked tumors, respectively (Ruat and Hoch, 2015). Crystallization studies of human Smo (hSmo) bound to different ligands have identified two types of 7 transmembrane-directed antagonists: those binding mostly to extracellular loops (site 1, e.g., LY2940680) and those penetrating deeply in the 7-transmembrane cavity (site 2, e.g., SANT-1) (Ruat *et al*, 2014).

The present work allowed the characterization of the acylguanidine MRT-92, one of the most potent Smo antagonist. MRT-92 inhibits Smo induced-responses in different cell-based assays, notably the proliferation of rat cerebellar granule cell with nanomolar potency. We developed its tritiated derivative [³H]MRT-92 ($K_d= 0.3$ nM for hSmo) for creating a comprehensive framework for the interaction of small molecule modulators with hSmo and for understanding chemoresistance linked to hSmo mutations. MRT-92 binds to the mutated hSmoD473H receptor resistant to GDC-0449 treatment, suggesting its therapeutic interest for the treatment of this resistance. Guided by molecular docking and site-directed mutagenesis data, we demonstrated the existence of a third type of Smo antagonists represented by MRT-92 that simultaneously recognized and occupied both sites 1 and 2.

The development of a pharmacophoric model of Smo agonists allowed a virtual screening strategy to identify the GSA-10 compound, a quinolinecarboxamide. GSA-10 stimulates a non-canonical Hh pathway allowing C3H10T1/2 mesenchymal cells differentiation into osteoblasts. However, GSA-10 does not induce Gli-dependent reporter gene transcription nor rat cerebellar granule cell proliferation, and it does not regulate the subcellular localization of Smo at the primary cilium. Moreover, we observed that forskolin, a known activator of adenylate cyclase, is a positive and negative regulator of GSA-10 and SAG-mediated cell differentiation, respectively. Our data provide also evidences for two different conformational forms of Smo named Smo^{SAG} and Smo^{GSA-10}, which can be pharmacologically discriminated by Smo antagonists. Different antagonists including GDC-0449, CUR61414, Cyclopamine and MRT-92 loose their sensibility to inhibit Smo^{GSA-10}.

The present work allowed the identification of new pharmacological tools which should be useful for understanding the mechanisms underlying the resistance of Smo inhibitors in cancer cells and may help to design new therapies with improved pharmacological properties for treating Hh-linked brain tumors.

RÉSUMÉ

ÉTUDES MOLÉCULAIRES ET PHARMACOLOGIQUES DU RÉCEPTEUR SMOOTHENED

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire et participe au maintien des niches neurogéniques dans le cerveau adulte (Ruat *et al*, 2015). Son activation requiert la liaison d'un peptide Hh sur le récepteur Patched (Ptc) qui réprime l'activité constitutive de Smoothened (Smo), un membre de la classe F des récepteurs couplés aux protéines G (Wang *et al*, 2013). La dérégulation de la voie Hh peut conduire au développement de tumeurs, comme les médulloblastomes ou les carcinomes basocellulaires. Des agonistes et des antagonistes de Smo ont été développés et présentent un intérêt thérapeutique dans le traitement des maladies neurodégénératives et des tumeurs Hh-dépendantes, respectivement (Ruat and Hoch, 2015). Les études cristallographiques du Smo humain (hSmo) complexé à différents ligands ont identifié deux types d'antagonistes ; ceux se liant principalement aux boucles extracellulaires de Smo (site 1, comme le LY2940680) et ceux se liant plus profondément dans la cavité transmembranaire (site 2, comme le SANT-1) (Ruat *et al*, 2014).

Mes travaux de thèse ont conduit à la caractérisation du composé acylguanidine MRT-92, l'un des plus puissants antagonistes du récepteur Smo. Le MRT-92 inhibe différentes réponses biologiques induites par l'activation de la voie Hh, notamment la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet de rat avec une affinité sub-nanomolaire. Le MRT-92 bloque aussi la translocation de Smo dans le cil primaire induite par l'activation de la voie Hh. Le développement de sa forme tritiée [³H]MRT-92 ($K_d = 0.3$ nM pour hSmo) a permis d'étudier les interactions des modulateurs avec le récepteur hSmo et d'analyser les résistances associées aux mutations de hSmo. Le composé MRT-92 se lie au récepteur hSmoD473H, résistant au traitement par le GDC-0449, suggérant son intérêt thérapeutique pour le traitement de cette résistance. Par une modélisation moléculaire et une étude de mutagenèse, j'ai identifié que le MRT-92 se lie sur un nouveau site au niveau du domaine transmembranaire de Smo qui se superpose aux sites 1 et 2 préalablement décrits.

Le développement d'un modèle pharmacophorique des agonistes de Smo a permis le criblage virtuel d'une banque de molécules et l'identification du composé quinolone GSA-10. Le GSA-10 stimule une voie Hh non canonique qui permet la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes en se fixant au récepteur Smo. Contrairement au composé SAG, agoniste de référence de Smo, le GSA-10 n'induit pas de prolifération cellulaire des cellules granulaires du cervelet de rat et n'augmente pas la transcription des gènes cibles de la voie tels que *Gli1* et *Ptc*. Le GSA-10 est la première molécule agoniste de Smo qui n'induit pas sa translocation au cil primaire. De plus, nous avons observé que la forskoline, un inhibiteur de l'adénylate cyclase, est un régulateur positif et négatif de la différenciation ostéoblastique induite par le GSA-10 et le SAG, respectivement. Le GSA-10 nous a également permis de mettre en évidence deux formes conformationnelles de Smo, Smo^{SAG} et Smo^{GSA-10}, pouvant être discriminées pharmacologiquement par les antagonistes de Smo. Plusieurs antagonistes comme le GDC-0449, le CUR61414, la cyclopamine ou le MRT-92 perdent leur sensibilité pour inhiber le Smo^{GSA-10}.

L'ensemble de ce travail a conduit au développement de nouveaux outils pharmacologiques qui pourraient permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de l'activité du récepteur Smo et permettre le développement de nouvelles molécules en clinique pour le traitement des tumeurs du cerveau Hh-dépendantes.