



HAL
open science

Étude du mécanisme d'activation de la voie de signalisation canonique de Hedgehog chez la drosophile

Cécile Giordano

► **To cite this version:**

Cécile Giordano. Étude du mécanisme d'activation de la voie de signalisation canonique de Hedgehog chez la drosophile. Biologie cellulaire. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4131 . tel-01731304

HAL Id: tel-01731304

<https://theses.hal.science/tel-01731304>

Submitted on 14 Mar 2018

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 Côte d'Azur
UFR Sciences
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED85)

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de l'Université Côte d'Azur

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Mention : Interactions moléculaires et cellulaires

Présentée et soutenue par

Cécile Giordano

**Etude du mécanisme d'activation de la voie de signalisation
canonique de Hedgehog chez la drosophile**

Thèse dirigée par Dr Pascal Théron et Dr Laurent Ruel

Soutenue publiquement le 14 Décembre 2017 à 13h30 devant un jury composé de :

Anne Plessis	Professeur Uni. Paris Diderot	Président/Rapporteur
Alexandre Djiane	Chargé de Recherche	Rapporteur
Elisabeth Traiffort	Directeur de Recherche	Examineur
Laurent Ruel	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse
Pascal Théron	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, les docteurs Anne Plessis, Elisabeth Traiffort et Alexandre Djiane, d'avoir accepté de juger mon travail de doctorat, et spécialement les rapporteurs d'avoir lu et commenté mon manuscrit de thèse.

Un grand merci à Pascal, ou plus communément appelé « papi » (désolée Pascal, mais « papa » est déjà réservé) de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, moi petite master, et de m'avoir permis d'effectuer une thèse dans l'univers compliqué et fascinant de la voie Hedgehog. Grâce à toi, j'ai pu évoluer scientifiquement mais également humainement, j'ai appris énormément à tes côtés et je te remercie d'avoir supporté mes nombreuses crises de larmes ou de joie et d'être resté calme en toutes circonstances.

Quand on parle de supporter mes humeurs, la palme de la zénitude revient à mon « papa », Laurent. Laurent, je ne compte plus le nombre de fois où j'ai pleuré ou bien je me suis énervée parce que j'avais obtenu un résultat inattendu et que je ne savais pas comment l'interpréter. Tu as toujours été là pour me remonter le moral, pour guider mes recherches et tu as été d'une aide capitale quand il a fallu prendre la difficile décision de réorienter le projet. Comme l'a dit ta précédente étudiante, Dr Nadia Ranieri, « You are exactly as a scientist has to be ». En effet, tu es un maître de la biologie moléculaire et de la biochimie, tu sais exactement comment mener tes recherches avec cependant une absence totale de protocoles et une rigueur un peu approximative mais ça marche ! Je me rappellerai toujours de ta célèbre phrase : « une colonie c'est suffisant », et le pire, c'est que c'était souvent le cas. Merci à toi papa Laurent, j'espère que d'autres étudiants auront la chance de t'avoir comme encadrant afin de profiter de toutes tes qualités.

Même si j'adore surnommer Laurent, « papa Laurent », une autre façon de l'appeler au laboratoire est « Lolo boy » car il existe aussi une « lolo girl », Laurence. Ma petite Lolo avec un grand cœur, tu es toujours là pour chouchouter les thésards et nous aider à régler tous nos problèmes quel que soient leur nature. Merci à toi d'être la bonne fée du laboratoire et également merci d'avoir corrigé les fautes d'orthographe de mon manuscrit.

Je tiens à avoir un petit mot pour tous les anciens et actuels membres de mon équipe, en commençant par les étudiants en thèse, car pour une fois, nous pouvons bien avoir la première place. Raphaël, merci pour ta gentillesse et ton dévouement. Caterina, merci pour tes nombreux conseils, ton humanité et tes corrections de mon anglais incertain. En parlant de vérifier mon anglais, merci à toi Julien, et ne t'inquiète pas, tu tiens le bon bout avec ton projet. Enfin, merci Tanvi, tu es partie depuis plus d'un an, mais ton aura est encore au laboratoire, notamment durant les lab meeting de Tamas. Après les étudiants, je voudrais remercier les chercheurs de la team Hedgehog. Tamas, merci de ton aide pour la génétique, et également merci de m'avoir permis de collaborer avec Tanvi et toi. Et puisque j'ai évoqué une collaboration, je remercie également Andrew, le roi de la voie Hh chez la mouche adulte, avec qui j'ai coupé beaucoup de têtes !! Sandrine, tu arrives juste après le coupage de têtes car tu es « la revenante » au laboratoire. Merci de tes conseils pendant les lab meeting et de ta vivacité d'esprit pour faire les connexions entre les expériences et la bibliographie. Un ancien membre du laboratoire possédait également une rapidité de réflexion à tout épreuve, il s'agit évidemment de Gisela. Merci pour tout Gi, il faut souvent courir pour te suivre mais avec toi, j'ai appris énormément de choses, j'espère que nos chemins se recroiseront.

La particularité de notre équipe, et c'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle j'ai aimé faire ma thèse dans ce laboratoire, est de partager l'étage avec l'équipe de Pierre Léopold. Pierre, merci à toi de permettre une telle cohésion entre les deux équipes, cela permet aux étudiants d'évoluer dans un environnement scientifique très stimulant. Je tiens à remercier tous les membres de cette formidable

« team », et bien sûr priorité aux thésards. Merci Eleonora pour nos discussions enflammées, merci Derya d'avoir mis en place le « pizza club », et merci Emilie, ta maturité a été un réel exemple pour moi lorsque tu étais au laboratoire. Un énorme merci aux chercheurs de cette équipe en commençant par Nathalie. Nathalie, je te remercie pour ton soutien autant professionnel que privé, et merci d'avoir corrigé mes fautes d'orthographe. Marianne, merci de ta bonne humeur en toutes circonstances. Rénaud, merci de tes conseils, ta disponibilité, et ton talent pour la cuisine ! Ditte et Julien, vous êtes de vraies machines de guerre, et c'est toujours un plaisir d'échanger avec vous. Nuria, bien que tu sois assez discrète, tu es d'une perspicacité redoutable et tu poses toujours les questions qui permettent de faire avancer un projet. Marc, je pourrais presque te surnommer « papi » car tu es le « papa » de Laurent. Merci pour ta grande sagesse et également d'avoir supporté mes changements d'humeur, je te souhaite le meilleur pour ta retraite. Enfin un grand merci aux anciens et actuels « lab managers » de cette équipe Alessandra, Thomas et bien sûr Gisèle qui a toujours été présente pour coucouner les thésards.

Je remercie également toute la communauté des « fly people » pour les discussions scientifiques durant le fly meeting, mais aussi pour tous les bons moments passés ensemble dans ou en dehors du laboratoire.

Avant de parler de mes proches, je tiens à remercier les différentes personnes avec qui j'ai réalisé des stages. Merci aux docteurs Eric Boncompagni et Amandine Chassot de m'avoir fait découvrir la recherche. Un énorme merci à toi, Docteur Eric Duplan, tu as été un super encadrant pendant mon Master 1, et non, le projet n'est pas tombé à l'eau !

Je ne serai pas arrivée jusqu'ici sans le soutien de ma famille. Un grand merci à ma maman, à mon jumeau et à ma sœur de m'avoir toujours poussée à continuer plus loin, et ceux, malgré mes tendances à voir les choses négativement.

Merci à tous mes amis proches ou lointains, et en particulier, j'aimerais m'attarder sur deux amies très chères à mon cœur, Angéline et Lauriane. Angéline, toujours à me demander : « mais elles se terminent quand tes études ? », je vais enfin pouvoir te répondre que c'est la fin ! Quand j'évoque ton nom, je pense forcément à ta maman, qui était comme une deuxième mère pour moi. Angélique, tu es partie trop tôt en laissant un immense vide derrière toi, mais sache que tu nous as bien élevés et que, grâce à toi, nous formons une famille unie. Lauriane, ma rousse, et amie que j'ai rencontrée à la fac. Merci pour nos délires, nos séances de « révisions » avec des pauses-café interminables, et merci de m'avoir présenté ta famille qui est une famille en or. La prochaine, c'est toi... J'ai hâte d'assister à ta soutenance de thèse.

J'aimerais également remercier une personne, qui à vrai dire, est LA personne qui m'a permis de faire mes études, Cédric. On s'est connu, tu étais alors informaticien au collège où ma mère travaillait et moi, lycéenne. Depuis le temps a passé, et tu as toujours été là pour me soutenir. Notamment pour les schémas ô combien compliqués visant à représenter ce complexe de transduction, et même à ce jour, où tu t'es occupé de la mise en page de ce manuscrit de thèse. Je n'aurais jamais assez de mots pour te remercier, je te souhaite le meilleur pour la suite, et de toute façon, tu vas devoir encore me supporter à cause, ou grâce à Yuna.

Enfin, je tiens à remercier le destin, qui a fait que nos routes se sont à nouveau croisées sur une table, dans un bar du vieux Nice (non, je ne suis pas une ivrogne), je parle bien sûr de toi, Christophe. Cette dernière année de thèse a été éprouvante, et tu l'as rendue bien plus belle. Merci de m'avoir fait découvrir Breil, cette maison que tu es en train de reconstruire et dans laquelle j'ai pu écrire ma thèse en toute quiétude mais surtout sans internet (ce qui n'a pas toujours été facile). Notre relation ne fait que débiter mais je suis sûre qu'il nous reste énormément d'aventures à vivre ensemble et je suis prête à avancer à tes côtés.

Cette thèse a été menée à l'institut de Biologie Valrose (IBV) dans le groupe de recherche « Contrôle de la morphogénèse et signalisation chez la drosophile » dirigé par le docteur Pascal Théron.

Institut de Biologie Valrose

CNRS UMR7277, Inserm U1091, Université Nice Côte d'Azur

Parc Valrose

06108 Nice cedex 2

France

Ce doctorat a été supervisé par les docteurs Pascal Théron et Laurent Ruel.

Cette thèse a été financée par la Bourse du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche pendant 3 ans puis par la fondation ARC pour la quatrième année.

Article inclus dans ce manuscrit de thèse :

Giordano et al. « Protein Conformational changes in the Hedgehog signaling pathway mediate differential signaling strength. » *En preparation.*

Résumé

Etude du mécanisme d'activation de la voie de signalisation canonique de Hedgehog chez la drosophile

Les protéines Hedgehog (Hh) constituent une famille de protéines impliquées dans de nombreux processus d'induction et de morphogénèse au cours du développement des métazoaires. La dérégulation de son activité conduit à des anomalies développementales importantes et de nombreux cancers chez l'adulte. Chez la drosophile, la transduction du signal Hh est initiée par la fixation de Hh sur son récepteur Patched (Ptc), conduisant à la stabilisation de la protéine membranaire Smoothened (Smo) et à l'activation du complexe de transduction composé de 5 protéines : les kinases Fused (Fu), PKA, GprK2, la kinésine Costal 2 (Cos2), et le facteur de transcription de la voie Cubitus Interruptus (Ci). Ma thèse a porté sur la régulation et l'étude des interactions moléculaires entre les différents composants de la voie Hh.

Les études précédentes du laboratoire ont révélé des changements de conformation au sein du complexe en fonction du signal Hh. En absence d'Hh, la phosphorylation de Ci par la PKA permet la dégradation du Ci en répresseur transcriptionnel dans le complexe qualifié de répresseur. En présence de Hh, la PKA est relocalisée vers Smo puis phosphoryle Smo, initiant la cascade d'activation qui se termine par la maturation du Ci en activateur transcriptionnel dans le complexe appelé activateur. Comment Hh permet le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur ? C'est la question à laquelle j'ai voulu répondre pendant mon doctorat. A l'aide de phospho-anticorps et de la Complémentation par Fluorescence Bimoléculaire (BiFC), j'ai étudié le rôle des protéines Smo et Gprk2 sur l'activation différentielle de Fu, ainsi que l'importance de Fu dans la formation du Ci-Activateur.

Nous avons montré que l'extrémité C-terminale de Smo permet l'activation de la kinase Fu, activation dépendante de Gprk2. A hauts niveaux d'Hh, nous avons observé que Gprk2 induit des changements de conformation de Smo au sein du complexe de transduction, qui favorisent le rapprochement du domaine catalytique de Fu avec Cos2 et Ci. Pour la première fois, nous avons démontré que la protéine Ci est phosphorylée par Fu dans son domaine N-terminal où nous avons identifié des sites putatifs de phosphorylation. De façon inattendue, nous avons révélé des remaniements inter-moléculaires entre les protéines Fu et Ci en fonction du signal Hh. En absence d'Hh, le complexe répresseur Fu/PKA interagit avec le domaine C-terminal de Ci, aboutissant à la formation du Ci-Répresseur. En présence d'Hh, l'incorporation de Smo dans le complexe déclenche de nombreuses modifications des interactions inter-protéiques, conduisant à la liaison du complexe activateur Smo/PKA/Fu à la région N-terminale de Ci.

L'ensemble de ma thèse a permis de révéler de nouveaux remaniements protéiques à l'intérieur du complexe de transduction, et démontre ainsi l'importance de ces changements de conformation dans la voie de signalisation Hh.

Mots clés : Hedgehog, transduction du signal, changement de conformation, kinase Fused.

Abstract

Study of the mechanism leading to the activation of canonical Hedgehog pathway in *Drosophila melanogaster*

The proteins of the Hedgehog family (Hh) are involved in many morphogenetic processes during development in both vertebrates and invertebrates. The dysregulation of the Hh pathway leads to severe developmental defects, and the onset of cancer in adults. In *Drosophila*, the Hh signal transduction is initiated by the binding of Hh to its receptor Patched (Ptc). This induces the stabilization of the transmembrane protein Smoothed (Smo) and the subsequent activation of a transduction complex consisting of 5 proteins: the kinases Fused (Fu), PKA and Gprk2, the kinesin Costal2 (Cos2), and the transcription factor of the pathway Cubitus Interruptus (Ci). In this thesis I studied the regulation and molecular interactions between the different components of the Hh signalling pathway.

Previous studies carried out in the laboratory highlighted the conformational changes in the complex induced by Hh signalling. In absence of Hh, the phosphorylation of Ci by PKA leads to the cleavage of Ci, and its conversion to a transcriptional repressor inside the repressor complex. In the presence of Hh, PKA associates with, then phosphorylates Smo, initiating an activation cascade culminating in the conversion of Ci into a transcriptional activator inside the activator complex. During my PhD, I addressed the following question: How does Hh modulate the transition from the repressor complex to the activator complex? Using phospho-antibodies and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), I have investigated the role of Smo and Gprk2 proteins in the differential levels of Fu activation, and the function of Fu in Ci-Activator formation.

We demonstrated that the C-terminal extremity of Smo allows the activation of Fu kinase in a Gprk2 dependent manner. In presence of high levels of Hh, we observed that Gprk2 is able to induce conformational changes of Smo in the transduction complex. These conformational changes promote the proximity of the catalytic domain of Fu to its substrates such as Cos2 and Ci. We demonstrated for the first time that Ci is phosphorylated by Fu at its N-terminal domain in which we have previously identified putative phosphorylation sites. Surprisingly, we found that Hh signalling triggers changes to the inter-molecular organisation of Fu and Ci. In the absence of Hh, repressor complex Fu/PKA interact with C-terminal domain of Ci, allowing the formation of Ci-Repressor whilst, in presence of Hh, the incorporation Smo into the complex triggers a series of inter-molecular modifications in the complex, leading to the binding of activator complex Smo/PKA/Fu to the N-terminal portion of Ci.

My thesis work has revealed new protein reorganizations inside the transduction complex, and demonstrates the relevant function of conformational changes in the Hh signalling pathway.

Key words: Hedgehog, signal transduction, conformational changes, Fu kinase.

INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE 1 : LE ROLE DE HEDGEHOG CHEZ LES METAZOAIRES.....	13
1.1 <i>Hedgehog au cours du développement</i>	13
1.1.1 Généralités sur le développement chez métazoaires	13
1.1.2 Le rôle du morphogène Hedgehog.....	14
1.1.2.1 Définition d'un morphogène.....	14
1.1.2.2 Le morphogène Hedgehog chez les vertébrés et les invertébrés	15
1.1.3 Exemple de processus de développement impliquant la voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés.....	17
1.1.3.1 Le développement des membres.....	17
1.1.3.2 La formation du tube neural	19
1.1.4 Exemples de processus de développement impliquant la voie de signalisation chez les invertébrés	21
1.1.4.1 La segmentation de l'embryon	21
1.1.4.2 Le développement du disque imaginal de l'aile aboutissant à l'aile chez l'adulte	23
1.2 <i>Hedgehog au cours de la vie adulte</i>	26
1.2.1 Le rôle d'Hh dans le maintien et la réparation tissulaire.....	26
1.2.1.1 Définition	26
1.2.1.2 Le rôle de Shh dans l'homéostasie et la réparation tissulaire.....	27
1.2.2 Hedgehog et Cancer	30
1.2.2.1 Les modèles d'implication de la voie Hh dans les différents types de cancers	31
1.2.2.2 Les inhibiteurs de la voie Shh.....	32
CHAPITRE 2 : LES MECANISMES MOLECULAIRES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG	34
2.1 <i>Les cellules productrices</i>	34
2.1.1 La maturation et la sécrétion d'Hh.....	34
2.1.1.1 La maturation.....	34
2.1.1.2 La sécrétion	35
2.1.2 Le mouvement d'Hh.....	37
2.1.2.1 La matrice extracellulaire et le mouvement d'Hh	37
2.1.2.2 Les transporteurs impliqués dans le mouvement d'Hh	38
2.2 <i>Les cellules réceptrices</i>	40
2.2.1 Le récepteur Patched	41
2.2.1.1 La régulation de Hh par Ptc.....	41
2.2.1.2 La régulation de Smo par Ptc	44
2.2.2 Ptc et ses co-récepteurs : Ihog/Boi et Dally-like.....	47
2.2.2.1 Interference of Ihog (Ihog) and Brother of Ihog (Boi)	47
2.2.2.2 Dally-like (Dlp).....	48
2.2.3 La régulation de Smoothened	49
2.2.3.1 La dégradation de Smo en absence d'Hh	49
2.2.3.2 L'activation de Smo en présence d'Hh	51
2.2.3.2.1 Généralités sur l'activation de Smo	51
2.2.3.2.2 Le rôle des phosphorylations de Smo sur son activité.....	52
2.2.3.2.3 La régulation complexe de Smo.....	57
2.2.4 Le(s) complexe(s) de signalisation	62
2.2.4.1 Les différentes isoformes de Ci en fonction du signal Hh	62
2.2.4.2 La formation du Ci-Répresseur par le complexe Fu/Cos2 en absence d'Hh.....	65
2.2.4.2.1 Le complexe répresseur Fu/Cos2.....	65
2.2.4.2.2 La régulation de la formation du Ci-Répresseur	68
2.2.4.2.3 La formation du Ci-Répresseur	70
2.2.4.3 La dégradation de Ci	71
2.2.4.4 Le complexe cytoplasmique Sufu/Ci	74
2.2.4.5 La formation du Ci-Activateur par le complexe Fu/Cos2.....	76
2.2.4.5.1 Le complexe activateur Fu/Cos2.....	76
2.2.4.5.2 La régulation de la formation des formes activatrices de Ci : Ci-155 et Ci-Activateur.....	81
CHAPITRE 3 : LA VOIE DE SIGNALISATION SHH CHEZ LES VERTEBRES	83
3.1 <i>Le cil primaire</i>	83

3.2	<i>La voie canonique Shh</i>	83
3.2.1	Le récepteur Ptch	83
3.2.2	La répression du signal en absence d'Hh	85
3.2.3	L'activation du signal en présence d'Hh	89
3.3	<i>Les voies non canoniques de Shh</i>	93
3.3.1	La voie non canonique de type I : voie dépendante de Ptch	94
3.3.1.1	L'apoptose	94
3.3.1.2	La régulation de la cycline B1 dans le cycle cellulaire	94
3.3.2	La voie non canonique de type II : voie dépendante de Smo	95
3.3.2.1	La réorganisation du cytosquelette par les petites protéines G : GTPases	96
3.3.2.2	La régulation du métabolisme	96
RESULTATS	99
CHAPITRE 1 : L'ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA KINASE FU DANS LA VOIE DE SIGNALISATION HH		105
CHAPITRE 2 : LE RÔLE DES PROTÉINES FU, PKA ET SMO DANS LA FORMATION D'UN COMPLEXE REPRESSEUR OU UN COMPLEXE ACTIVATEUR		143
DISCUSSION	177
CHAPITRE 1 : LE MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA KINASE FUSED EN PRESENCE D'HH		179
1.1	<i>Le couple Smo/Fu : senseur des différents niveaux d'Hh</i>	180
1.1.1	Le rôle des 52 derniers acides aminés de Smo dans l'activation de Fu pour des hauts niveaux d'Hh	180
1.1.2	Le rôle de Smo dans l'activation différentielle de Fu	181
1.2	<i>La protéine Gprk2 : un acteur supplémentaire pour réguler l'activité de la kinase Fused</i>	185
1.2.1	Le rôle de Gprk2 dans l'activation de Fu pour des hauts niveaux d'Hh	185
1.2.2	L'identification d'un nouveau rôle du complexe Fu/Cos2 dans l'activation de Smo par Gprk2	186
1.3	<i>L'activation de la kinase Fused : une histoire de conformation ?</i>	187
CHAPITRE 2 : LA TRANSITION D'UN COMPLEXE REPRESSEUR EN ABSENCE D'HH A UN COMPLEXE ACTIVATEUR EN PRESENCE D'HH		190
2.1	<i>Fu exerce une fonction indépendante de son activité kinase afin de réguler l'interaction entre la PKA et Ci</i> ...	191
2.2	<i>Le rôle de la kinase Fu dans la régulation de Ci</i>	192
2.2.1	La formation du Ci-Activateur : implication de phosphorylations par la kinase Fu ?	192
2.2.2	L'interaction entre Fu et Ci : un changement de conformation de plus dans le complexe de transduction sous l'effet d'Hh !	193
2.3	<i>La détection des complexes répresseurs et activateurs : un nouvel outil dans l'étude de la voie Hh</i>	194
CONCLUSION	197
ANNEXE	203
LES COLLABORATIONS SCIENTIFIQUES		205
1.1	<i>Article 1: Role of the small GTP-ase Rab8 in the establishment of Hedgehog long-, and short-range activity</i> .	206
1.2	<i>Article 2: A newly identified function for the Hedgehog morphogen in lifespan determination and neuroprotection in Drosophila</i>	207
ABBRÉVIATIONS		208
BIBLIOGRAPHIE	211

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Le rôle de Hedgehog chez les métazoaires

1.1 Hedgehog au cours du développement

1.1.1 Généralités sur le développement chez métazoaires

Le développement embryonnaire est un processus biologique permettant de passer d'une cellule unique à un organisme multicellulaire. Ce processus se déroule en 4 étapes principales :

- 1) La formation du zygote à partir de l'œuf fécondé.
- 2) La segmentation du zygote suivie de la gastrulation (mise en place des trois feuilletts embryonnaires : endoderme, mésoderme, ectoderme).
- 3) L'organogénèse (formation des différents organes).
- 4) La croissance puis la naissance de l'individu.

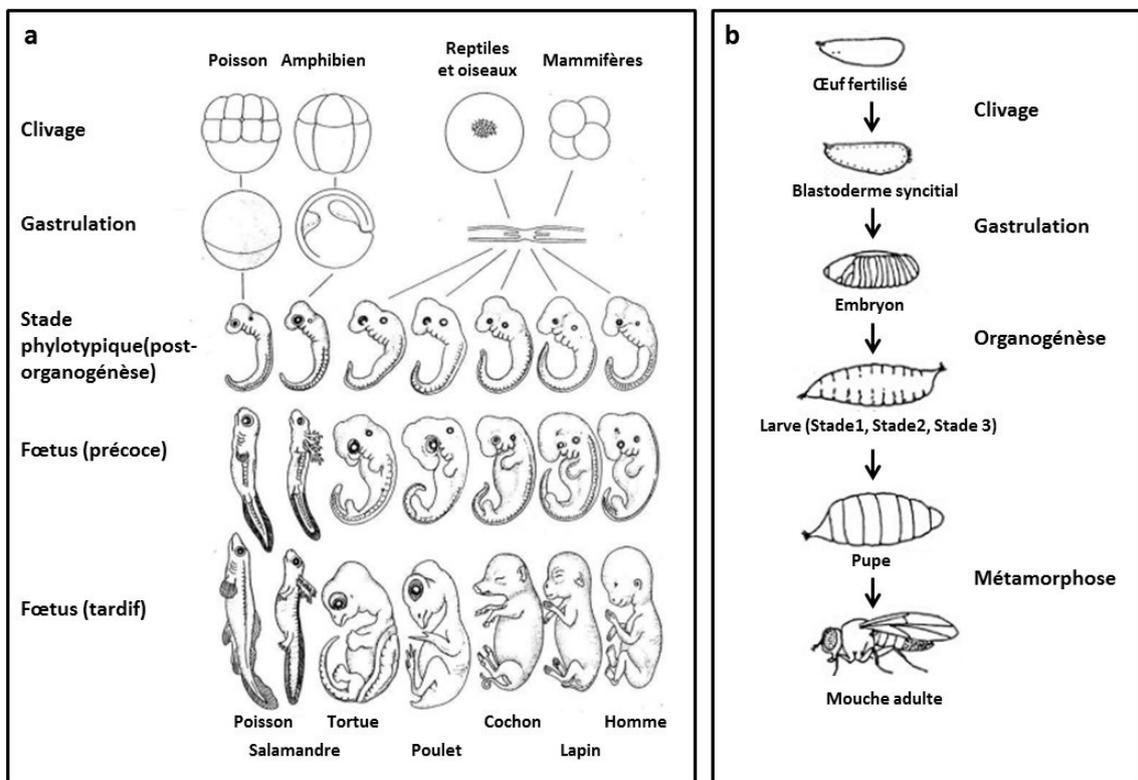


Fig. 1 : Représentation schématique des différents stades du développement chez les vertébrés (a) et les invertébrés (b)

a) Chez tous les vertébrés, les cycles de développement présentent des similarités. Après la fécondation, le zygote subit le processus de clivage ou segmentation aboutissant à la formation de l'embryon. Suite à la gastrulation et l'organogénèse, le foetus tardif est formé et la croissance est la dernière étape afin d'obtenir un individu. L'analyse en détail du développement des vertébrés, montrent des différences, en particulier au cours des stades précoces. En effet, les processus de segmentation et de gastrulation sont soumis à des mécanismes de régulation différents. Au stade phylotypique, tous les vertébrés sont comparables. Ce stade se caractérise par une grosse tête, une queue, des somites, un système nerveux creux et des arcs branchiaux ou poches pharyngiennes.

C'est durant les stades fœtaux que les caractéristiques de chaque espèce s'installent (plumes, ailes, poils...) (Figure modifiée à partir de <http://nico8386.free.fr/cours/BA/dvlpmtvertebrates.pdf>)

b) Le développement embryonnaire de la drosophile se caractérise par la formation d'un blastoderme syncitial, c'est-à-dire un œuf où les noyaux provenant des premières divisions partagent le même cytoplasme. Après une dizaine de division, les noyaux migrent à la périphérie de l'embryon où ils s'entourent d'une membrane plasmique, aboutissant à la formation du blastoderme cellulaire. S'en suivent alors les processus de gastrulation et d'organogénèse afin d'arriver au premier stade larvaire. Après 2 mues, la larve de stade 3 va s'installer dans le puparium dans lequel la métamorphose permet la formation des organes adultes puis la naissance d'une mouche adulte. Ce qui est remarquable chez la drosophile, c'est le temps de génération d'un nouvel individu qui est de 10 jours à 25 degrés. L'embryon obtenu après fécondation se développe sur une durée de 24h environ. La phase larvaire a une durée d'environ 4,5 jours et le stade de pupa dure 3,5 jours. L'adulte émerge au 10^{ème} jour, et a un temps de vie d'environ 50 jours à 25 degrés (Figure adaptée à partir de http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9871&page=162).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à savoir comment se forment les organes pendant le développement ? L'élaboration de ces organes implique la mise en place d'axes de polarité qui nécessitent une catégorie de protéines appelée morphogènes. Parmi ces morphogènes, trois ont été particulièrement étudiés : Wg (« Wingless »), Dpp (« Decapentaplegic ») et Hh (« Hedgehog »). Notre laboratoire mène des recherches sur le morphogène Hh.

1.1.2 Le rôle du morphogène Hedgehog

La protéine Hh est un morphogène qui a un rôle crucial au cours du développement. Pendant ce chapitre, je définirai la notion de morphogène et je montrerai l'implication de ce morphogène dans le développement des vertébrés et des invertébrés que j'illustrerai à l'aide d'exemples.

1.1.2.1 Définition d'un morphogène

Comme je l'ai décrit plus haut, le développement est un processus complexe et très contrôlé durant lequel chaque cellule doit acquérir une identité qui lui est spécifique afin d'obtenir un individu correctement formé. Une question essentielle se pose alors : quel est le processus permettant à une cellule de se situer dans l'organisme afin de déclencher la réponse génique appropriée ?

Pour répondre à cette question, le concept « d'information de position » est apparu (Turing, 1952). Ce concept propose que les cellules acquièrent des identités de position comme dans un système de coordonnées. C'est en interprétant leur position qu'elles peuvent déclencher la réponse cellulaire adaptée à leur devenir dans le futur organisme.

En 1969, Lewis Wolpert a imaginé « le modèle du drapeau français » pour expliquer le concept d'information de position où il définit une nouvelle substance, appelée un morphogène. Par définition, un morphogène est une protéine sécrétée qui diffuse selon un gradient de concentration, et en fonction de la dose de morphogène perçue, les cellules

acquièrent différentes destinées. Le morphogène permet ainsi aux cellules d'obtenir une information de position et donc une identité.

Pour faire son action, le morphogène doit diffuser et se déplacer librement. Sa diffusion peut se faire à travers des espaces intercellulaires, *via* des interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire, par transcytose, ou bien le morphogène peut être véhiculé par des transporteurs comme des exovésicules. Il n'existe pas de règle absolue définissant la forme et le moyen par lequel le morphogène diffuse. En revanche, il est important de noter que l'interprétation différentielle reçue par les cellules ne dépend pas seulement de la quantité du signal perçu mais également de la durée d'exposition à ce signal (Fig. 2a) (Sagner et Briscoe, 2017). Enfin, étant donné la complexité structurelle d'un organisme, il est intuitif de comprendre que l'action combinée de plusieurs morphogènes est nécessaire à l'obtention de tous les organes qui composent un individu. Un organe est une structure organisée en trois dimensions, selon trois axes (« A/P : Antero-Posterior », « D/V : Dorso-Ventral », « P/D : Proximo-Distal ») dont le développement requiert l'action d'un morphogène spécifique à chaque axe (Fig. 2b).

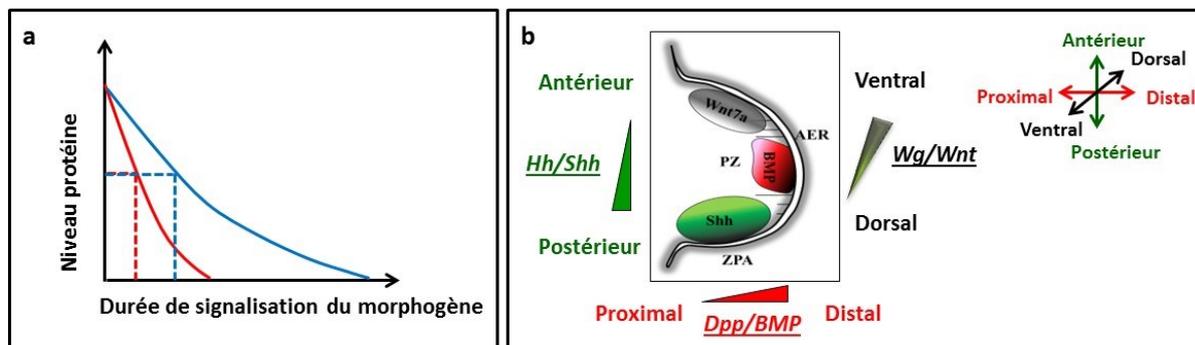


Fig. 2 : Schéma illustrant deux exemples de la complexité de l'action d'un morphogène

a) Courbe illustrant l'importance de la durée de signalisation du morphogène. Pour être exprimée au même niveau que la protéine rouge, la protéine bleue doit être exposée plus longtemps au signal morphogénétique (figure modifiée à partir de Sagner et Briscoe, 2017).

b) Schéma d'un bourgeon de la patte d'un embryon de souris. Trois protéines secrétées agissent comme morphogène afin de permettre l'organogénèse de ce membre : Dpp, Wg et Hh. Dpp détermine la destinée des cellules le long de l'axe P/D, Wg agit au niveau de l'axe D/V et Hh diffuse à partir du mésenchyme postérieur pour contrôler la partie la plus postérieure du bourgeon. Le processus de formation du membre sera décrit plus en détail dans la section 1.1.3.1.

1.1.2.2 Le morphogène Hedgehog chez les vertébrés et les invertébrés

La protéine Hh est impliquée dans l'organogénèse (étape 3) au cours du développement embryonnaire des vertébrés et des invertébrés (Ingham et Mahon, 2001). Cette protéine a été découverte pour la première fois chez la drosophile lors d'un crible génétique réalisé par Nüsslein-Volhard et Wieschaus en 1980. Les individus mutants pour Hh présentaient des défauts de segmentation chez l'embryon (Fig. 3), et des anomalies dans les tissus larvaires, notamment au niveau du disque imaginal de l'aile. La segmentation de l'embryon ainsi que la morphogénèse de l'aile seront abordées dans le paragraphe 1.1.4.

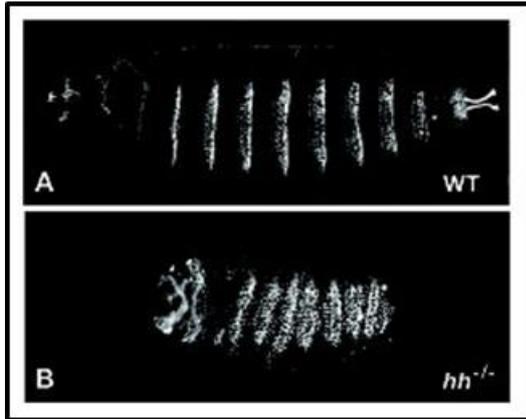


Fig. 3 : Embryon mutant pour le gène *hedgehog*

Les deux images représentent une vue ventrale de la cuticule d'un embryon de drosophile. L'épiderme de l'embryon est subdivisé en segments répétés visibles par la présence de denticules (en blanc). La cuticule du mutant pour *hedgehog* (B) présente des défauts de la segmentation comparée à celle du WT (A). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6164/>).

Il s'est avéré qu'Hh agit comme un morphogène tout comme ses trois gènes orthologues chez les vertébrés : « *indian hedgehog* » (*ihh*), « *desert hedgehog* » (*dhh*) et « *sonic hedgehog* » (*shh*) (Fig4).

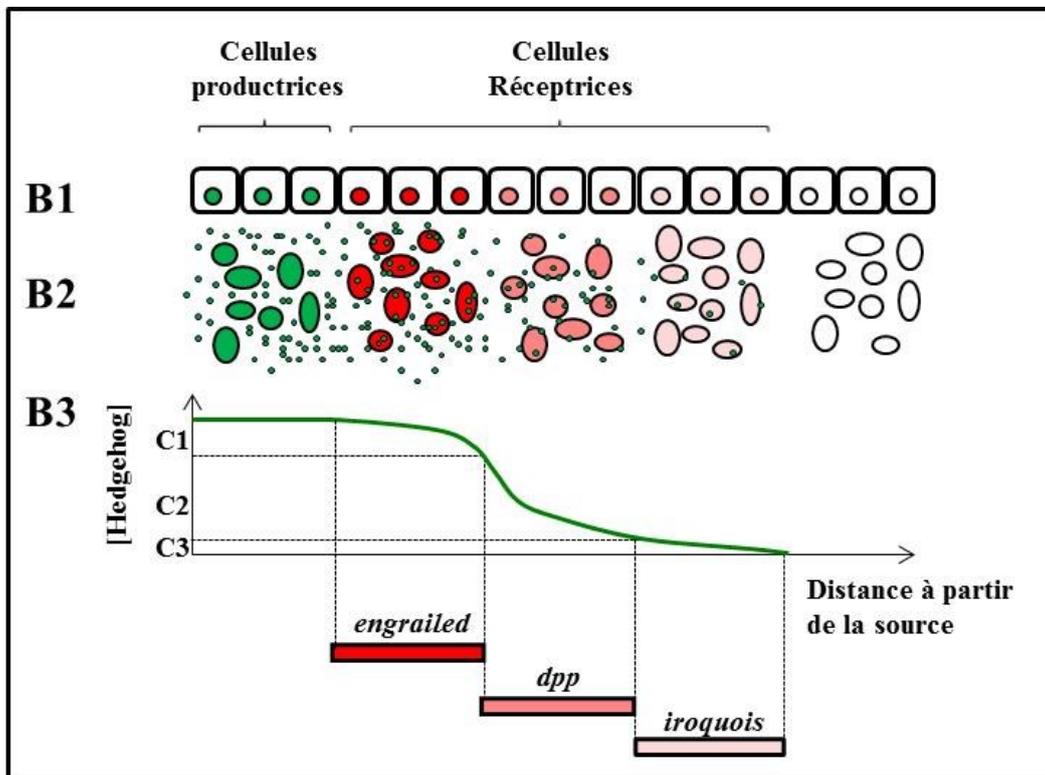


Figure. 4 : Représentation schématique de la diffusion du morphogène Hedgehog chez la drosophile

Le morphogène Hh (point vert) est sécrété par des cellules productrices (cellules vertes) et diffuse dans l'épithélium (B) sous forme d'un gradient de concentration pour atteindre les cellules réceptrices (cellules rouges). En fonction de la concentration du morphogène (C1, C2 ou C3) que reçoivent les cellules, différents gènes sont exprimés (C1: *engrailed* ; C2: *dpp* ; C3: *iroquois*) conduisant à différentes destinées cellulaires différentes. En absence d'Hh, les gènes cibles sont réprimés (Figure du rapport de stage de Master 2).

Le gène *ihh* est impliqué dans la différenciation osseuse (St-Jacques et al., 1999, Vortkamp et al., 1996), alors que le gène *dhh* intervient dans la différenciation des gonades (Bitgood et al., 1996). Le gène *shh* a un rôle plus vaste au cours du développement puisqu'il est nécessaire à l'organisation de nombreux tissus dont les plus étudiés sont la ventralisation du tube neural (Sampath et al., 1997 ; Pagán-Westphal et Tabin, 1998 ; Schilling et al., 1999) et l'organisation du bourgeon des membres (Riddle et al., 1993 ; Chang et al., 1994; Marti et al., 1995).

Ces deux derniers rôles de Shh seront décrits plus en détail dans le chapitre suivant. Une anomalie de l'activité Shh lors du développement peut engendrer une holoprocéphalie, c'est-à-dire une malformation congénitale du cerveau (Roessler et al., 1996), ou bien une polydactylie, formation de doigts surnuméraires (Talamillo et al., 2005). En plus de son rôle dans le développement, Hh/Shh intervient dans la réparation tissulaire et l'auto-renouvellement de certaines cellules souches chez l'adulte (Beachy et al., 2004). Un chapitre sera consacré à la description de l'implication d'Hh dans ces processus mais également dans la genèse des cancers qui résultent d'une dérégulation de la voie Shh au cours de la vie adulte.

1.1.3 Exemple de processus de développement impliquant la voie de signalisation Hedgehog chez les vertébrés

L'organogénèse des membres et de la formation du tube neural sont deux processus bien connus et caractéristiques de la voie de signalisation Shh. Le gradient de morphogène Shh permet aux cellules de connaître leur identité afin d'engager la réponse cellulaire adaptée à l'obtention d'un organe normal. Je décrirai ces deux exemples brièvement et de manière non exhaustive dans le chapitre suivant.

1.1.3.1 Le développement des membres

L'organogénèse des membres est un processus illustrant le rôle morphogénétique de Shh. L'identité et le nombre de doigts du membre sont définis selon la dose de Shh perçue par les cellules. Le membre se développe selon trois axes : l'axe proximo-distal, l'axe antéro-postérieur sur lequel s'orientent les doigts du premier au cinquième et où Shh intervient, et l'axe ventro-dorsal. D'un point de vue moléculaire, chaque axe possède un centre organisateur embryonnaire, c'est-à-dire une zone de l'embryon qui va sécréter les facteurs nécessaires au développement correct de l'axe. Pour l'axe proximo-distal, il s'agit du bourrelet apical ectodermique (« AER : Apical Ectoderm Ridge ») qui est nécessaire à la croissance du bourgeon de membre. L'ectoderme de surface contrôle l'axe dorso-ventral, important pour définir la paume et le dos de la main. La croissance et l'identité des doigts sont régies par la zone d'activité polarisante (« ZPA : Zone of Polarizing Activity ») le long de l'axe antéro-postérieur. Les cellules constituant la ZPA, région située dans le mésenchyme postérieur du bourgeon de membre, vont sécréter le morphogène Shh (Fig. 5a). La ZPA a été découverte par hasard par Saunders et Gasseling en 1968. A l'origine, ces chercheurs s'intéressaient au processus de nécrose dans le bourgeon de membre de l'aile du poulet.

Pour cela, ils ont transplanté une zone de la région postérieure, zone caractérisée par une mort cellulaire programmée durant l'organogénèse (Saunders et Fallon, 1966), dans la région antérieure d'un bourgeon de membre d'un autre animal. Normalement une aile normale de poulet est constituée de 3 doigts qui se développent de l'antérieur (doigt 2) au postérieur (doigt 4). Après la greffe, 6 doigts se sont formés avec une image en miroir (Fig. 5b). En appliquant des quantités différentes de Shh dans le mésoderme antérieur, l'équipe de Yang et al., 1997 a observé le développement de doigts surnuméraires, toujours spécifiés dans le même ordre, démontrant l'importance de l'action morphogénétique de Shh (Fig. 5c). Des expériences supplémentaires ont permis l'élaboration d'un modèle de formation des membres, appelé le modèle du gradient temporo-spacial (Fig. 5d). Les doigts 4 et 5 se développent en fonction de la durée d'exposition à la protéine Shh. La signalisation Hh perçue par ces doigts est qualifiée d'autocrine car les cellules formant les doigts 4 et 5 descendent directement de cellules ayant exprimées Shh. Le doigt 3 exprime Shh de façon paracrine et autocrine. Sa formation est dépendante à la fois de la durée d'exposition et de la concentration reçue du morphogène Shh. Le doigt 2 se développe en fonction de la concentration de Shh reçue et par signalisation paracrine. Enfin la formation du premier doigt est indépendante du signal Hh puisque dans des embryons mutants pour Shh, seul le doigt 1 est présent (Chiang et al., 1996). La dérégulation du signal Hh durant le développement induit des malformations (Fig. 5e).

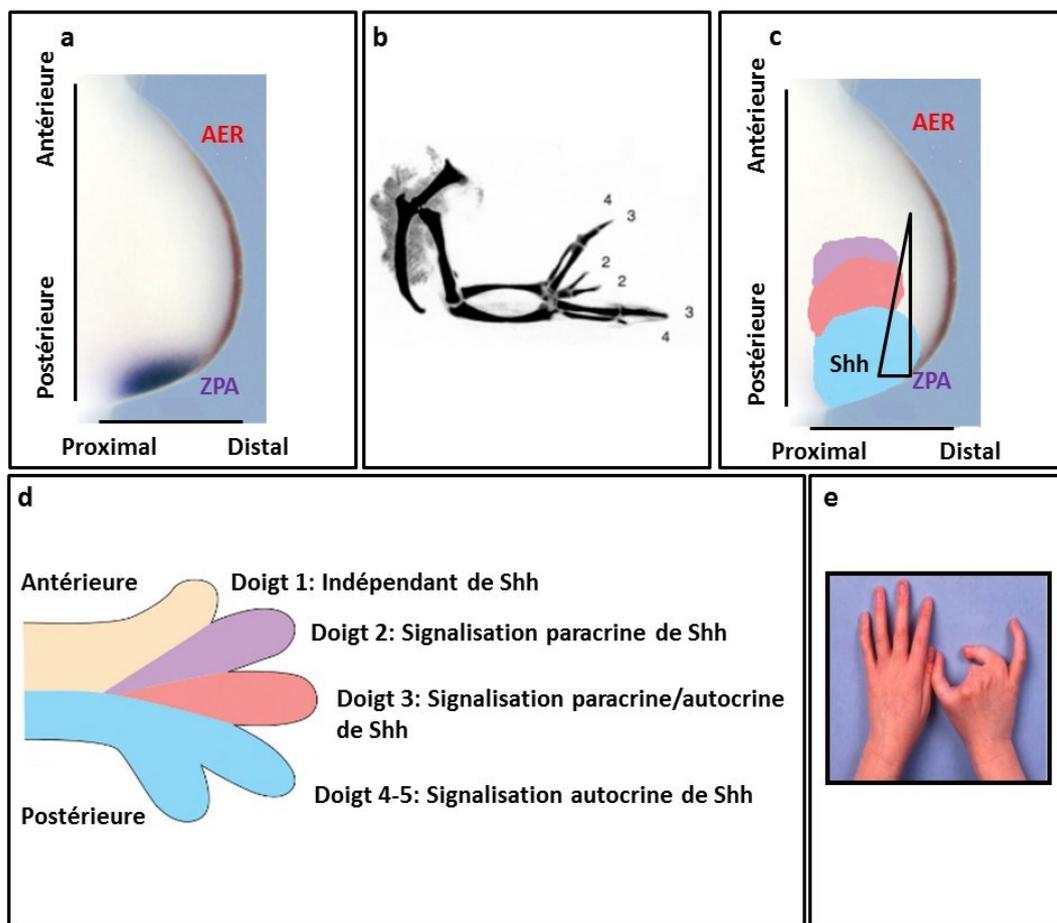


Fig. 5 : Le développement du membre chez les vertébrés

- a)** Le centre organisateur responsable de l'expression de Shh est la zone d'activité polarisante (ZPA), qui se trouve dans la région postérieure du bourgeon du membre. Un autre centre organisateur est présent dans le bourrelet apical ectodermique (AER) (McGlinn et Tabin, 2006).
- b)** La greffe d'une zone de la région postérieure dans la partie antérieure du bourgeon d'aile d'un poulet entraîne le développement surnuméraire de 3 doigts avec une symétrie en miroir par rapport aux doigts de l'animal receveur (pattern : 432234) (image de Tickle, 2002).
- c)** Expression de Shh sous forme d'un gradient diffusant du postérieur vers l'antérieur du bourgeon (image modifiée à partir de McGlinn et Tabin, 2006).
- d)** Modèle temporo spatial de la mise en place de l'axe antéro-postérieur par Shh du membre chez la souris. L'identité des doigts est déterminée selon une signalisation paracrine (doigts 2 et 3) ou autocrine (doigts 3, 4 et 5). La formation du doigt 1 est indépendante de Shh (Chapitre 20, Embryologie humaine de Larsen Par William Larsen, Philip R Brauer, Gary C Schoenwolf, Philippa Francis-West).
- e)** Photo montrant une main d'homme malformée à droite et une main normale à gauche.

1.1.3.2 La formation du tube neural

La morphogénèse du système nerveux chez les vertébrés est initiée à la gastrulation. La différenciation neuronale a lieu dans une partie de l'ectoderme dorsal grâce à l'action de différents signaux comme *noggin*, *chordin*, *follistatin*, *Xnr3* et *cerberus*. Ces signaux, issus du centre organisateur de Spemann, induisent un épaissement de l'ectoderme au niveau dorsal, délimitant ainsi l'emplacement de la future plaque neurale (De Robertis, 2006) Pendant la formation de la plaque neurale, les axes embryonnaires sont déterminés par des signaux spécifiques à chaque axe. L'axe antéro-postérieur est dépendant de signaux comme FGF (« Fibroblast Growth Factor »), Wnt et les facteurs de transcription de la famille Hox alors que l'axe droite-gauche est sous le contrôle du facteur Lefty. La spécification de l'axe dorso-ventral est déterminée par des signaux différents entre la région ventrale (Shh) et la région dorsale (BMP : « Bone Morphogenetic Protein »), Wnt et les facteurs de transcription Msx et Pax). Grâce à ces signaux morphogénétiques, la plaque neurale va se refermer et donner naissance au tube neural où des cellules progénitrices multipotentes prolifèrent et se différencient afin de générer les neurones et les cellules gliales qui constituent le système nerveux mature et fonctionnel.

Le rôle de la notochorde dans la détermination de l'axe dorso-ventral a été découvert au cours d'expériences chez le poulet (van Straaten et al., 1985) et le poisson zèbre (Hatta et al., 1991). Ces expériences montrent que la notochorde est la source de signaux impliqués dans la formation du plancher du tube neural. De manière intéressante, Echelard et al., 1993 ont montré que Shh s'exprime dans la notochorde et le plancher du tube neural, et que son expression ectopique induisait l'activation des gènes cibles du plancher neural. Leurs résultats, associés à des expériences de « perte de fonctions » réalisées par d'autres équipes (Chiang et al., 1996; Ericson et al., 1996; Marti et al., 1995), indiquent que l'expression de Shh est nécessaire et suffisante pour la formation du plancher neural et la spécification de l'axe dorso-ventral. Une fois exprimée, Shh diffuse selon un gradient de la région ventrale à

la région dorsale du tube neural. En fonction des doses perçues du morphogène, les cellules vont induire des réponses géniques adaptées à leur position dans le tissu afin de générer les neurones ventraux V0-V3 et les neurones moteurs (Fig. 6a). Cependant, il semblerait que le morphogène Shh ne soit pas la seule molécule impliquée dans la spécification des neurones le long de l'axe dorso-ventral. En effet, les populations de neurones V0 et V1 sont encore présentes dans des souris mutantes pour Shh, indiquant l'existence d'un autre mécanisme intervenant dans la production de ces neurones (Chiang et al., 1996; Litingtung et Chiang, 2000). Des expériences menées par (Pierani et al., 1999 et L. Wilson et al., 2004) ont montré que la signalisation de l'acide rétinoïque est impliquée dans la spécification des interneurons V0 et V1. Comme je l'ai dit plus haut, Shh détermine la région ventrale alors que la région dorsale est soumise au contrôle de BMP. Par conséquent, l'ablation de la notochorde ou le blocage des signaux qu'elle secrète entraîne une dorsalisation des cellules du tube neural (Artinger et Bronner-Fraser, 1992). Les protéines de la famille des BMP sont également des morphogènes car ils sont capables d'induire différents types cellulaires en diffusant sous forme de gradient à partir d'une source unique (Wilson et al., 1997). Ainsi le processus de spécification de l'axe dorso-ventral est un exemple où deux morphogènes s'opposent afin d'aboutir à la formation correcte d'un tissu, ici le tube neural (Fig. 6b).

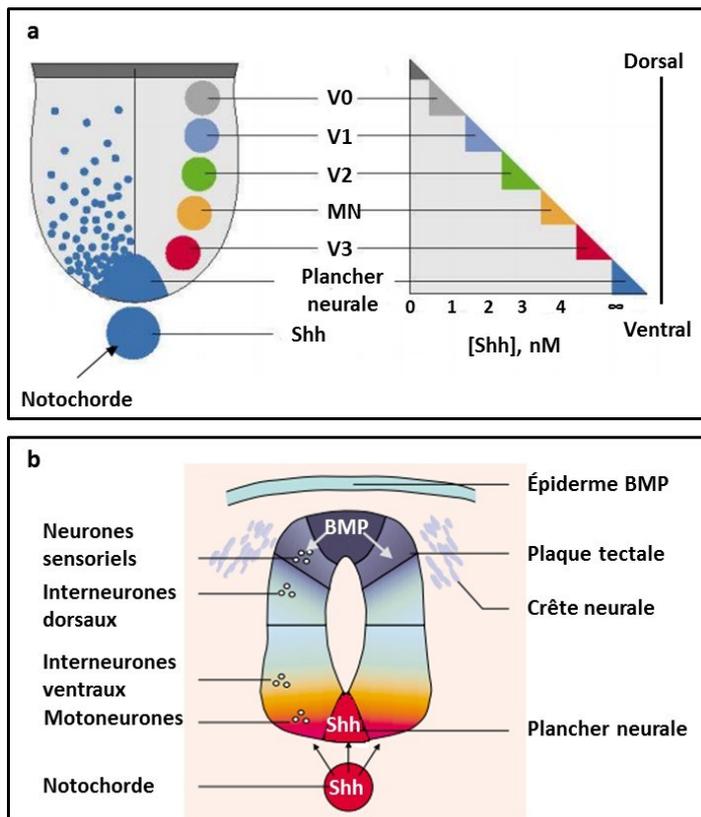


Fig. 6 : Le développement du tube neural

a) Modèle du rôle de Shh dans la spécification des cellules ventrales du tube neural. A gauche, le gradient de concentration de Shh est représenté par des ronds répartis dans le tube neural. Shh induit de façon dose-dépendante la différenciation de toutes les populations ventrales de neurones : V0-V3 sont 4 classes d'interneurones ventraux, et MN indique les motoneurones. A droite, schéma montrant une corrélation entre la dose de Shh requise pour induire la différenciation des précurseurs d'une population de neurones donnée et la position de cette même population le long de l'axe Dorso-Ventral (Jessell, 2000).

b) Schéma illustrant l'action opposée de

deux morphogènes pour le développement du tube neural. Le premier morphogène détermine le devenir ventral des cellules et est du au signal Shh qui diffuse à partir de la notochorde et du plancher neural. Le second, relayé par le facteur BMP en partie, agit depuis l'ectoderme neural et assure le devenir dorsal des cellules (Hemmati-brivanlou, 2000).

1.1.4 Exemples de processus de développement impliquant la voie de signalisation chez les invertébrés

A l'instar des vertébrés, deux mécanismes de développement sont décrits chez les invertébrés pour comprendre le mode d'action du morphogène Hh. Ces deux exemples, provenant de la drosophile, sont la segmentation de l'embryon et la formation du disque imaginal de l'aile qui est un des modèles d'étude utilisé au laboratoire.

1.1.4.1 La segmentation de l'embryon

Chez la drosophile, la segmentation de l'embryon le long de l'axe antéro-postérieur est gouvernée par l'expression de gènes maternels ainsi que de différents gènes zygotiques (Sanson, 2001):

- 1) Les gènes Gap, dont l'expression est contrôlée par les gènes maternels, déterminent la division de l'embryon en grandes régions dans lesquelles se trouvent les ébauches segmentaires (*Hunchback*, *giant*, *krüppel*, *Knirps* et *tailless*).
- 2) Les gènes pair-rule sont régulés par les gènes Gap et subdivisent les ébauches segmentaires en 14 parasegments (*even-skipped* et *fushi tarazu*).
- 3) Les gènes de polarité segmentaire, induits par les gènes pair-rule, sont impliqués dans la polarité antéro-postérieure de chaque parasegment (*engrailed* : *en*, *wingless* : *wg*, *Hh*).

Les trois catégories de gènes zygotiques, ainsi que les gènes maternels, sont capables de réguler l'expression des gènes homéotiques qui sont responsables de l'identité de chaque segment (*antennapedia* ou *bithorax*)(Fig. 7a).

La segmentation de l'embryon est un processus qui peut être étudié en analysant la cuticule de l'embryon. En effet, c'est d'ailleurs grâce au crible de Nüsslein-Volhard et Wieschaus, basé sur l'analyse de la cuticule, que le gène *hh* a été découvert.

Sur la face ventrale de l'embryon, la cuticule peut être nue ou dotée de denticules (Fig. 7b). Le phénotype de la cuticule est contrôlée par la régulation fine de l'expression des gènes *wg*, *en*, *hh* et bien d'autres (Sanson et al., 2001). Les cellules qui expriment Hh et Wg sont situées, de part et d'autre de la limite entre 2 parasegments : Hh est en position antérieure d'un parasegment et Wg en position postérieure du parasegment précédent (Baker, 1987 ; Mohler et Vani, 1992). Il est à noter que l'expression d'*hh* est initiée par le facteur de transcription En. La molécule Hh diffuse et va agir sur les cellules du compartiment antérieur où la transduction du signal va aboutir à l'expression de *wg*. La protéine Wg va, à son tour, agir sur les cellules postérieures en activant et en maintenant l'expression d'Hh (Fig. 7c).

Cette boucle de rétro-contrôles mutuels permet de restreindre l'expression des protéines Hh et Wg dans deux territoires différents (DiNardo et al., 1988 ; Martizez Arias et al., 1988). Dans la segmentation de l'embryon, Hh agit de deux manières. Il est responsable de la formation de 3 denticules en activant ses gènes cibles dans les cellules postérieures du segment mais également du développement de la cuticule nue en agissant sur Wg dans les cellules antérieures du segment (Sanson, 2001).

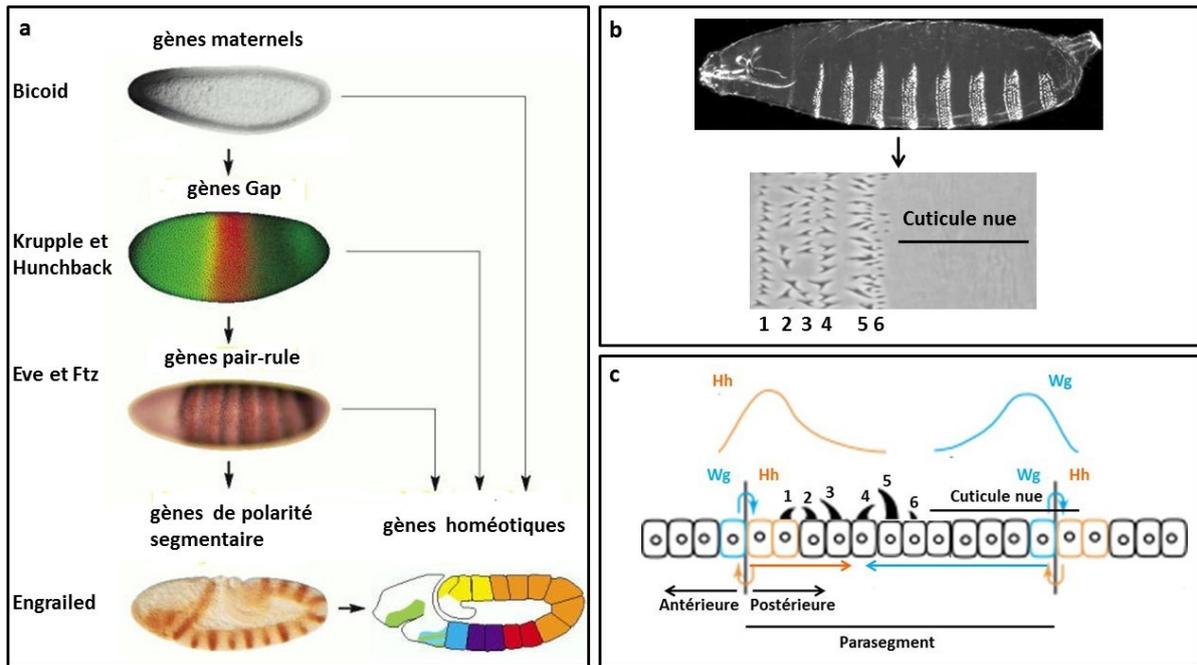


Fig. 7 : La segmentation de l'embryon

a) Régulation hiérarchique entre les gènes maternels, les gènes gap, les gènes pair-rule, les gènes de polarité segmentaire et les gènes homéotiques. Image montrant l'expression représentative de gènes de chacune des catégories, révélée par le marquage des protéines produites (Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., New York: Garland Science; 2002).

b) En haut, vue latérale d'une cuticule d'embryon de drosophile. En bas, profil ventral de la cuticule d'un parasegment (Hatini et DiNardo, 2001).

c) Hh et Wg sont produits par des cellules voisines et maintiennent leurs expressions dans des territoires différents. Hh diffuse dans les cellules postérieures du segment où l'activation de ses gènes cibles permet de définir les denticules 1, 2, 3. Wg diffuse dans les cellules antérieures du segment dans lesquelles sa signalisation active les gènes cibles impliqués dans la formation des denticules 4, 5, 6 et de la cuticule nue (image adaptée à partir de Hatini et DiNardo 2001).

D'un point de vue général, la régulation fine entre deux voies de signalisation est un processus biologique qui définit la frontière entre deux compartiments (Dahmann et Basler, 1999). L'expression différentielle de gènes permet aux cellules d'acquérir une identité spécifique du compartiment auquel elles appartiennent. Par exemple, le long de l'axe antéro-postérieur, les cellules du compartiment postérieur sont caractérisées par l'expression du gène *engrailed*. En engendrant l'expression d'Hh dans ces cellules, qualifiées de « cellules productrices », qui diffuse selon un gradient de concentration dans le compartiment antérieur où se trouvent « les cellules réceptrices » du signal (Fig. 8).

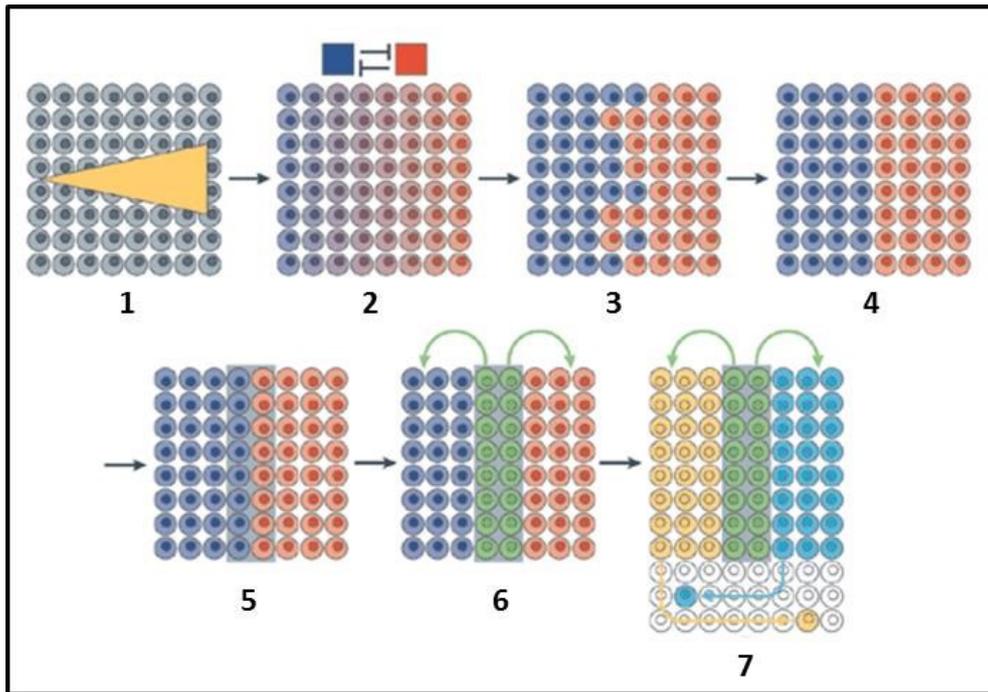


Fig. 8 : Modèle pour la formation de la frontière entre deux compartiments

Un groupe composé de cellules identiques est d'abord polarisé grâce à l'action d'un gradient de concentration (jaune ; 1) aboutissant à l'expression de deux facteurs de transcription, par exemple Ci et Pangolin (rouge/bleu ; 2). Des rétro-contrôles mutuels entre ces deux compartiments permettent la formation de deux populations cellulaires distinctes qui sont séparées par une frontière approximative (3). Des processus biologiques permettent d'affiner l'interface entre les deux compartiments (4). Par exemple, la perte d'adhésion ou l'expression de marqueurs spécifiques de la frontière (5) ont été montrées comme cruciaux pour définir la limite entre deux compartiments. Les cellules de la frontière (vert ;6) expriment des signaux dont le rôle est de déterminer les destinées des cellules appartenant aux territoires adjacents (jaune et turquoise). Des cellules ayant déjà acquises leur identité peuvent traverser la frontière (7).

Cette compartimentalisation se retrouve notamment dans le développement du disque imaginal de l'aile que je vais à présent décrire.

1.1.4.2 Le développement du disque imaginal de l'aile aboutissant à l'aile chez l'adulte.

Chez la larve, il existe des structures, appelées des disques imaginaires, dont le rôle est de former les différents organes de l'adulte après la métamorphose. Ces disques sont des groupes de cellules épithéliales qui apparaissent au cours de l'embryogénèse en concomitance avec la segmentation embryonnaire (Fig. 9a). Ils croissent durant les stades larvaires, jusqu'à subir un renversement de leur structure (évagination) pendant la métamorphose, afin d'aboutir au développement des appendices (Lewis I Held, 2002; Fig. 9b).

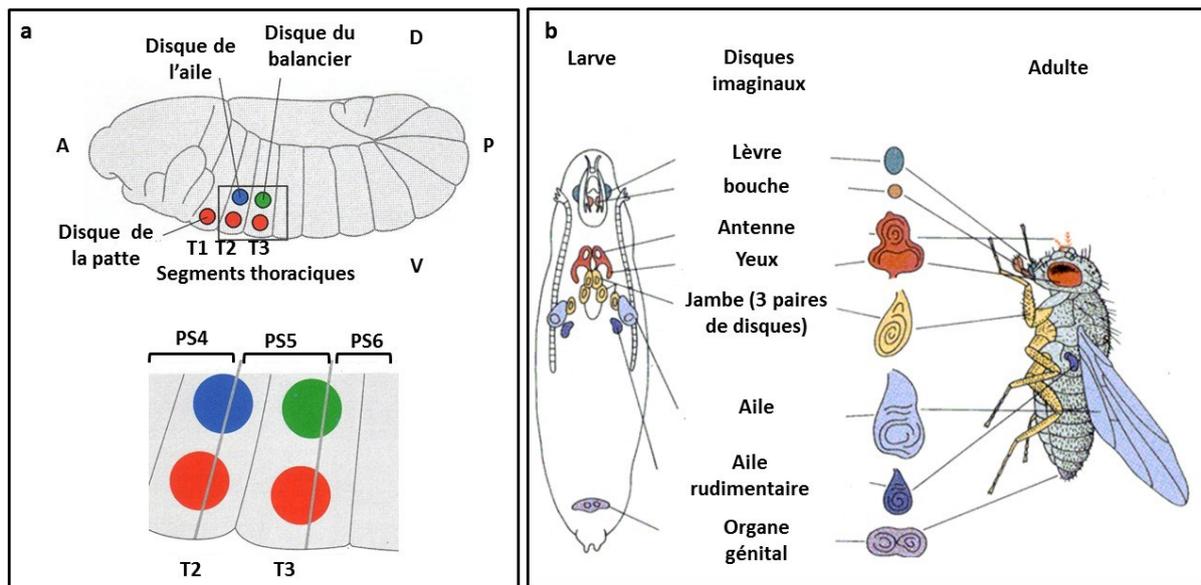


Fig. 9 : Représentation schématique des disques imaginaux à différents stades du développement de la drosophile

a) Image montrant le positionnement des disques imaginaux à cheval entre deux parasegments (PS) dans l'embryon.

b) Schéma illustrant les disques imaginaux présents chez la larve, et les organes qui en résultent chez l'adulte (<http://www.aw-bc.com/mathews/ch28/fi28p45htm>).

Durant ma thèse, j'ai étudié le mécanisme aboutissant à la transduction du signal Hh en utilisant le disque imaginal de l'aile comme modèle. Au sein de ce disque, il existe une structure, le « pouch » ou poche, qui donnera l'aile adulte après la métamorphose (Fig. 10.A). Les cellules du compartiment postérieur (cellules productrices) produisent Hh, qui va diffuser dans le compartiment antérieur sous forme de gradient permettant l'activation différentielle de ses gènes cibles (Lawrence et Struhl, 1996; Fig. 10B). En fonction de la quantité reçue, qui est liée à la position des cellules réceptrices par rapport à la source d'Hh, différents gènes vont être exprimés dans le compartiment antérieur.

→ Les cellules proches de la frontière antéro-postérieure reçoivent des hauts niveaux d'Hh et vont exprimer les gènes *engrailed (en)* et *patched (ptc)*. Ces gènes sont définis comme des gènes activés à courte distance car ils nécessitent les hauts niveaux d'Hh pour s'exprimer.

→ Les cellules situées plus antérieurement dans le compartiment antérieur perçoivent des doses intermédiaires d'Hh et activent les gènes activés à une distance intermédiaire à l'instar de *collier (col)* (Crozatier et al., 2002).

→ Les cellules encore plus éloignées dans le compartiment antérieur sont soumises à de faibles concentrations d'Hh et contrôlent les gènes activés à longue distance comme *decapentaplegic (dpp)* et *iroquois (iro)* (Ingham et McMahon, 2001).

Ces activations différentielles de gènes dans le compartiment antérieur ainsi que les cellules du compartiment postérieur permettent la formation stéréotypée de l'aile de drosophile qui est composée de 5 veines. Du compartiment postérieur sera formé le domaine présomptif de la veine 4 à l'extrémité postérieure alors que du compartiment antérieur sera formé

l'espace entre veines 1 et 4. Ainsi la veine 4 est positionnée à la frontière entre les deux compartiments (De Celis, 2003, Fig. 10C). La signalisation Hh est requise pour déterminer l'espace entre les veines 3 et 4. L'espace entre ces veines est réduit dans des mutants « perte de fonction », alors qu'il est augmenté dans des mutants « gain de fonction » en comparaison de l'aile sauvage (Basler et Struhl, 1994; Fig. 10D).

Ainsi le disque imaginal de l'aile constitue un excellent modèle pour étudier les mécanismes de transduction de la voie Hh. D'ailleurs, des cellules provenant du disque ont été isolées et immortalisées (Cl8 : clone 8), et sont utilisées dans mon laboratoire afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette voie de signalisation *in vitro* par des expériences de biochimie (Therond et al., 1996).

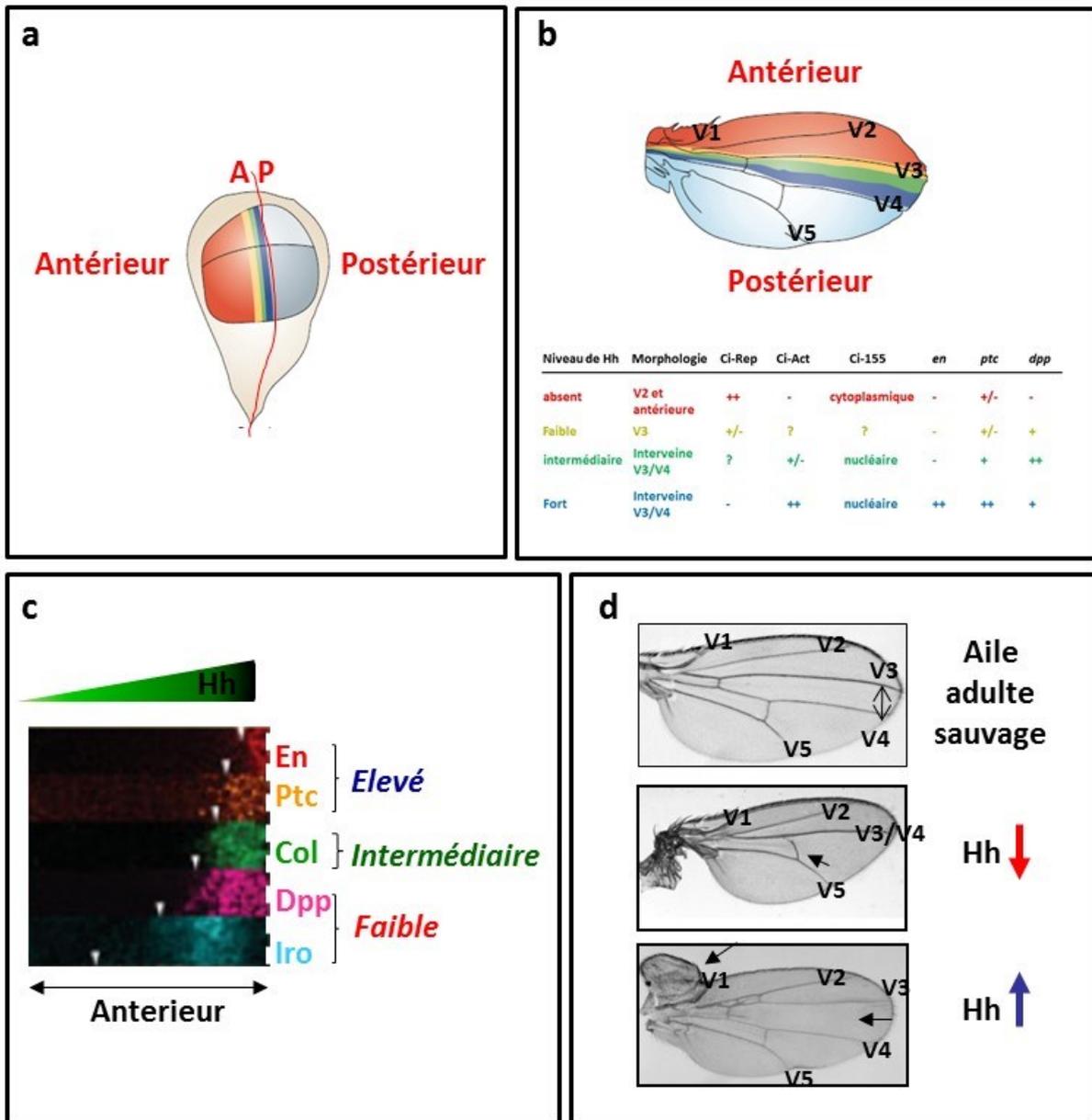


Fig. 10 : La fonction d'Hh dans le développement du disque imaginal de l'aile chez la drosophile

a) Représentation schématique d'un disque imaginal de l'aile. Les cellules productrices du signal dans le compartiment postérieur sont représentées en bleu clair. Le compartiment antérieur peut être divisé en cellules qui reçoivent de forts niveaux d'Hh (Bleu foncé), des niveaux intermédiaires (vert), des faibles niveaux (jaune), et cellules qui ne reçoivent pas de signal (rouge).

b) L'activation correcte de la voie Hh conduit à la formation d'une aile qui est représentée ici avec le même code couleur que dans le disque imaginal de l'aile afin de montrer la correspondance entre l'expression des gènes cibles de la voie et la morphogénèse de l'aile adulte. Le tableau montre la correspondance entre les niveaux d'Hh dans le disque, la morphologie de l'aile, l'isoforme du facteur de transcription *cubitus interruptus* (*ci*) de la voie Hh et l'activation des gènes cibles (Hooper, 2003).

c) Activation différentielle des gènes cibles en fonction de la dose d'Hh reçue. *en* (rouge) et *ptc* (orange) sont exprimés pour des niveaux élevés d'Hh, *collier* (vert) pour un niveau intermédiaire d'Hh et *dpp* (rose) ainsi qu'*iro* (bleu) pour de faibles niveaux d'Hh (Torroja et al., 2005).

d) Si la protéine Hh est moins exprimée durant le développement, l'espace entre les veines 3 et 4 est réduit (indiquée par une flèche) alors que son activation aberrante conduit à l'augmentation de l'espace entre les veines 3 et 4 et à une excroissance côté ventral (voir flèches).

1.2 Hedgehog au cours de la vie adulte

Durant le développement, le signal Hh intervient dans de nombreux processus biologiques dont la segmentation du corps et la formation des organes (section 1.1). Chez l'adulte, la voie de signalisation Hh est la plupart du temps silencieuse, et peu de fonctions lui sont attribuées, exceptée son rôle dans l'homéostasie et la réparation tissulaire chez les vertébrés. Récemment au laboratoire, Andrew Rallis a découvert un rôle d'Hh dans le vieillissement chez la drosophile adulte (Annexe : 1.2). En revanche, une activation aberrante de la voie Hh conduit à la formation de différents types de cancers, dans lesquels l'expression d'Hh entraîne la prolifération et la différenciation non contrôlée des cellules, ou bien accélère la croissance tumorale.

1.2.1 Le rôle d'Hh dans le maintien et la réparation tissulaire

1.2.1.1 Définition

Par définition, un tissu est un ensemble de cellules qui ne sont pas forcément identiques mais qui sont issues de la même origine. Ces cellules sont regroupées en amas, faisceau ou réseau et forme un ensemble fonctionnel, c'est-à-dire qu'elles exercent la même fonction. Il existe 4 grandes catégories de tissus : épithéliaux, conjonctifs et de soutien, musculaires et nerveux. Quel que soit la catégorie auquel il appartient, la détermination d'un tissu adulte nécessite les mêmes mécanismes biologiques : la multiplication, la résorption et la spécification des cellules primitives au cours du développement.

Au sein d'un tissu se trouve des cellules différenciées dites fonctionnelles, et des cellules indifférenciées (cellules souches), qui servent de réserve aux cellules différenciées. En effet, durant la vie adulte, les cellules différenciées ont une durée de vie limitée et sont éliminées

par apoptose (Alenzi, 2004). Elles vont être remplacées par les cellules indifférenciées, conduisant au renouvellement cellulaire. Pendant ce processus, les cellules indifférenciées vont, d'une part se différencier pour reconstituer les cellules différenciées, et d'autre part se diviser par mitose afin de conserver le pool de cellules souches constituant le tissu. Ainsi, le tissu se renouvelle et se reconstitue à l'identique en fonction de ses besoins. Il s'agit de l'homéostasie cellulaire.

En cas de lésions, causées par des agressions diverses ou par des réactions inflammatoires, les cellules affectées sont éliminées par nécrose (Hausmann, 2003) ou nécroptose (nécrose programmée, Vanden Berghe et al., 2014), et le processus de réparation tissulaire est enclenché. Ce dernier permet au tissu de retrouver son architecture et sa fonction. Il se caractérise par deux composantes : la régénération, c'est-à-dire le renouvellement des cellules souches (décrite plus haut) et la cicatrisation. Le rôle de la cicatrisation est de redonner une stabilité au tissu lésé en induisant la formation de tissu conjonctif, responsable de la déposition de cicatrices.

1.2.1.2 Le rôle de Shh dans l'homéostasie et la réparation tissulaire.

De nombreuses études indiquent que Hh est impliqué dans les processus d'homéostasie et de réparation tissulaire en régulant par exemple le renouvellement des cellules souches. Grâce à l'utilisation d'expériences de lignage cellulaire *in vivo*, Ahn et Joyner en 2005 ont montré que la voie de signalisation Shh est activée dans les cellules souches neurales de l'hippocampe. Ces cellules souches neuronales peuvent s'auto-renouveler et se différencier afin de fournir les neurones nécessaires au fonctionnement du cerveau (Ahn et Joyner, 2005). Le rôle de Shh sur le renouvellement des cellules souches est dû à son action sur diverses protéines. En association avec des cytokines, Shh est capable de réguler l'expression des BMP-4 (« Bone Morphogenetic Protein 4 »), qui sont impliquées dans la prolifération et différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Bhardwaj et al., 2001). Il peut également agir sur le gène polycomb *Bmi-1* afin d'assurer le renouvellement des cellules souches mammaires (Liu et al., 2006). Enfin, Shh régule la prolifération des cellules souches embryonnaires de souris en contrôlant la concentration de calcium intracellulaire ainsi que l'activité des voies de signalisation de la PKC (« Protein Kinase C ») et d'EGFR (« Epidermal Growth Factor Receptor ») (Heo et al., 2007).

En plus de son rôle dans le renouvellement des cellules souches, mécanisme important à la fois pour l'homéostasie et la réparation tissulaire, Shh intervient également dans la cicatrisation, deuxième composante du processus de réparation tissulaire. Ce processus induit la formation de tissu conjonctif qui requiert l'action conjointe de différents types cellulaires dont les fibroblastes (Wagner et Wehrmann, 2007). La migration des fibroblastes, induite par l'expression des bFGF (« basic Fibroblast Growth Factor »), joue un rôle central dans la cicatrisation. Cependant, le mécanisme par lequel les FGF régulent la migration des fibroblastes n'est pas bien compris. En séquençant des ARNs de fibroblastes stimulés par des bFGF, Zhu et al., en 2017 ont identifié les gènes de la voie Hh comme étant

régulés par les bFGF. A l'instar des bFGF, Hh est capable d'induire la migration des fibroblastes *in vitro* et d'accélérer la cicatrisation de plaies *in vivo*. Les effets de Shh sont réprimés par l'utilisation de cyclopaamine, drogue inhibant la voie de signalisation Shh en agissant sur Smoothed, le transmetteur du signal Hh (Smo). De manière intéressante, ils montrent que Shh agit, dans un premier temps, par une voie non canonique. En effet, leurs expériences indiquent que Smo active la voie de signalisation Pi3K/JNK/GSK3 β , voie qui avait été préalablement identifiée comme étant importante dans la migration des fibroblastes (Kanazawa et al., 2010). Le rôle de cette voie est de provoquer l'entrée du facteur de transcription β -catenin dans le noyau afin qu'il régule ses gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, les auteurs ont identifié les gènes appartenant à la voie de signalisation Hh : *Gli1*, *Gli2*, *Gli3*, *Smo*, *Ptc1*, et ont montré que la migration des fibroblastes ainsi que la cicatrisation des plaies sont régulées positivement par Gli1. Cette étude de Zhu et al., de 2007 démontre l'importance de la voie de signalisation Shh dans le processus de cicatrisation et donc dans la réparation tissulaire.

Tout comme dans le processus de renouvellement des cellules souches, Hh peut agir par d'autres mécanismes que celui de la voie Pi3K/JNK/GSK3 β / β -catenin afin d'assurer la cicatrisation. Une publication récente indique que Hh peut augmenter la cicatrisation de la peau *via* une régulation d'un micro ARN (micro ARN 200) (Na Suh et Jae Han, 2014).

L'ensemble de ces études confère un rôle de la voie Shh dans les mécanismes d'homéostasie et de réparation tissulaire (Fig. 11). Malheureusement, le dysfonctionnement de l'un ou l'autre de ces processus est impliqué dans de nombreux cancers (Beachy et al., 2004). C'est pourquoi, la dérégulation de la voie Hh est associée au développement de différents cancers que je vais décrire dans le chapitre suivant.

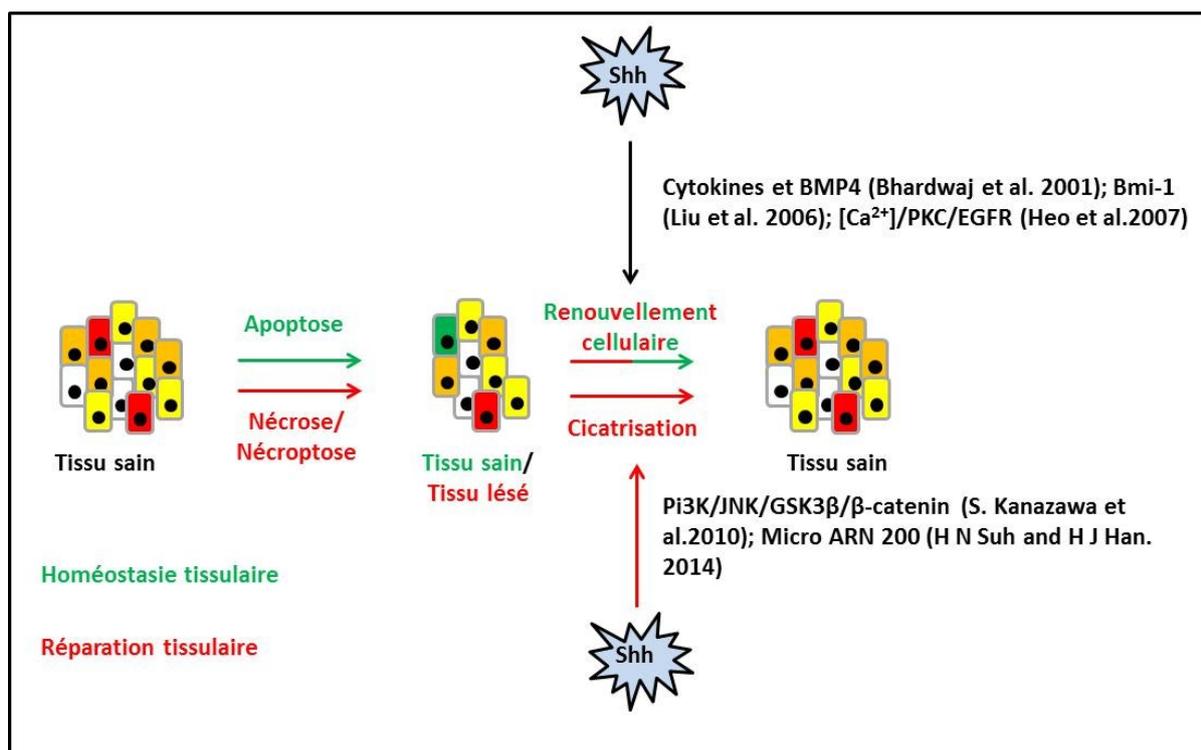


Fig. 11 : L'implication de la voie Hh dans l'homéostasie et la réparation tissulaire

Un tissu sain se compose de cellules différenciées représentées en orange, jaune et blanc ainsi que de quelques cellules souches, colorées en rouge. Durant le processus d'homéostasie, certaines cellules souches vont s'activer (carré vert) afin de remplacer les cellules mortes naturellement par apoptose. La voie Shh a été identifiée comme agissant dans le mécanisme de renouvellement des cellules souches, notamment en agissant sur diverses molécules : cytokines, BMP-4, Bmi-1, Ca²⁺, PKC et EGFR. Suite à une blessure, les cellules meurent par nécrose ou nécroptose, le tissu lésé va recouvrir son architecture et sa fonction grâce à la réparation tissulaire. Ce processus fait appel au renouvellement cellulaire, mais également à la cicatrisation où Shh intervient en entraînant la voie de signalisation Pi3K/JNK/GSK3β/β-catenin ou en jouant sur l'expression du micro ARN 200.

1.2.2 Hedgehog et Cancer

La voie Shh est l'une des voies de signalisation la plus retrouvée dans les cancers chez l'homme. La dérégulation de cette voie induit une prolifération ou différenciation des cellules inappropriées, et/ou une croissance tumorale excessive. C'est en 1996 que le premier lien entre les cancers et la voie Hh a été fait. Une activation aberrante de cette dernière est responsable du développement de carcinomes basocellulaires (BCCs : « basal cell carcinoma ») et de médulloblastomes. Depuis, la voie Shh a été impliquée dans différents types de cancers tels que le cancer des poumons, du sein, du pancréas et de la prostate. Afin d'expliquer le rôle de Shh dans la formation de cancers, cinq modèles ont été proposés (Scales et Sauvage, 2009): les cancers de type I (activation indépendante du ligand), les cancers de type II (activation autocrine ou juxtacrine dépendante du ligand), les cancers de type IIIa (activation paracrine dépendante du ligand), les cancers de type IIIb (activation paracrine inverse dépendante du ligand), les cancers des cellules souches (Fig. 12).

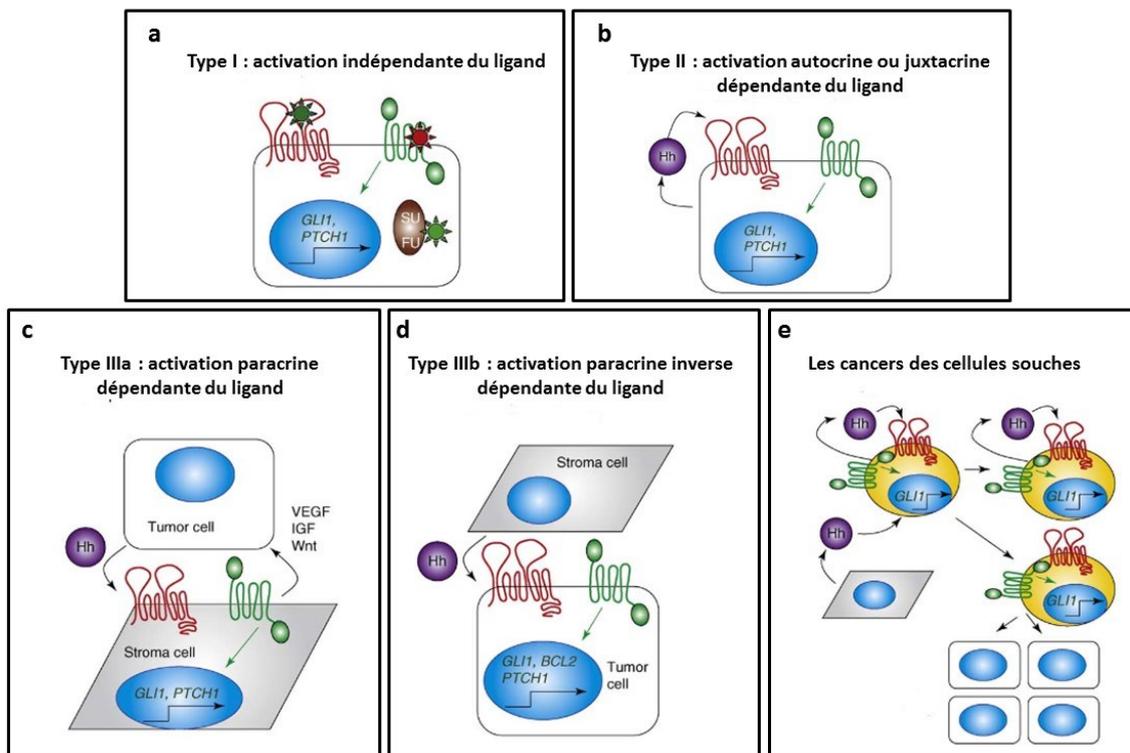


Fig. 12 : L'implication de la voie Hh dans les différents types de cancers

a) Cancers de type I (ligand indépendant), caractérisés par des mutations des composants de la voie Hh comme Smo, Ptc, Sufu et Gli.

b) Cancers de type II (ligand dépendant) : le ligand est produit par la cellule tumorale et agit sur la cellule productrice (activation autocrine) ou sur une cellule voisine (activation juxtacrine).

c) Cancers de type IIIa (ligand dépendant) : le ligand est sécrété par la cellule tumorale et fait son action au niveau de la cellule stromale (activation paracrine). En réponse, cette dernière produit des signaux responsables de la croissance et la survie de la tumeur.

d) Cancer de type IIIb, (ligand dépendant) : la cellule stromale produit le ligand qui va activer la voie Hh dans la cellule tumorale (activation paracrine inverse).

e) Cancers des cellules souches : la voie de signalisation est activée uniquement dans les CSCs. Le ligand provient soit d'une cellule stromale (paracrine), soit de la CSC elle-même (activation autocrine). Un sous-groupe de CSCs se différencie en cellules tumorales qui n'expriment pas la voie Hh. Ces cellules tumorales constituent la plus grande partie de la tumeur.

Tout d'abord, je décrirai ces différents types de cancers, puis dans une deuxième partie, je parlerai des inhibiteurs de la voie Hh générés afin de lutter contre ces cancers.

1.2.2.1 Les modèles d'implication de la voie Hh dans les différents types de cancers

Les cancers de type I : activation indépendante du ligand (Fig. 12a)

Ces cancers sont causés par des mutations des composants de la voie Hh qui confèrent une croissance intrinsèque plus efficace ainsi que des propriétés de survie accrues à la tumeur. Un exemple pour le cancer de type I est le syndrome de Gorlin, dû à une mutation « perte de fonction » du gène *ptc*, récepteur de *shh* (Hahn et al., 1996). Les principaux symptômes de ce syndrome sont le développement de BCCs et une prédisposition à générer d'autres types de cancers comme les médulloblastomes (tumeur du cervelet) ou les rhabdomyosarcomes (tumeurs des muscles striés). De manière générale, des mutations « perte de fonction » pour *sufu* ou « gain de fonction » pour *smo* et des amplifications des facteurs de transcription de la voie Shh comme Gli1 ou Gli 2 ont été décrites dans les cancers de type I. Afin de cibler ces types de cancers, les inhibiteurs développés doivent soit cibler Smo soit viser des composants du signal situés en amont ou en aval de Smo, selon le gène défectueux.

Les cancers de type II : activation autocrine ou juxtacrine dépendante du ligand (Fig. 12b)

Ces cancers se développent suite à une expression anormale d'Hh qui agit de façon autocrine sur la cellule tumorale. La prolifération et la survie des cellules sont favorisées par l'action d'Hh, augmentant ainsi la croissance tumorale. Dans ces cancers, il n'y a pas de mutations des composants de la voie Hh. Les cancers de type II peuvent se former dans l'estomac (Berman et al., 2003), les poumons (Watkins et al., 2003), le pancréas (Thayer et al., 2013; Berman et al., 2003) et la prostate (Karhadkar et al., 2004). La stratégie thérapeutique visant ce type de cancer consiste en l'utilisation d'inhibiteurs de la voie tels que les anticorps anti-Shh ou les antagonistes de Smo.

Les cancers de type IIIa : activation paracrine dépendante du ligand (Fig. 12c)

Ces cancers sont similaires à ceux du type II, puisque Shh est exprimé par les cellules tumorales. Mais, au lieu d'agir sur les cellules responsables de sa sécrétion, Shh va aller agir de manière paracrine sur les cellules stromales environnantes (Yauch et al., 2008). Ces dernières vont réagir en produisant des facteurs de croissance afin de maintenir la croissance ou la survie de la tumeur. Parmi ces facteurs de croissance se trouve l'IGF, facteur

de croissance analogue à l'insuline ou bien le VEGF (facteur de croissance vasculaire endothéliale). Pour traiter ces tumeurs, il faut cibler à la fois les cellules du stroma, avec des inhibiteurs de la voie Hh, et les cellules tumorales par l'utilisation d'autres médicaments (Theunissen et de Sauvage, 2009).

Les cancers de type IIIb : activation paracrine inverse dépendante du ligand (Fig. 12d)

Dans ces cancers, Shh est cette fois-ci secrété par les cellules stromales et va aller agir sur les cellules tumorales. Ce mécanisme d'activation paracrine inverse a été observé dans les hémopathies malignes comme le myélome multiple, le lymphome et la leucémie. Dans ces cancers, Shh induit l'expression de molécules anti-apoptotique Bcl-2 qui permet la survie des cellules B cancéreuses (Dierks et al., 2007; Hegde et al., 2008).

Les cancers des cellules souches (Fig.12e)

Les cellules souches cancéreuses (CSCs : « Cancer Stem Cells ») sont des cellules, qui à l'instar des cellules souches des tissus sains, peuvent s'auto-renouveler pour maintenir leur nombre constant et se différencier afin de générer différents types de cellules spécialisées. Les voies de signalisation Wnt, Shh, BMP et Notch contrôlent ces processus pour les cellules cancéreuses comme pour les cellules saines. La dérégulation de l'une ou plusieurs de ces voies est responsable de la prolifération non contrôlée de ces cellules souches et de la formation de tumeur. Des études récentes ont montré que la voie de signalisation Shh stimule les CSCs dans le sein (Liu et al., 2006) et le myélome multiple (Peacock et al., 2007). En effet, les CSCs expriment des hauts niveaux de Gli, révélant une hyper activation de la voie Shh pouvant être due à une action autocrine ou paracrine de Shh (Clement et al., 2007). Les CSCs sont résistantes aux chimiothérapies et aux radiations, et elles sont ainsi souvent la cause d'une rechute après une rémission. Cependant, l'implication d'Hh dans le développement des CSCs ouvre un nouveau champ thérapeutique pour éliminer ces cellules en utilisant par exemple des inhibiteurs de cette voie.

1.2.2.2 Les inhibiteurs de la voie Shh

Comprendre la façon dont la voie de signalisation Hh intervient dans la formation de cancers permet d'adopter une stratégie thérapeutique efficace et adaptée au type de cancers à éliminer. Le but de la thérapie est de synthétiser des molécules, ici des inhibiteurs de la voie Shh, qui sont capables de bloquer la prolifération constitutive causée par la dérégulation du signal Shh.

La cyclopamine, alcaloïde issu de la plante *Veratum Californicum*, est le premier inhibiteur connu de la voie Hh. Il a été découvert suite à l'observation d'agneaux qui souffraient de cyclopie. Il s'est avéré que leur mère avait mangé la plante contenant la cyclopamine pendant sa gestation (Keeler, 1969). Ce composé inhibe la voie Shh en se fixant sur Smo et entraîne l'apparition d'un syndrome caractéristique d'une inhibition de la voie Shh, l'holoprosencéphalie (Chen et al., 2002). Néanmoins, les propriétés pharmacologiques ainsi que la biodisponibilité de la cyclopamine, font de cette substance naturelle une drogue peu

active dans le traitement des cancers. De ce fait, des substances chimiques ont été synthétisées comme SANT1, SANT4, CUR-61414, HhAntag-691, le GDC-0449, MK4101, IPI-926 et BMS-833923. Ces dérivés ont été testés en études précliniques, et affichent une inhibition efficace de Smo dans les BCC et les médulloblastomes (Robarge et al., 2009; Tremblay et al., 2009). D'autres essais cliniques ont permis de révéler des effets positifs pour des drogues ciblant la voie Shh en amont de Smo. Il s'agit par exemple de l'anticorps 5E1 qui empêche la liaison de Shh à son récepteur Ptc (Scales et Sauvage, 2009). A cela, s'ajoutent également des molécules pouvant viser d'autres membres de la voie Hh à l'instar des inhibiteurs naturels qui miment les Hip et Sufu (régulateurs négatifs de la voie) ou bien des agents qui bloquent l'activité de Gli1 comme Gant 61 et Gant 58 (Lauth et Bergström, 2007). Certaines molécules peuvent même se lier directement à Shh pour contrecarrer son action, comme la robotnikine, petite molécule découverte lors d'un crible à microarray (Stanton et al., 2009).

Etant donné le rôle de Shh dans le développement de cancers, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la voie de signalisation Shh est nécessaire afin de développer une thérapie efficace et adaptée visant à stopper la prolifération des cellules cancéreuses. Ces inhibiteurs de la voie Shh ont d'ailleurs un intérêt pour les biologistes puisqu'ils permettent de bloquer la voie à certaines étapes, et ainsi de mieux élucider les interactions et relations entre chaque composant du signal Hh (Fig. 13).

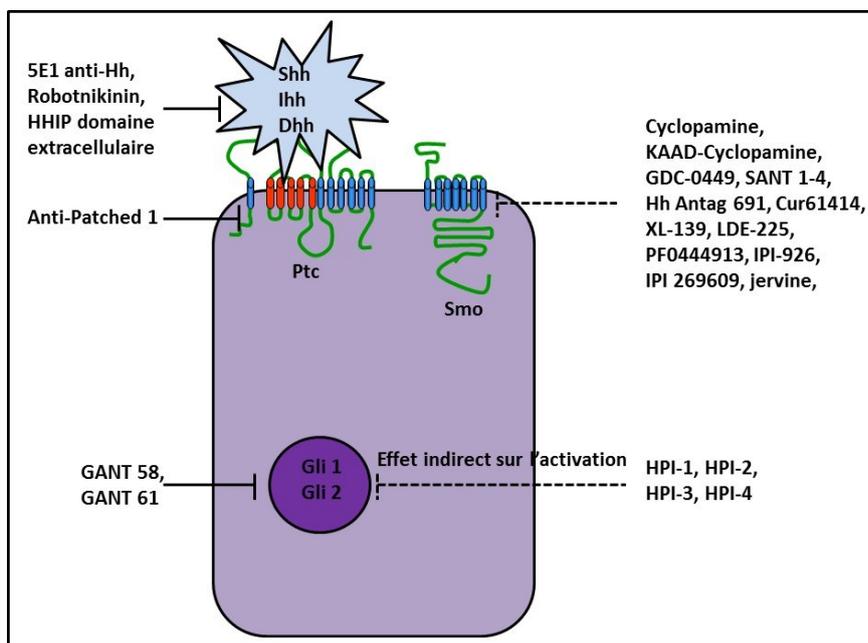


Fig. 13 : Les protéines de la voie Hh comme cible thérapeutique dans les cancers

Schéma illustrant le mode d'action des molécules inhibitrices de la voie Hh. Ces molécules peuvent cibler Shh/Ihh/Dhh, Smo, Ptc ou Gli 1/Gli 2 afin d'empêcher la suractivation de la voie Shh qui favorise la survie et la croissance tumorale.

Au laboratoire, nous utilisons la drosophile comme modèle d'étude afin d'éclaircir les zones d'ombre dans le mécanisme d'action de ce morphogène. La plupart des protéines et mécanismes de régulation sont conservés au cours de l'évolution. Une connaissance approfondie de ce signal chez les invertébrés permettra de mieux comprendre les processus de développement et les pathologies dues aux dysfonctionnements de cette voie chez les vertébrés.

Chapitre 2 : Les mécanismes moléculaires de la voie de signalisation Hedgehog

La voie de signalisation Hh est caractérisée par deux mécanismes majeurs :

La maturation, la sécrétion et la diffusion d'Hh. Ce chapitre fera l'objet d'une description non exhaustive.

La réception et la transduction du signal Hh. Ce mécanisme sera décrit plus en détail, étant donné que ma thèse a pour but de mieux comprendre les conséquences de l'activation de la voie Hh sur la structure et la fonction du complexe de transduction.

Au laboratoire nous utilisons le disque imaginal de l'aile de drosophile pour étudier les mécanismes moléculaires de la voie Hh. En effet, Hh est impliqué dans la détermination et la formation des structures antéro-postérieures de l'aile adulte. Tous les mécanismes moléculaires que je vais développer dans le chapitre suivant sont également valables dans les autres tissus (segmentation de l'embryon et développement des disques imaginaires) où la voie Hh agit comme morphogène. De plus, la voie Hh étant conservée au cours de l'évolution, une grande partie de ses mécanismes moléculaires est similaire entre les invertébrés et les vertébrés comme je le montrerai dans le chapitre 3. **Les cellules**

productrices Dans le compartiment postérieur du disque imaginal de l'aile se trouvent les cellules productrices qui sont responsables de la maturation et de la sécrétion d'Hh. Une fois produit, Hh doit réussir à traverser la matrice extracellulaire afin d'atteindre les cellules capables de percevoir le signal Hh, cellules réceptrices définissant le compartiment antérieur.

2.1.1 La maturation et la sécrétion d'Hh

2.1.1.1 La maturation

La protéine Hh est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur de 471 acides aminés. Ce précurseur possède un domaine N-terminal portant la fonction morphogénétique de la molécule et un domaine C-terminal doté d'une fonction auto-protéolytique. Grâce à son activité enzymatique, le fragment C-terminal va permettre le clivage d'Hh dans le réticulum endoplasmique en deux fragments, un fragment Hh-N et un fragment Hh-C (Chen et al., 2011; Lee et al., 1994). Pendant le clivage protéolytique, une molécule de cholestérol va être additionnée à l'extrémité C-terminale du fragment Hh-N (Hh-Np) (Porter et al., 1996). Le fragment Hh-N peut subir une autre modification lipidique, il s'agit d'un acide palmitique en N-terminal (Pepinsky et al., 1998) (Fig. 14). Le rôle de ces modifications lipidiques, qui sont spécifiques au morphogène Hh, a fait l'objet de beaucoup d'études qui se poursuivent à l'heure actuelle.

Chez la drosophile, la fixation du cholestérol à Hh (Hh-Np) est essentielle pour limiter sa diffusion puisqu'une forme non liée au cholestérol (Hh-N) diffuse à plus grande distance que la forme Hh-Np (Burke et al., 1999). Cependant, chez les mammifères, une étude dans le bourgeon du membre de souris montre que l'absence du cholestérol dans Shh entraîne la perte de l'activation des gènes cibles à longue distance, suggérant un rôle du cholestérol dans la diffusion d'Hh (Lewis et al., 2001). Ces deux observations contradictoires ont été réconciliées par des expériences menées à la fois en cellules de mammifères (Zeng et al., 2001) et chez la drosophile (Gallet et al., 2003). Ces études démontrent que le cholestérol est impliqué dans la formation de multimères d'Hh, structures qui favorisent la diffusion et ainsi l'activation des gènes cibles à longue distance.

En plus du cholestérol, le fragment Hh-N possède un acide palmitique en N-terminal. L'ajout de cette deuxième modification lipidique est permis par une acyl-transférase qui a été identifiée simultanément par quatre groupes, lui donnant quatre noms différents : *sightless (sit)*, *skinny hedgehog (sky)*, *rasp* et *central missing (cmn)* (Amanai et Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Lee et Treisman, 2001; Micchelli et al., 2002). Ces quatre équipes ont montré que l'acide palmitique est nécessaire à l'activation des gènes cibles de la voie Hh dans le disque imaginal de l'aile et chez l'embryon en invalidant cette enzyme. Chez les mammifères, à l'instar du cholestérol, l'acide palmitique est nécessaire pour former des multimères, permettant une action à longue distance de Shh (Chen et al., 2004). Ainsi, le cholestérol et l'acide palmitique jouent un rôle essentiel dans la diffusion et l'activité d'Hh (se référer à la section 2.1.2).

2.1.1.2 La sécrétion

Une fois mûr, le morphogène Hh doit être sécrété à partir des cellules productrices. La protéine Dispatched (Disp), découverte au cours d'un crible génétique chez la drosophile, a été montrée comme protéine essentielle pour la sécrétion d'Hh. Disp est une protéine à douze segments transmembranaires qui possède un domaine de fixation aux stérols (« SSD : Sterol Sensing Domain »), domaine retrouvé dans des protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol (Burke et al., 1999). La perte de *disp* récapitule un phénotype de « perte de fonction » d'Hh dans les embryons et les ailes d'adulte de la drosophile (Burke et al., 1999). Dans les disques mutants pour *disp*, Hh n'est pas sécrété et s'accumule à la membrane plasmique des cellules productrices. Les cellules proches de la frontière antéro-postérieure (A/P) sont toujours capables de recevoir le signal Hh (probablement par un mécanisme de contact cellulaire), alors que les cellules loin de l'A/P ne perçoivent pas Hh, suggérant un rôle de Disp dans l'activation des gènes à longues distances (Burke et al., 1999). De manière intéressante, Disp n'est pas nécessaire à la maturation d'Hh, puisque dans les mutants Disp, Hh est clivé normalement (Burke et al., 1999; D'Angelo et al., 2015). Cependant, le mécanisme fonctionnel de Disp sur Hh reste à être élucidé (fig. 14).

D'autres gènes impliqués dans la sécrétion d'Hh ont été découverts, notamment le gène *scube2* chez le zébrafish. Scube2 est une protéine extracellulaire, appartenant à la famille des glycoprotéines secrétées contenant un peptide signal suivi par deux domaines extra-cellulaires, EGF et CUB (Hollway et al., 2006), semble avoir un rôle dans la voie de signalisation Hh, notamment dans la sécrétion. Des mutants *you* (gène codant pour Scube2) entraînent une diminution de l'activation de la voie Hh (Woods et Talbot, 2005). *In vitro*, l'expression de Scube2 augmente la sécrétion d'Hh, et ceci est probablement médié par la liaison de Scube2 à une molécule de cholestérol d'Hh. De plus, il s'avère que Scube2 agit en synergie avec Disp afin de faciliter la sécrétion d'Hh en permettant le transfert de Shh de Disp à Scube2 (Tukachinsky et al., 2012). Cependant, à l'heure actuelle, aucun homologue de Scube2 n'a été identifié chez la drosophile.

Récemment, une étude faite chez les mammifères a permis l'identification d'une autre protéine impliquée indirectement dans la sécrétion d'Hh, Sortilin-1 (Sort1) (Campbell et al., 2016). Cette protéine appartient à la famille des récepteurs à domaines VPS10P. Par co-immunoprécipitation et en utilisant la technique de « proximity ligation assay » (PLA), ils ont montré que Sort1 interagit avec Shh au niveau de l'appareil de golgi. La surexpression de Sort1 *in vitro* entraîne l'accumulation de Shh au niveau du golgi, et diminue la quantité de SHh sécrétée, suggérant un rôle de séquestration de Sort1 sur Shh. On peut émettre l'hypothèse que Sort1 agit comme une protéine de « contrôle » qui s'assure de la bonne maturation de Shh afin qu'il puisse exercer sa fonction après sa sécrétion et qui régule ainsi le niveau d'Hh produit et sécrété (Fig 14).

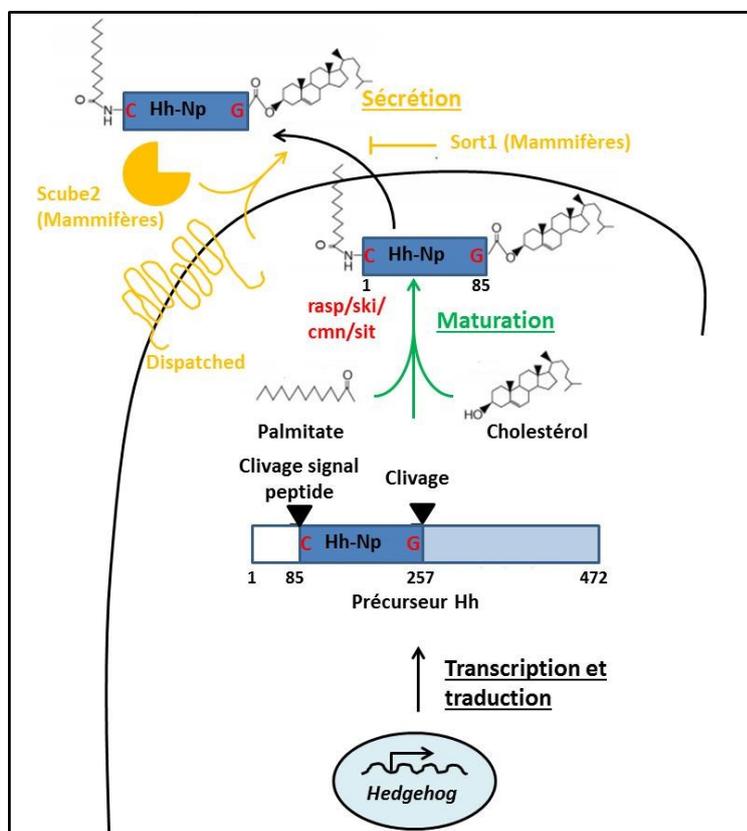


Fig. 14 : La maturation et la sécrétion d'Hh chez la drosophile et les mammifères

Hh est synthétisé sous forme d'un précurseur de 472 acides aminés (aa : « amino acids »). Hh est composé d'un peptide signal (aa de 1 à 85), d'un fragment portant les fonctions morphogénétiques (aa de 85 à 257) et un fragment avec une activité protéolytique (aa de 257 à 472). La maturation d'Hh consiste en un clivage auto-protéolytique par le fragment C, conduisant à l'ajout d'une molécule de cholestérol en C-terminal du fragment N. Un acide palmitique peut être rajouté à l'extrémité N-terminale d'Hh-Np grâce à une enzyme (rasp/ski/cmn/sit). Après ces modifications, la protéine est

fonctionnelle et prête à être sécrétée. Le processus de sécrétion est dépendant de Dispatched. Chez les mammifères, Scube2 a été montrée comme pouvant agir en synergie avec Disp, et Sort1 a été identifiée comme un inhibiteur de la sécrétion (image modifiée à partir de (Guerrero et Chiang 2007; Torroja et al., 2005).

2.1.2 Le mouvement d'Hh

Après sa maturation et sécrétion à partir des cellules productrices, Hh doit circuler à travers l'espace extracellulaire afin de réaliser son action morphogénétique au niveau des cellules réceptrices. Etant donné qu'Hh est capable d'activer soit des gènes à courtes distances (*ptc*, *en*) soit des gènes à longue distance (*dpp*, *iro*), son mouvement est probablement régi par plusieurs procédés. Hh peut agir par simple diffusion en coopérant avec des protéines de la matrice extracellulaire : les protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPGs : « Heparan Sulfate Proteoglycans »), Shifted (*Shf*), et la glycoprotéine Scube2 (« Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2 »). Hh peut également être transporté par divers véhicules (exovésicules, cytonèmes, lipoprotéines). Ces différents modes de diffusion seront évoqués dans le chapitre suivant.

2.1.2.1 La matrice extracellulaire et le mouvement d'Hh

De manière intéressante, il a été montré que Hh diffuse soit sous forme monomérique, responsable de son action à courte distance, ou bien sous forme de multimères, forme favorisant l'activation des gènes à longue distance, probablement en dissimulant les modifications lipidiques (Vincent, 2008; Vyas et al., 2008) (Fig. 15). Quel que soit son état (monomère ou multimère), des protéines de la matrice extracellulaire vont participer à la diffusion d'Hh.

Les HSPGs sont des macromolécules présentes à la surface cellulaire qui sont composées d'un corps protéique auquel est lié un GAG (« Glycosaminoglycan »), c'est-à-dire une chaîne polysaccharidique, de type sulfate d'héparane. La liaison du GAG est permise par trois enzymes chez la drosophile : *tout velu* (*ttv*), *sister of tout velu* (*ttv*) et *brother of tout velu* (*botv*). Des clones « perte de fonction » de *ttv* dans l'antérieur du disque empêche la diffusion d'Hh, indiquant que les HSPGs sont nécessaires au mouvement d'Hh (Bellaïche et al., 1998). Les HSPGs sont classées en trois familles en fonction de la structure de leurs corps protéiques, dans lesquelles les glypicanes ont le corps protéique attaché à la membrane plasmique par un glycolipide de type glycosylphosphatidylinositol (GPI : « glycosylphosphatidylinositol anchor ») (Bernfield et al., 1999; Esko et Selleck, 2002). Chez la drosophile, deux glypicanes ont été identifiés comme jouant un rôle dans la voie de signalisation Hh : Dally (Nakato et al., 1995) and Dally like (*Dlp*; Khare et Baumgartner, 2000). Dans des clones doubles mutants *dally* et *Dlp* situés dans le compartiment postérieur, la voie de signalisation Hh est bloquée (Han et al., 2004), alors que l'activation des gènes cibles à longue distance n'est pas affectée par l'absence de *Dlp* (Gallet et al., 2008). Ces expériences suggèrent des rôles distincts de ces deux glypicanes. Dally est essentiel pour la sécrétion et la diffusion d'Hh, puisqu'il est nécessaire à l'activation des gènes cibles à longue

distance (Ayers et al., 2010) alors que Dlp semble être plus important pour la réception (Desbordes et Sanson, 2003) où il agirait comme co-récepteur pour faciliter l'interaction entre Hh et son récepteur, Ptc (Lum et al., 2003) (Fig. 15). Le rôle de Dlp est décrit dans le paragraphe 2.2.2.2.

Une autre protéine de la matrice extracellulaire, appelée Shifted (sft), a été montrée comme importante dans la stabilisation et le mouvement d'Hh. Des mutations « perte de fonction » pour ce gène entraînent une diminution de l'activation des gènes cibles d'Hh (Glise et al., 2005). Ce même groupe a montré que Sft est capable d'interagir non seulement avec Hh, permettant sa stabilisation, mais également avec la HSPG Dlp (Gorfinkiel et al., 2005). Mais la fonction précise de Sft dans ces interactions reste à définir.

La protéine Scube2, que j'ai déjà décrite dans la partie sécrétion, a aussi été impliquée dans la diffusion d'Hh. En effet, des analyses épistatiques placent Scube2 en amont de Ptc, suggérant un rôle de Scube2 dans le transport ou la stabilité d'Hh dans l'espace extracellulaire (Hollway et al., 2006; Woods et Talbot, 2005).

2.1.2.2 Les transporteurs impliqués dans le mouvement d'Hh

En plus de sa diffusion, *via* les protéines évoquées plus haut, Hh peut se mouvoir dans l'espace extracellulaire, véhiculé par différents transporteurs (lipoprotéines, exovésicules et cytonèmes).

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires composés d'un corps lipidique qui est entouré par une couche de phospholipides, cholestérols et apolipoprotéines (Bolanos-Garcia et Miguel, 2003). Des expériences de colocalisation (Panáková et al., 2005) ainsi que des expériences de centrifugation par gradient de densité (Eugster et al., 2007) ont montré que Hh est associé et transporté au sein de particules de lipoprotéines, dont un des constituants est la lipophorine. Dans les mutants pour la lipophorine, l'expression des gènes cibles activés à longue distance est affectée alors que l'activation des gènes cibles à courte distance est inchangée, suggérant un rôle de ces particules dans le transport d'Hh loin de la frontière A/P.

Le morphogène Hh a aussi été montré comme pouvant voyager à la surface d'exovésicules chez la drosophile (Gradilla et al., 2014; Matusek et al., 2014) et chez les vertébrés (Vyas et al., 2014). Les exovésicules sont de petites vésicules, de 30 à 200nm, sécrétées dans l'espace extracellulaire. Elles sont produites par un complexe multiprotéique, nommé ESCRT (« Endosomal sorting complexes required for transport »). Des expériences indiquent que la déplétion de ce complexe affecte seulement les gènes à longue distance (Matusek et al., 2014) alors que d'autres études montrent que le complexe ESCRT est nécessaire à la fois pour l'expression des cibles d'Hh à longue distance mais également à courte distance (Gradilla et al., 2014). Des études complémentaires sont réalisées actuellement au laboratoire afin de mieux définir le rôle des ESCRT dans la sécrétion, la diffusion d'Hh et son impact sur la signalisation.

Un autre moyen de transporter Hh des cellules productrices aux cellules receveuses a été récemment reporté, il s'agit des cytonèmes (Bischoff et al., 2013). Les cytonèmes sont de longues et fines extensions cytoplasmiques composées d'actines (Ramírez-Weber et Kornberg, 1999). Afin de montrer leur rôle dans l'établissement du gradient d'Hh, l'équipe de Bischoff a déplété les cytonèmes en utilisant des *ARNi* dirigés contre les protéines de liaisons à l'actine, protéines impliquées dans la croissance des cytonèmes. Sans ces longues extensions cytoplasmiques, le gradient d'activité d'Hh est perturbé. Le problème de cette expérience est que la déplétion de l'actine, peut affecter d'autres mécanismes biologiques étant donné les effets pléiotropiques de cette protéine. Ainsi le rôle des cytonèmes dans l'établissement du gradient d'Hh reste encore à confirmer. Il en est de même sur le transport d'Hh *via* ces structures. En effet, Hh a été montré comme pouvant voyager à l'intérieur des cytonèmes de différentes façons : sous sa forme mature (HhNp ;Callejo et al., 2011) ou bien dans des exovésicules (Gradilla et al., 2014). Cependant, la plupart de ces expériences ont été réalisées en stabilisant les cytonèmes par surexpression de protéines comme la protéine Ihog, ce qui n'exclut pas des artefacts d'expérimentation. Pour pleinement comprendre le rôle des cytonèmes à la fois dans l'établissement du gradient et le transport d'Hh, il serait nécessaire de visualiser et d'inactiver les cytonèmes endogènes afin de mesurer l'importance de ces structures dans l'activation de la voie. Une telle approche est en cours de développement dans le laboratoire par Caterina Novelli.

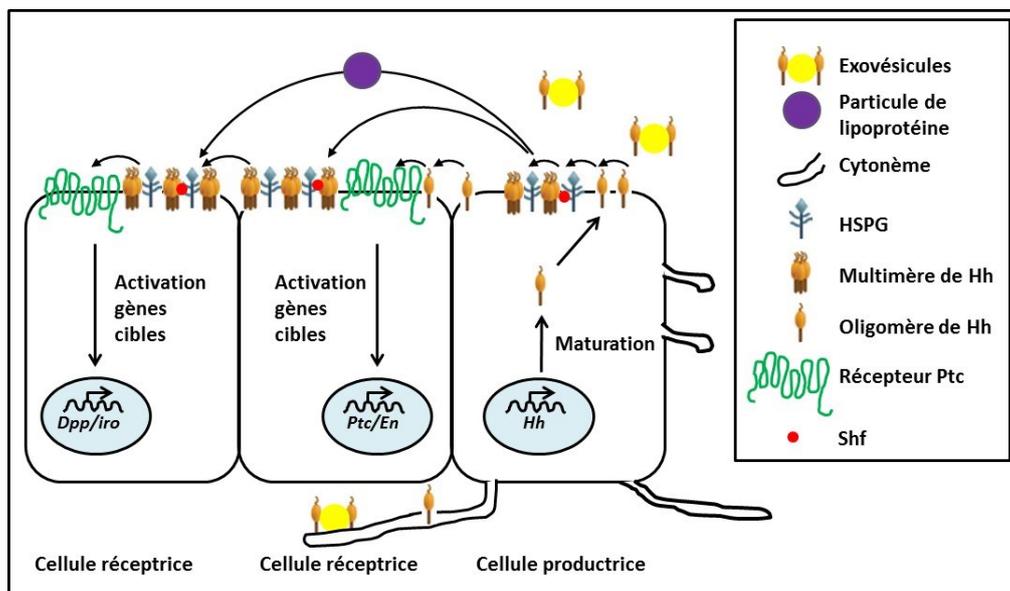


Fig. 15 : Le mouvement d'Hh

Hh peut être trouvé sous forme de monomère, impliqué dans l'activation des gènes à courte distance, ou sous forme de multimères, important pour l'expression des gènes à longue distance. La molécule d'Hh peut également s'associer à différentes protéines comme les HSPGs, Shf ou Scube2 (non représentée) qui facilitent sa diffusion dans l'espace extracellulaire. Hh est transporté loin des cellules productrices grâce à des transporteurs à l'instar des exovésicules, des particules de lipoprotéines ou bien *via* les cytonèmes (image adaptée à partir de Vincent et al., 2008 et de la thèse de Tanvi Gore).

2.2 Les cellules réceptrices

Après avoir été produite, maturée et sécrétée par les cellules productrices, la protéine Hh est perçue et entraîne une réponse intracellulaire dans les cellules réceptrices. Ces cellules expriment à leur membrane plasmique le récepteur d'Hh, Patched (Ptc) (Ingham et al., 1991). La fixation d'Hh sur Ptc, conduit à la stabilisation de la protéine Smo (Taipale et al., 2002), ainsi qu'à l'activation d'un complexe protéique dont la fonction majeure est de réguler l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription de la voie Hh, Cubitus Interruptus (Ci) en fonction du signal Hh (Alexandre et al., 1996; Methot et Basler, 1999). En plus de Ci, ce complexe cytoplasmique est composé de plusieurs protéines : la kinase Fused (Fu) (Preat et al., 1993), la protéine Supresseur de Fu (Sufu) (Dussillol-godar et al., 2006; Methot et Basler, 2000), la protéine kinase A (PKA) (Chen et al., 1998), la kinésine Costal 2 (Cos2) (Robbins et al., 1997; Sisson et al., 1997) et la kinase GprK2 (Cheng et al., 2010). Le rôle de ce complexe est de contrôler la stabilité, la maturation et la translocation de Ci dans le noyau. En absence d'Hh, Ci agit en répresseur transcriptionnel alors qu'en présence d'Hh, Ci est converti en activateur de la transduction. (Fig. 16).

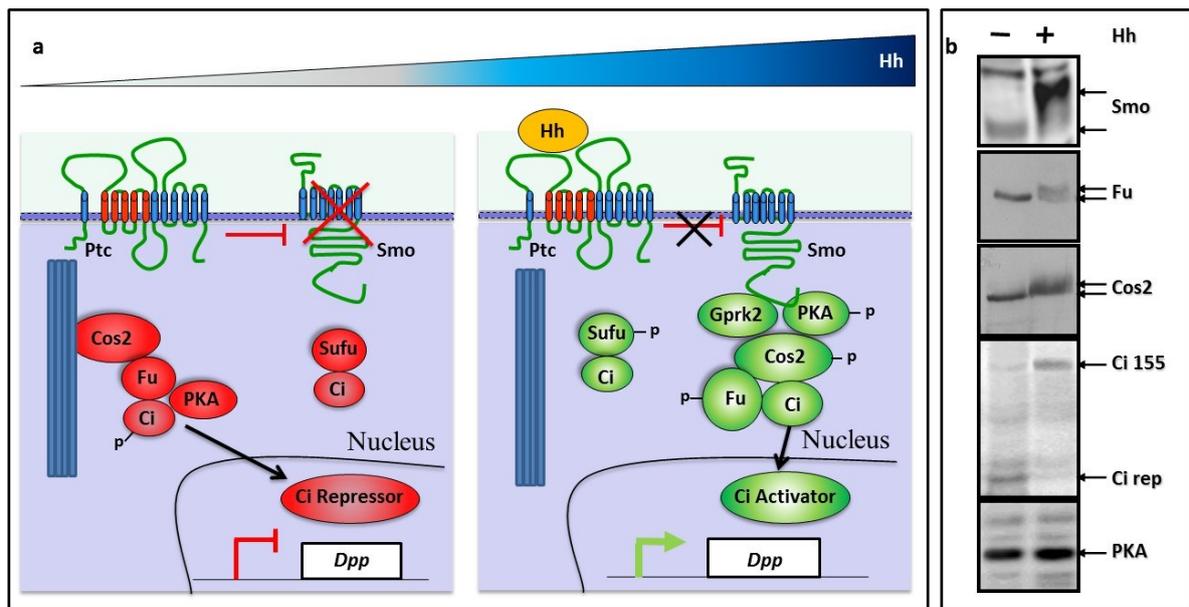


Fig. 16 : Représentation schématique du signal Hh dans les cellules réceptrices

a) En absence d'Hh, la protéine Ptc réprime Smo. Le complexe cytoplasmique, composé des kinases Fu et PKA, de la kinésine Cos2 et du facteur de transcription Ci, induit la phosphorylation de Ci par la PKA, aboutissant à la formation du Ci-Rep qui est transloqué dans le noyau pour réprimer ses gènes cibles comme *Dpp*. L'autre complexe formé par Sufu et Ci semble protéger Ci du clivage. En présence d'Hh, la liaison de ce dernier sur Ptc, réprime l'activité inhibitrice de Ptc sur Smo, permettant l'activation de Smo et la relocalisation du complexe cytoplasmique à la membrane plasmique. La kinase Gprk2 vient renforcer les membres actuels du complexe puis s'en suit une cascade de phosphorylation visible en **b** qui permet la formation du Ci-Act. Cette isoforme de Ci entre dans le

noyau où elle active ses gènes cibles à l'instar de *Dpp*. Le rôle du complexe Sufu/Ci n'est pas bien compris en présence d'Hh.

b) Western Blot montrant l'effet d'Hh sur les différentes protéines du complexe. La présence d'Hh induit les phosphorylations de Smo, Fu et Cos2, visible par retard de migration sur gel, ainsi que la présence du Ci-155 (forme intermédiaire de Ci). En absence d'Hh, le complexe permet la formation du Ci-Rep, caractérisé par un poids moléculaire plus faible que Ci-155 du à son clivage protéolytique.

Dans cette voie de signalisation, les recherches passées et actuelles ont permis de répondre à de nombreuses questions :

- Comment le récepteur Ptc perçoit le gradient Hh ?
- Comment le complexe Ptc/Hh transmet le signal morphogénétique à Smo ?
- En fonction de l'intensité du signal, comment s'effectue la transition entre répression et activation ?
- Comment le gradient Hh contrôle la régulation différentielle des gènes cibles, et la morphogénèse du tissu ?

Dans les prochains chapitres, je vais aborder ces questions et les relations entre chaque protéine du complexe de réception et de transduction de la voie Hh. La réponse à ces questions, en apparence simple, a révélé la grande complexité de la voie Hh. Un exemple que j'essaierai d'introduire est la notion de changements de conformation au sein du complexe de signalisation, puisque ma thèse vise à comprendre comment Hh permet la conversion d'un complexe répresseur à un complexe activateur.

2.2.1 Le récepteur Patched

La protéine Patched a été découverte lors du même crible génétique de la voie Hh dans lequel les mutants pour *ptc* présentaient une duplication de la frontière entre chaque segment chez l'embryon, indiquant un rôle de régulateur négatif de la voie Hh (Nüsslein-Volhard et Wieschaus, 1980). Ptc est le récepteur d'Hh, constitué de 12 domaines transmembranaires, pourvu d'un domaine sensible au stérol (SSD) dans sa boucle extracellulaire. Une description plus détaillée de Ptc sera donnée dans les chapitres suivants. Le gène *ptc* est le récepteur d'Hh, mais également un gène cible activé à haut niveau d'Hh. Cette activation a été décrite comme un rétro-contrôle négatif pour les hautes doses d'Hh, et j'aborderai cet aspect plus loin dans un chapitre traitant du rôle de Ptc dans la formation du gradient Hh.

2.2.1.1 La régulation de Hh par Ptc

Dans la transduction du signal, Ptc a deux fonctions majeures: il réprime le signal Hh et limite la diffusion du morphogène par séquestration (Chen et Struhl, 1996; Marigo et al., 1996). Même si les deux rôles de Ptc sont indiscutables pour la communauté scientifique, des zones d'ombre persistent. Notamment, le mécanisme par lequel Ptc inhibe le signal Hh n'est toujours pas connu, et l'établissement du gradient Hh par l'intermédiaire de sa

séquestration par Ptc n'est qu'un modèle théorique. Cependant des publications récentes apportent quelques éclaircissements sur la relation entre Ptc et Hh.

L'inhibition de Ptc par Hh est due à l'interaction entre ces deux protéines qui entraîne l'internalisation du complexe Ptc/Hh *via* un processus d'endocytose dynamine-dépendant suivie par sa dégradation *via* les lysosomes (Gallet et Therond, 2005). Récemment, une étude menée par l'équipe d'Adrian Salic, chez les mammifères, apporte des réponses sur le mécanisme d'inhibition d'Hh sur Ptc (Tukachinsky et al., 2016). Ils ont montré qu'un petit fragment de Shh palmytoilé (palmShh-22) est capable de se lier à Ptc, et que cette interaction est suffisante pour inhiber Ptc et activer la voie. De plus, à l'aide d'expériences *in vitro*, ils ont démontré que le processus d'inhibition de Ptc pouvait être dissocié de celui de l'internalisation ou dégradation, car le peptide palmShh-22 active l'expression de Gli1 (orthologue de Ci chez les mammifères) sans pour autant entraîner la dégradation de Ptc. Ceci sous-entend que les processus d'internalisation et de dégradation de Ptc ne sont pas requis pour l'activation de la voie. Quelques années auparavant, le mécanisme d'internalisation avait été dissocié de celui de la dégradation, puisqu'en absence de Ptc, Hh est toujours internalisé (Torroja et al., 2004) et al., démontrant que la dégradation d'Hh est une fonction spécifique à Ptc. Si la dégradation du complexe Ptc/Hh est une caractéristique liée à la présence de Ptc, c'est qu'elle doit avoir un rôle dans le mécanisme d'activation. En effet, Tukachinsky apporte une rectification sur les conclusions de son expérience *in vitro*, puisqu'une forme complète de Shh, une forme capable d'induire la dégradation de Ptc, permet une expression plus importante de Gli que le fragment palmShh-22. Ceci indique que durant le mécanisme d'inhibition de Ptc par Hh, le complexe Ptc/Hh (formé par une interaction dépendante de la palmytoilation de Shh), doit être dégradé afin d'avoir un maximum d'activation de la voie. Ceci suggère que lors de l'internalisation, Ptc est peut-être toujours capable d'exercer une action inhibitrice sur Smo, empêchant la pleine activation de la voie (Fig. 17).

Récemment, une publication a impliqué la protéine ligase Smurf3 (« SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase ») dans l'établissement du gradient Hh (S. Huang et al., 2013). Les auteurs ont identifié une interaction entre Ptc et Smurf3 par un crible double hybride. Leur étude indique que Smurf3 régule positivement la voie Hh en entraînant la dégradation de Ptc par ubiquitination. Par des analyses mathématiques, ils ont montré que Smurf3 interagit préférentiellement à des molécules de Ptc non liées avec Hh, indiquant un rôle de Smurf3 dans la régulation du « turnover » de Ptc en absence d'Hh. Il est probable que Smurf3 ait un rôle dans l'établissement du gradient Hh en contrôlant la présence de Ptc disponible pour la liaison à Hh à la surface cellulaire. Smurf3 pourrait être plus fortement exprimée proche de l'A/P afin d'entraîner la dégradation des molécules de Ptc libres ce qui favoriserait la diffusion d'Hh à plus longue distance (Fig. 17). Malheureusement, dans cette étude l'expression de la protéine endogène n'a pas été analysée, ce qui aurait été intéressant pour mieux comprendre et confirmer le rôle de Smurf3 dans la formation du gradient Hh.

De plus, Ptc est également un gène cible d'Hh. Une fois la voie activée, l'expression de Ptc permet son accumulation à la membrane plasmique, où a lieu son interaction avec Hh. De cette façon, la protéine Hh est en quelque sorte séquestrée par Ptc, ce qui pourrait limiter sa diffusion, et ainsi modifier le gradient d'Hh (Chen et Struhl, 1996). Mais ceci n'est qu'une hypothèse tentant d'expliquer l'établissement du gradient Hh et l'importance de Ptc dans ce processus. Une publication récente a confirmé ce modèle théorique d'établissement de gradient Hh en visualisant directement et en quantifiant le niveau d'expression des gènes cibles de la voie Hh (Adolphe et al., 2017). et al., Pour cela, les auteurs ont utilisé la technique de «sensitivity of single-molecule fluorescent in situ hybridization », technique qui permet de visualiser et de quantifier une molécule d'ARNm (Raj et al., 2008). Ils se sont intéressés au développement du follicule pileux chez les mammifères où l'existence d'un gradient de morphogène Shh permet de spécifier les différents types cellulaires (à l'instar du développement du tube neural : section 1.1.3.2). En mesurant les quantités de transcrits de Ptch1 et Gli1 dans des conditions sauvages, mutantes pour Ptch1 ou double mutantes Ptch1 et Ptch2, ils ont pu montrer qu'un gradient de SHh proximo-distal était nécessaire à la formation du follicule pileux. Les très hauts niveaux d'activité se situent proche de la zone proximale, les niveaux intermédiaires un peu plus loin vers la zone distale, et les bas niveaux d'activité sont en position plus distale. La suppression de Ptch1 induit un déplacement des gènes cibles vers la zone plus distale des très hauts niveaux d'activité de la voie, indiquant une diffusion plus lointaine de Shh, due à une diminution de sa séquestration par Ptch1. Cette étude permet ainsi de valider le modèle d'établissement de gradient Hh *via* l'interaction avec Ptc qui limite sa diffusion (Fig. 17).

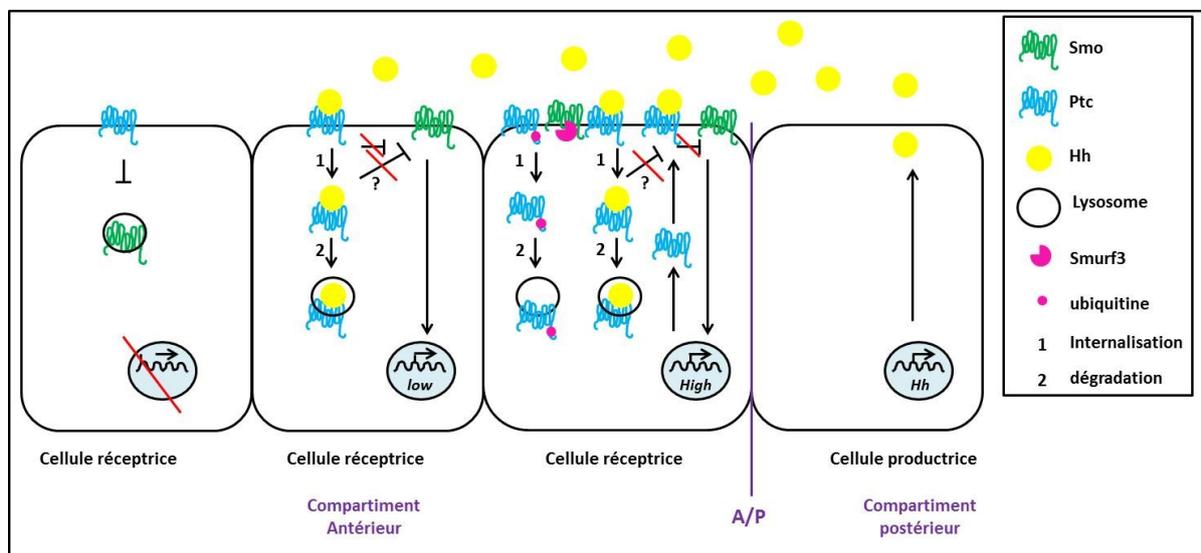


Fig. 17 : La régulation de Ptc sur Hh

Une fois sécrétée, la protéine Hh diffuse selon un gradient de concentration allant du compartiment postérieur au compartiment antérieur. Il se lie à Ptc ce qui entraîne l'activation de la voie par une levée d'inhibition de Smo. Le complexe Ptc/Hh est alors internalisé, et il semblerait qu'à ce stade ce complexe soit encore capable d'exercer un effet inhibiteur sur Smo. Le complexe est ensuite dégradé *via* la voie lysosomiale, empêchant Ptc d'exercer son effet inhibiteur. Ptc est un gène cible de la voie

Hh à courte distance. De ce fait, quand les cellules proches de l'AP reçoivent le signal, elle exprime Ptc qui s'accumule à la membrane plasmique. Ptc va alors interagir avec Hh, limitant ainsi sa diffusion. En parallèle et de façon opposée, la protéine Smurf3 ubiquitine la protéine Ptc non liée à Hh, entraînant son internalisation et dégradation afin d'augmenter la diffusion d'Hh. L'ensemble de ces processus de régulation (et sûrement bien d'autres) permet l'établissement du gradient Hh.

2.2.1.2 La régulation de Smo par Ptc

Comme je l'ai dit dans le chapitre précédent, Ptc est capable de réprimer la voie Hh. D'ailleurs, dans des clones mutants pour Ptc, une activation aberrante de la voie Hh est observée en absence ou en présence d'Hh (Chen et Struhl, 1996), confirmant la fonction inhibitrice de Ptc. Un rôle de Ptc dans le mécanisme de la transduction est d'empêcher l'action positive de Smo sur la voie Hh en induisant sa dégradation. La présence d'Hh provoque trois changements majeurs au niveau de Smo : sa stabilisation, sa phosphorylation et sa relocalisation à la membrane. Afin d'inhiber Smo, Ptc doit agir sur ces trois composantes. Chen et Struhl, dans leurs clones mutants pour *ptc*, ont également observé une stabilisation de Smo. Ce résultat a été confirmé par des expériences *in vitro*, où la suppression de Ptc par *ARNi*, induit d'une part, la stabilisation de Smo à la membrane plasmique, et d'autre part une augmentation de la phosphorylation de Smo (Denef et al., 2000; Lum et al., 2003). L'ensemble de ces expériences indique que l'effet inhibiteur de Ptc passe par sa capacité à déstabiliser Smo, à empêcher sa localisation à la membrane et à bloquer sa phosphorylation. A ce jour, aucune étude n'a montré d'interaction directe entre Ptc et Smo, suggérant que l'effet inhibiteur de Ptc sur Smo est indirect. Plusieurs hypothèses ont été formulées pour comprendre le mode d'action de Ptc sur Smo.

Tout d'abord, deux hypothèses ont été invoquées sur l'observation de la structure de Ptc.

1) Ptc présente des homologies structurales avec des perméases RND (« Resistance Nodulation Division ») de procaryotes, laissant penser à une fonction de type canal (Taipale et al., 2002). En effet, les perméases sont des protéines transmembranaires qui agissent comme des pompes à protons. Des mutants des régions conservées entre Ptc et les perméases RND entraîne une incapacité de Ptc à réguler l'activité de Smo. Par homologie, Ptc pourrait réguler Smo, soit en jouant sur l'afflux d'un ligand répresseur de Smo, soit l'efflux d'un ligand activateur de Smo. Quelques ligands ont été identifiés comme pouvant réguler Smo. Un ligand de type répresseur a été découvert par un fractionnement biochimique suivi d'une analyse en spectrométrie, il s'agit d'un lipide, l'endocannabinoïde (Khaliullina et al., 2015). Un ligand de type activateur a également été identifié, 3 β -hydroxystéroïde, molécule de la famille des oxystérols (Corcoran et Scott, 2006; Dwyer et al., 2007). Des expériences menées par Nedelcu et al., en 2013 confirment ce rôle des oxystérols sur Smo, en montrant une interaction directe entre les oxystérols et le domaine CRD (« Cystein Rich Domain ») de Smo. Cependant, une étude récente vient de montrer que les oxystérols ne sont pas directement impliqués dans l'activation de Smo, et que l'activation de Smo serait due à un autre type de stérol, le cholestérol (Huang et al., 2016). Pour cela, les auteurs ont généré des mutants de *smo* qui ont la capacité de distinguer les oxystérols du

cholestérol. Ils ont remarqué que les mutants incapables de se lier au cholestérol perdaient leur capacité à activer Smo. De plus, grâce à la cristallographie à rayon X, ils ont montré que la liaison du cholestérol à Smo entraîne un changement de conformation structurale de Smo, responsable de son activation (Fig. 18a).

2) Dans la structure de Ptc, un domaine SSD pour « Sterol Sensing Domain » a été trouvé. Ces domaines SSD sont en général impliqués dans le trafic intracellulaire. Sachant que la forme maturée d'Hh, pourvue d'une molécule de cholestérol, est transportée par des lipoprotéines (section 2.2.2.2), il a été spéculé que le domaine SSD de Ptc était responsable de sa liaison aux lipoprotéines. Cette interaction a d'ailleurs été confirmée par immunoprécipitation dans l'étude de Callejo et al., en 2008. De manière intéressante, la mutation de ce domaine abolit la répression de Smo par Ptc, entraînant une accumulation de Smo (Martín et al., 2001; Strutt et al., 2001). L'apport de stérols, dérivés de lipoprotéines dans des clones de *ptc* mutants pour le domaine SSD, réduit l'accumulation de Smo (Khaliullina et al., 2009). Ceci suggère que la fonction de ce domaine SSD est de récupérer des dérivés de stérol apportés par les lipoprotéines afin de permettre à Ptc de réguler l'activité de Smo (Fig 18. b).

D'autres hypothèses de l'action inhibitrice de Ptc sur Smo suggèrent un rôle de Ptc dans la régulation de molécules impliquées dans la phosphorylation et stabilisation de Smo à la membrane plasmique.

3) Une étude de Jia et al., 2009, propose que Ptc inhibe Smo en jouant sur l'état de phosphorylation de Smo, puisque la phosphorylation de Smo est nécessaire à sa stabilisation et son activation (Zhang et al., 2004). Ptc pourrait inhiber Smo, soit en activant ou en rapprochant une phosphatase de Smo, soit en bloquant l'accès de Smo aux kinases responsables de sa phosphorylation. PP4 (« Protein Phosphatase 4 ») est une phosphatase impliquée dans la régulation de la voie Hh. Elle interagit avec Smo, inhibe sa phosphorylation, provoque sa déstabilisation en présence d'Hh, et ainsi inhibe la signalisation Hh et al., (Jia et al., 2009). Deux autres phosphatases ont été identifiées comme pouvant réguler l'activité et la stabilité de Smo, il s'agit de PP1 (« serine/threonine Protein Phosphatase 1 ») et PP2A (« serine/threonine protein phosphatase 2A. »). A l'instar de PP4, ces phosphatases interagissent avec Smo et inhibent sa phosphorylation (Su et al., 2012). Cependant, à ce jour aucun lien n'a été fait entre Ptc et ces différentes phosphatases (Fig. 18c).

4) Une autre hypothèse propose que l'inhibition de Smo par Ptc soit basée sur la capacité de Ptc à interférer avec la relocalisation membranaire de Smo. Cette relocalisation à la membrane de Smo nécessiterait la production d'un phosphoinositol, le phosphoinositol-4-phosphate (Pi4P). Les phosphoinositols sont des phosphatidylinositol phosphorylés, localisés à la membrane cellulaire et dont la production est régulée par des kinases et phosphatases. Chez la drosophile, Yavari et al., en 2010 ont montré que Ptc agit sur la concentration intracellulaire des Pi4P, puisque la suppression de Ptc par *ARNi*, augmente la concentration intracellulaire de Pi4P. Des mutants pour la kinase Stt4 (« phosphatidylinositol-4-kinase »), kinase nécessaire à la synthèse des Pi4P, présente un phénotype de « perte de fonction »

d'*hh*, associé à une déstabilisation de Smo. En revanche, une mutation de *sac1* (« phosphoinositide phosphatase »), phosphatase responsable de la déphosphorylation des Pi4Ps, provoque une activation de la voie, visible par une augmentation de l'expression de gènes cibles (*dpp*, *ci*), mais également par une stabilisation de Smo. Ainsi Ptc pourrait réguler la localisation membranaire et l'activation de Smo via son rôle sur les Pi4Ps. Une question qui vient à l'esprit est comment les Pi4ps agissent-ils sur Smo ? S'agit-il d'une interaction directe ou bien via l'intermédiaire d'autres molécules qui rapprocheraient les Pi4Ps de Smo ? Récemment, un papier a apporté la réponse à cette question (Jiang et al., 2016). En effet, les auteurs ont montré que les Pi4Ps interagissent directement avec la queue cytoplasmique de Smo mais également que la protéine Gprk2 facilite cette interaction. Le contact direct des Pi4Ps avec Smo favorise la phosphorylation de Smo par PKA et CK1 ainsi qu'un changement de conformation dans la partie C-terminale de Smo, changement de conformation qui est impliqué dans le mécanisme d'activation de Smo (section 2.3.1.2.3). Cependant, des études supplémentaires sont requises pour déterminer comment le signal Hh, et plus précisément comment Ptc régule l'activité de Stt4 et Sac1 (de manière directe ou indirecte) (Fig. 18d).

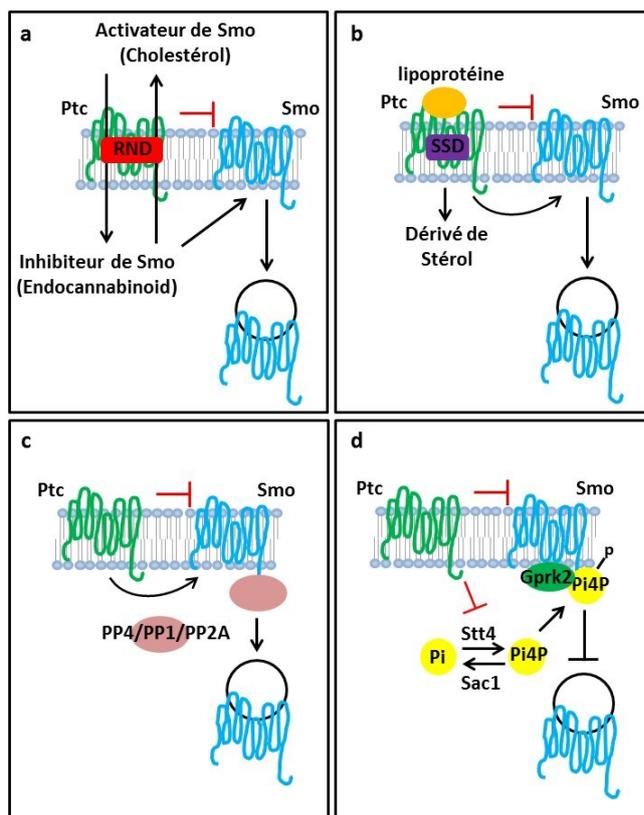


Fig. 18 : La fonction inhibitrice de Ptc sur Smo

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer le rôle inhibiteur de Ptc sur Smo.

a) Ptc agirait négativement sur Smo en régulant l'entrée de molécules inhibitrices de Smo (Endocannabinoïde) ou activatrices de Smo (Cholestérol) *via* son domaine RND.

b) Ptc interagit avec des lipoprotéines par l'intermédiaire de son domaine SSD. Cette interaction apporterait des dérivés de stérols, responsables de la répression de Smo.

c) Ptc pourrait inhiber Smo en favorisant le rapprochement entre Smo et des phosphatases (PP4, PP1, PP2A).

d) Ptc, par un mécanisme encore inconnu, inhibe la formation des Pi4P en jouant sur

les activités de la kinase Stt4 et la phosphatase Sac1. Or les Pi4Ps, en association avec Gprk2, ont été décrits comme régulant positivement Smo en entraînant sa phosphorylation et un changement de conformation dans la partie C-terminale de sa queue cytoplasmique.

2.2.2 Ptc et ses co-recepteurs : Ihog/Boi et Dally-like

2.2.2.1 Interference of Ihog (Ihog) and Brother of Ihog (Boi)

Afin de découvrir des nouveaux candidats agissant dans la réception d'Hh, Lum et al. en 2003 ont conçu un crible fonctionnel par *ARNi* dans des cellules de drosophile ayant permis d'identifier deux protéines : Ihog et Boi (Lum et al., 2003). Ces deux protéines sont des protéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire composé de quatre domaines à immunoglobulines (« Ig : immunoglobulin ») suivi par deux domaines de fibronectine de type III (« FNIII : fibronectin type III ») dans leur région N-terminale. La région FNIII est constituée de deux domaines indépendants : FN1, responsable de la liaison avec Hh et FN2, capable de lier Ptc (Yao et al., 2006; Zheng et al., 2010). Ihog et Boi possèdent également un domaine cytoplasmique dont la fonction n'a pas encore été déterminée (Fig. 19). Ces protéines forment deux complexes trimériques (Hh/Boi/Ptc ou Hh/Ihog/Ptc) qui sont capables de réguler le mécanisme de réception du signal Hh.

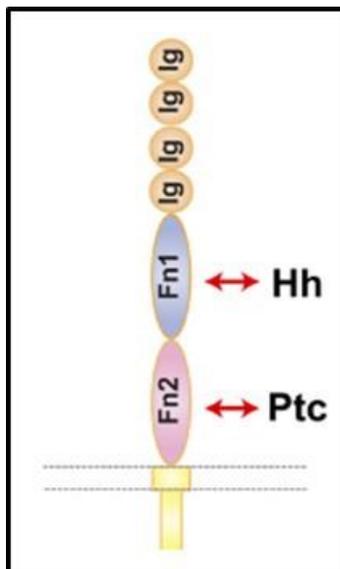


Fig. 19 : Structure des protéines Ihog et Boi

Représentation schématique de la structure des protéines Ihog et Boi. La région N-terminale de ces protéines est composée de 4 chaînes d'immunoglobulines, suivies par deux domaines de fibronectines de type III, où FN1 est responsable de la liaison à Hh et FN2 de l'interaction avec Ptc. Ces protéines possèdent également un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique dans leur partie C-terminale.

Ihog et Boi ont été définis comme régulateurs positifs de la voie (Yao et al., 2006). En effet, leur surexpression à « faibles niveaux » entraîne une augmentation de la transduction alors que leur diminution, par *ARNi*, réduit cette signalisation, ainsi que l'activation des gènes cibles. Les fonctions de Boi et Ihog semblent être redondantes, puisque l'expression de Boi dans des cellules où la protéine Ihog a été éliminée par *ARNi*, restaure le phénotype mutant de Ihog (Yao et al., 2006). Ce rôle positif sur le signal Hh contraste avec le rôle négatif de leur co-récepteur Ptc, suggérant une possible action de Boi/Ihog sur Ptc (Briscoe et Théron, 2013). Cette idée est renforcée par différentes expériences. Dans des clones mutants perte de fonction pour *boi/ihog*, l'expression de Ptc est diminuée, et l'ajout d'Ihog dans ces mêmes clones, restaure l'expression de Ptc et al., (Zheng et al., 2010). Ihog interagit avec Ptc *via* son domaine FN2, par conséquent, la surexpression d'une forme d'Ihog, délétée des domaines FN1 et FN2, dans des clones *boi/ihog* ne restaure pas le niveau normal de Ptc

(Zheng et al., 2010). Ces résultats indiquent que les domaines fibronectines d'Ihog exercent une fonction positive sur la voie Hh en provoquant la stabilisation de Ptc à la membrane plasmique aboutissant à la réception du signal dans les cellules réceptrices. Ainsi, dans les cellules réceptrices, Ihog et Ptc agiraient en association pour se lier à Hh. Ce modèle de coopération a d'ailleurs été validé par des expériences de mesure de quantité d'Hh liée aux cellules. En effet, la quantité d'Hh liée aux cellules est plus importante dans des conditions où Ptc et Ihog sont co-exprimés, comparés à des conditions où seule l'une des deux protéines est transfectée (Yao et al., 2006).

Cependant, des nouvelles données indiquent qu'Ihog n'agit pas seulement comme un co-récepteur classique dont le rôle est de permettre au ligand (ici Hh) de lier son récepteur (Ptc). Dans leur étude de 2010, Yan et al., propose un modèle dans lequel Ihog aurait un rôle biphasique, puisqu'une trop forte quantité d'Ihog entraîne la même réponse cellulaire qu'une faible quantité de Ihog. Leur modèle est appuyé par des expériences réalisées à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, une augmentation forte de l'expression d'Ihog conduit à une réduction de la transduction Hh. De façon paradoxale pour un régulateur positif de la voie, une diminution partielle du niveau d'expression d'Ihog augmente l'expression des gènes cibles de la voie alors qu'une forte réduction de la protéine Ihog diminue le signal Hh. Les expériences menées *in vivo* permettent de donner une explication à ce phénomène biphasique en analysant la localisation d'Hh dans le disque imaginal de l'aile. La perte d'Ihog réduit le niveau d'Hh présent à la surface des cellules, aboutissant à l'augmentation du signal Hh. A l'inverse, la surexpression d'Ihog induit l'accumulation d'Hh à la membrane des cellules, accumulation qui ne permet pas d'activer la transduction de façon efficace, et qui entraîne une réduction de la signalisation. Ainsi, Il semblerait qu'Ihog entre en compétition avec Ptc pour la liaison d'Hh. A des niveaux physiologiques, Ihog permet de maintenir Hh à la surface des cellules alors qu'à des hauts niveaux, Ihog séquestre Hh, empêchant ainsi son interaction avec Ptc.

L'ensemble des données suggère que, selon le niveau d'expression d'Ihog/Boi dans les cellules réceptrices, Ihog/Boi peut soit favoriser l'interaction entre le récepteur Ptc et son ligand Hh, soit entré en compétition avec Ptc pour la liaison à Hh.

2.2.2.2 Dally-like (Dlp)

Dlp a été découvert lors du même crible fonctionnel par *ARNi* qui a permis l'identification des protéines Boi et Ihog (Lum et al., 2003). Comme je l'ai mentionné dans le paragraphe 2.1.2.1, Dlp a un rôle dans la réception du signal Hh (Desbordes et Sanson, 2003) car les mutants *dlp* présentent un phénotype Hh. De plus, la surexpression de Dlp renforce la signalisation Hh, mais réduit le domaine de réception du signal Hh dans l'antérieur, indiquant une modification du gradient Hh par Dlp. Ceci est d'ailleurs confirmé par une diminution de molécules libres d'Hh dans des conditions où Dlp est exprimé abondamment. Cette hypothèse est renforcée par des expériences d'immunoprécipitation montrant que Dlp interagit avec Ptc et Hh. L'ensemble de ces résultats suggère que Dlp pourrait agir comme un co-récepteur d'Hh en facilitant l'interaction entre Ptc et Hh.

De manière intéressante, Dlp et Ihog ont des fonctions différentes puisque la perte du signal Hh, observée dans des clones mutants pour Dlp n'est pas restaurée par l'addition d'Ihog (Yan et al., 2010). En effet, dans le disque, il a été montré que Dlp renforce la signalisation Hh alors que la fonction d'Ihog/Boi serait de définir le domaine de réception Hh dans les cellules réceptrices. Ceci suggère que Dlp agit comme co-récepteur avec Ptc afin de lier Hh, alors qu'Ihog a un rôle dans le maintien et la diffusion d'Hh à la surface des cellules. De plus, Dlp et Ihog ont été identifiés à l'intérieur des cytonèmes, suggérant un rôle de ces protéines dans la capacité des cytonèmes à réguler la distribution et la réception du signal Hh (Bilioni et al., 2013).

2.2.3 La régulation de Smoothened

A l'instar de Ptc et Hh, Smo a été découverte lors du crible de Nusslein-Volhard et Wieschaus en 1980. C'est une protéine à sept segments transmembranaires constituée d'un domaine CRD (« Cystéine Rich Domain ») dans la boucle extracellulaire et d'un domaine cytoplasmique à l'extrémité C-terminal (Alcedo et al., 2000; Van den Heuvel et Ingham, 1996). Une des caractéristiques de la voie Hh est la stabilisation de Smo dans les cellules réceptrices. Dans ces cellules, l'effet d'Hh est directement visible par la formation d'un gradient de Smo.

2.2.3.1 La dégradation de Smo en absence d'Hh

En absence d'Hh, Ptc inhibe Smo par différents processus décrits dans la section 2.2.1.2, conduisant à la dégradation de Smo. Jusqu'à présent, peu de choses étaient connues sur la dégradation de Smo, mais de récentes publications permettent de mieux comprendre la régulation de Smo en absence d'Hh. Plusieurs observations indiquent que la localisation membranaire de Smo est régulée par la voie endocytaire. En effet, dans les cellules des glandes salivaires, le blocage de l'endocytose provoque l'accumulation de Smo à la membrane plasmique (Zhu et al., 2003). De plus, grâce à des expériences de recyclage en cellules, l'équipe de Jia et al., 2004 a montré que Smo peut aller à la surface des cellules, mais rapidement internalisée en absence d'Hh, alors que la présence d'Hh diminue ce processus d'internalisation permettant l'accumulation de Smo à la membrane plasmique. Cependant, les mécanismes qui régulent l'adressage de Smo aux endosomes ou à la surface des cellules n'étaient pas décrits jusqu'à l'étude de Li et al., 2012. Beaucoup de récepteurs membranaires, comme les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs), sont internalisés dans les endosomes, puis dégradés par les lysosomes suite à une ubiquitination. Etant donné la ressemblance structurale entre Smo et les GPCRs, les auteurs ont cherché à savoir si la régulation de Smo était similaire à celle des GPCRs. Tout d'abord, ils ont généré des clones mutants pour *uba1* (« Ubiquitin-activating enzyme (E1) »), une ubiquitine ligase identifiée chez la drosophile, et démontre que Smo s'accumule dans ces clones. Puis, ils ont également observé une stabilisation de Smo à la surface de cellules de clones mutants pour *hrs* (« HGF-regulated tyrosine kinase substrate », composante du complexe ESCRT-0), protéine impliquée dans le processus d'endocytose. Des expériences plus poussées indiquent que les

protéines Smo internalisées sont redirigées à la fois au protéasome et aux lysosomes pour leur dégradation complète. Ces résultats montrent que la régulation de Smo est semblable à celle des GPCRs. Ainsi en absence d'Hh, la protéine Smo est ubiquitinylée, internalisée dans des endosomes puis dégradée par le protéasome et les lysosomes. Par des expériences de mutagenèse, ils ont pu démontrer que la plupart des lysines ubiquitinylées se trouvent entre les positions 661 et 818 de Smo, qui est le domaine SAID, défini comme une région auto-inhibitrice (Zhao et al., 2007). Ce domaine est suffisant pour induire l'internalisation et l'adressage aux endosomes puisqu'une protéine chimérique contenant uniquement le domaine SAID fusionné à la partie C-terminale du récepteur de wingless, Frizzled, est internalisée (Fig. 20).

En 2007, Zhao et al., se sont intéressés à une autre protéine, Krutz (Krz), qui est une β -arrestine. Cette protéine agit en parallèle de l'ubiquitination de Smo en favorisant son internalisation. Le rôle de Krz a également été validé par une autre équipe qui montre que la surexpression de Krz induit l'internalisation et la dégradation de Smo *in vitro* (Molnar et al., 2011). Une autre étude menée par Yang et al., en 2013 a montré que la protéine Vps36 (« Vacuolar protein sorting 36 »), composante du complexe ESCRT-II, est impliquée dans la dégradation de Smo. *In vivo*, l'absence de Vps36 entraîne une augmentation globale de la protéine Smo, et par conséquent l'activation de gènes cibles comme *dpp*, indiquant que Vps36 est important pour la régulation de Smo en absence d'Hh. Une conséquence de la perte de Vps36 est l'accumulation de Smo dans des endosomes intracellulaires, suggérant un rôle de Vps36 dans le trafic de Smo. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, les auteurs ont montré que Vps36 se lie à Smo uniquement en absence d'Hh. Cette interaction est dépendante de l'état de phosphorylation de Smo, puisqu'une forme de Smo non phosphorylée se lie à Vps36, alors qu'une forme constamment phosphorylée est incapable d'interagir avec Vps36. De plus, une forme de Smo ubiquitinylée est capable de se lier avec Vps36, et l'addition d'UBPY/USP8 (« Ubiquitin Specific Peptidase 8 »), déubiquitinase qui régule l'état ubiquitinylé de Smo en absence et présence d'Hh (Li et al., 2012), réduit l'interaction entre Smo et Vps36, confirmant l'idée que Vps36 interagit avec Smo *via* une molécule d'ubiquitine en absence d'Hh. Des mutants de Smo sur les lysines ubiquitinylées, situées essentiellement dans sa queue cytoplasmique, entraînent une localisation membranaire de Smo *in vitro*, ainsi qu'une activation de la voie Hh *in vivo*, visible par une expression aberrante de *dpp*. Ces données montrent qu'en absence d'Hh, Vps36 contrôle le trafic de Smo entre le cytoplasme et la membrane plasmique ainsi que la stabilité et l'activation de Smo.

L'analyse de ces publications indique qu'en absence d'Hh, Smo est ubiquitinylée par Uba1, conduisant à son internalisation, et ce processus est médié par Krz, Hrs et Vps36. Une fois dans les endosomes, Smo est ensuite dégradée par le protéasome et les lysosomes (Fig.20).

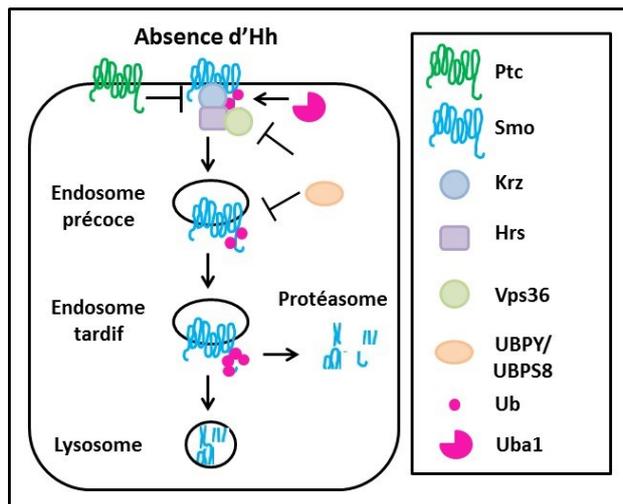


Fig. 20 : La dégradation de Smo en absence d'Hh.

En absence d'Hh, Ptc inhibe Smo. Smo est alors ubiquitinylée par uba1. Cet état d'ubiquitination de Smo est finement contrôlé par la déubiquitinase qui a été montré comme agissant en absence d'Hh. Krz, Vps36 et HRS interagissent avec une forme de Smo ubiquitinylée, et régulent son internalisation et son adressage vers les endosomes (adaptée à partir de Li et al., 2012).

La présence d'Hh va agir sur ces différentes étapes afin de permettre une localisation membranaire de Smo qui est nécessaire à son activation. Un paragraphe sera consacré à la régulation de Smo *via* l'inhibition des mécanismes conduisant à sa dégradation dans le chapitre suivant.

2.2.3.2 L'activation de Smo en présence d'Hh

2.2.3.2.1 Généralités sur l'activation de Smo

La liaison d'Hh à Ptc permet de lever la répression de Ptc sur Smo, et ainsi l'activation de Smo. Comme je l'ai mentionné dans le chapitre traitant de l'inhibition de Smo par Ptc (2.2.1.2), l'activation de Smo nécessite sa stabilisation, sa relocalisation membranaire et sa phosphorylation. De nombreuses études indiquent que la phosphorylation semble être le premier événement de ce mécanisme d'activation, conduisant à la stabilisation et la localisation de Smo à la membrane plasmique (Denef et al., 2000; Nakano et al., 2004; Zhu et al., 2003). Cependant l'étude de Yavari et al., 2010 a montré que Smo peut se relocaliser indépendamment d'Hh à la membrane plasmique grâce aux phosphatidylinositol-4 phosphate (PI4P). Ceci suggère un autre ordre des événements où la localisation de Smo à la membrane plasmique précéderait sa stabilisation et phosphorylation. A l'aide d'une modélisation mathématique, validée par des expériences de suivi de la phosphorylation et de la localisation membranaire de Smo par l'utilisation d'un reporteur fluorescent, l'équipe de Kupinsky et al., a démontré que la localisation membranaire est le premier événement dans l'activation de Smo. En effet, la localisation à la membrane est suffisante pour induire la phosphorylation de Smo dans sa queue cytoplasmique en absence ou présence de Ptc. En ce qui concerne l'ordre dans lequel la stabilisation, suivie de la dimérisation de Smo et la phosphorylation de Smo ont lieu, le débat est encore ouvert. Les expériences de FCCS (« fluorescence cross-correlation spectroscopy ») faites par Kupinski et al., en 2012 montrent que l'inactivation de Ptc par Hh, induit la dimérisation de Smo indépendamment de sa phosphorylation, suggérant que la « clusterisation » de Smo se passe avant sa phosphorylation. Ceci est en accord avec l'étude de Zhao et al., 2007a, qui avait démontré

que Smo est un dimère constitutif et que la dimérisation a lieu au niveau des boucles extracellulaires, indépendamment de l'activation de Smo. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux définir la séquence d'activation de Smo.

2.2.3.2.2 Le rôle des phosphorylations de Smo sur son activité

La description des phosphorylations de Smo

Même si l'ordre des événements permettant l'activation de Smo est encore débattu, la phosphorylation de Smo est un mécanisme essentiel pour transférer le signal Hh aux complexes cytoplasmiques. Smo est phosphorylée dans sa queue cytoplasmique qui contient plusieurs sites de phosphorylation de type Serine/Thréonine de la PKA, de la Caséine Kinase 1 (CK1) et de la GSK-3 (Zhang et al., 2004). Ces multiples phosphorylations sont cruciales pour la transduction du signal Hh. La surexpression de Smo n'a pas d'effet sur l'activation de la voie. En revanche, l'expression d'une forme de Smo ne pouvant pas être phosphorylée, due à des substitutions de sérines et thréonines par des alanines, inactive la voie. De façon opposée, la substitution de ces résidus par des acides glutamiques ou aspartiques, acides aminés mimant une phosphorylation constitutive, entraîne une activation aberrante de la voie (Jia et al., 2004; Zhang et al., 2004). Ces expériences révèlent un rôle majeur de la PKA dans le processus de phosphorylation de Smo, en tant que kinase primaire, afin de fournir un substrat déjà phosphorylé que CK1 et GSK3 pourront phosphoryler à leur tour. En effet, l'analyse de différents mutants pour les sites de phosphorylations de la PKA ou CK1 lors d'essai kinase, indique que Smo est d'abord phosphorylé par la PKA sur les sérines 667, 687 et 740, puis par la kinase CK1 sur les sérines 670, 673, 690, 693, 743 et 756 (Jia et al., 2004). La même conclusion a été apportée pour GSK3, qui ne phosphoryle Smo que sur des sérines en amont des sites PKA préalablement phosphorylés (Zhang et al., 2004). L'étude d'Apionishev et al., 2005 montre que les kinases PKA et CK1 ont un rôle plus important dans l'activation de Smo que GSK3. En effet, dans des clones mutants pour Smo, l'ajout d'une forme sauvage de Smo et d'une forme où les sites de phosphorylation de GSK3 ont été mutés, sauve l'expression de Dpp alors que des formes de Smo dans lesquelles les sites de phosphorylations pour PKA ou Ck1 ont été modifiés ne sauvent pas Dpp.

D'autres kinases ont été impliquées dans la phosphorylation de Smo comme la Caséine Kinase 2 (CK2) (Jia et al., 2010). Des résidus sérines, situés entre les positions 816 et 843, sont phosphorylés par Smo *in vitro*, et la mutation de ces résidus *in vivo* réduit la capacité de Smo à activer les gènes cibles de hauts niveaux d'Hh. La kinase PKC phosphoryle également Smo sur la sérine 680, phosphorylation impliquée dans la stabilisation de Smo à la membrane plasmique et l'activation des gènes cibles de la voie Hh (Jiang et al., 2014). Récemment, une autre kinase, Gilgamesh (Gish) a été identifiée lors d'un crible *ARNi* comme un régulateur positif de la voie Hh (Li et al., 2016). Gish active le signal Hh en phosphorylant Smo sur les sites situés entre la position 623 et 634 de la queue cytoplasmique. Comme CK1, CK2 et GSK3, la phosphorylation de Gish sur Smo nécessite que Smo soit déjà phosphorylé par la PKA. De plus, des expériences de génétique montrent que Gish agit en collaboration

avec la kinase GprK2 pour promouvoir les hauts niveaux d'activation de la voie Hh. La kinase GprK2 peut également agir sur Smo en phosphorylant les Ser741, Thr742, Ser1013 et Ser1015 (Chen et al., 2010; Fig. 21). Un paragraphe sera d'ailleurs consacré au rôle de GprK2 sur la régulation de Smo plus tard dans ce chapitre.

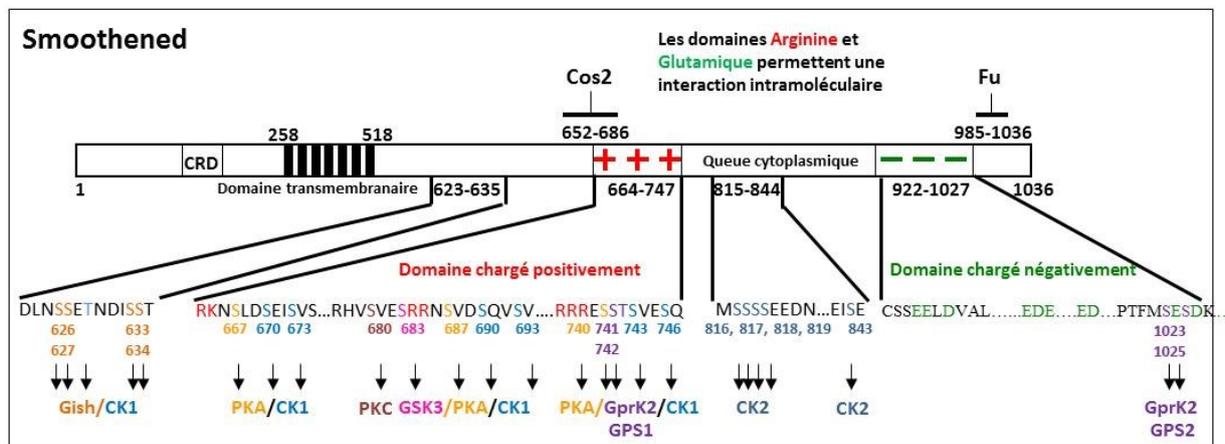


Fig. 21 : Structure de la protéine Smo.

La protéine Smoothened se compose de 3 domaines : un domaine N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. La région N-terminale de Smo contient un domaine CRD qui est impliqué dans la régulation de Smo par le cholestérol (section 2.2.1.2). La région C-terminale de Smo est constituée de deux domaines de charges opposés : un domaine chargé positivement, dû à la présence d'arginines, dans lequel sont situés les sites de phosphorylation de PKA/CK1/GSK3 et GprK2, et un domaine chargé négativement, riche en résidus aspartiques et glutamiques, où des sites de GprK2 ont été identifiés. Il est à noter que ces sites de GprK2 ont été décrits comme étant en positions 1013 et 1015, mais lors de l'élaboration de cette figure, j'ai remarqué que ces sites seraient plutôt positionnés sur les Sérines 1023 et 1025. Le rôle de ces deux domaines est de réguler la stabilité et l'activation de Smo *via* la formation d'une boucle intramoléculaire, permise par des interactions électrostatiques (Zhao et al., 2007). Les kinases Gish, PKC et CK2 phosphorylent également Smo sur différents résidus annotés dans ce schéma. De plus, Smo interagit avec Cos2 et Fu par deux domaines distincts (Malpel et al., 2007 ; Figure révisée à partir de l'HDR de Laurent Ruel).

Le rôle de ces phosphorylations dans l'activation de Smo

Dans un premier temps, je vais montrer que le rôle des phosphorylations de Smo est d'entraîner un changement de conformation de la partie cytoplasmique de Smo, permettant son activation (Zhao et al., 2007). Puis, je m'intéresserai à l'effet de ces phosphorylations sur l'inhibition de la dégradation de Smo (Li et al., 2012).

Dans le papier de Zhao et al., 2007, les auteurs ont d'abord analysé la localisation subcellulaire de Smo en utilisant différentes délétions de cette protéine. Grâce à cette expérience, ils ont identifié un domaine situé entre les acides aminés 661 et 818 comme étant important pour l'auto-inhibition de Smo. Cette région est localisée au niveau des sites de phosphorylation de PKA, CK1 et GSK3, et elle est caractérisée par un domaine Arginine, apportant des charges positives à cette région. Durant leur étude, ils ont également

remarqué la présence d'un domaine chargé négativement (domaine Glutamique), dû à de nombreux acides glutamiques et aspartiques se trouvant entre les acides aminés 922 et 1027 de la queue cytoplasmique de Smo (Fig. 20). Grâce à des expériences de co-immunoprécipitation, ils ont montré que ces deux domaines chargés de manière opposée peuvent interagir ensemble. Cette conformation de Smo est instable et ubiquitinylée puis dégradée *via* les lysosomes et le protéasome (Li et al., 2012 ; Xia et al., 2012). Les mutations affectant les charges du domaine Arginine, ou celles du domaine Glutamique aussi bien que la phosphorylation de Smo par PKA et CK1, entraînent une diminution de l'interaction intramoléculaire, aboutissant à une conformation « ouverte » de Smo. Ainsi les auteurs ont élaboré un modèle dans lequel ils expliquent que l'activation de Smo est due à un changement de conformation de sa queue cytoplasmique, réalisé par un jeu de charges électrostatiques. En absence d'Hh, les résidus positifs du domaine Arginine interagissent avec les charges négatives du domaine Glutamique, aboutissant à la conformation « fermée » de Smo. En présence d'Hh, les charges négatives apportées par les groupements phosphates dus aux phosphorylations par les kinases PKA/CK1 et GSK3 permettent de neutraliser les charges positives du domaine Arginine. Ceci aboutit à la rupture de l'interaction entre le domaine Arginine et le domaine Glutamique induisant l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo. Cette conformation « ouverte » de Smo est stable et permet l'activation de la voie Hh (Fig. 22a).

En plus de ce changement de conformation intra-moléculaire, Smo est capable de se dimériser dans son domaine N-terminal mais également *via* ses queues cytoplasmiques. Grâce à des expériences de FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster ou « Fluorescence Resonance Energy Transfer »), les auteurs ont montré que la dimérisation de la région N-terminale de Smo est constitutive alors que la dimérisation de Smo par sa partie C-terminale est régulée par Hh. De plus, les analyses de FRET ont permis de montrer l'existence de changement de conformation de Smo en plaçant les molécules fluorescentes dans deux parties distinctes de la queue cytoplasmique d'une même molécule de Smo afin de réaliser de l'intra-FRET. En absence d'Hh, le signal de FRET est élevé, indiquant une forte proximité entre les domaines Arginine et Glutamique dans la queue cytoplasmique conduisant à une conformation « fermée » et ainsi inactive de Smo. La présence d'Hh induit la rupture de l'interaction intra-moléculaire de Smo, et cette conformation dite « ouverte » car active (Fig. 22b). Pour aller plus loin dans leur étude, et tester l'importance de la dimérisation de Smo dans l'activation de la voie Hh, les auteurs ont mesuré la capacité de transduction des dimères chimériques de Smo en utilisant le système du récepteurs Eph (« EB2 : ephrin receptor 2 ») et de son ligand Ephrine B2 (« EphB2 : ephrin receptor 2 ligand ») (Himanen et Nikolov, 2003). La dimérisation, contrôlée par l'ajout du ligand EphB2, de deux molécules de Smo sauvages ou de formes constitutivement phosphorylées active la voie *in vitro* et *in vivo*, alors que les dimères composés de formes non phosphorylables de Smo ne sont pas capables d'activer la voie Hh. Cette expérience indique que, pour la transmission du signal, ce n'est pas la dimérisation de Smo qui est importante, mais plutôt le changement de conformation de sa queue cytoplasmique contrôlé par des

phosphorylations. Néanmoins, une fois en conformation ouverte, les queues cytoplasmiques de deux molécules de Smo vont s'associer, renforçant ainsi le signal Hh.

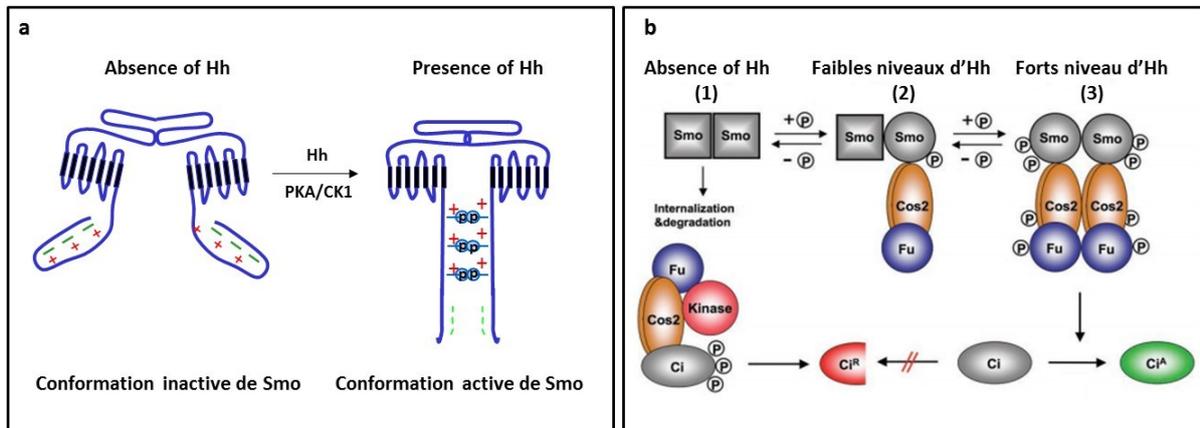


Fig. 22 : La régulation de l'activation de Smo par son changement de conformation et sa dimérisation.

a) En absence d'Hh, le domaine Arginine, chargé positivement, interagit avec le domaine Glutamique, chargé négativement, conduisant à la conformation inactive de Smo. Smo existe déjà à l'état de dimère, car les régions N-terminales de deux molécules de Smo s'associent de façon constitutive. En présence d'Hh, la phosphorylation des sites PKA et CK1, situés à proximité du domaine Arginine, apportent des charges négatives qui neutralisent les charges positives du domaine Arginine. Les liaisons électrostatiques entre ces deux domaines sont rompues, induisant l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo. Cette ouverture de la queue cytoplasmique favorise la dimérisation de deux molécules de Smo également par leur région C-terminale.

b) Zhao et al., 2007b, propose le modèle suivant pour la régulation différentielle de Smo et des gènes cibles en fonction du gradient Hh. 1) Le dimère Smo adopte une conformation inactive en absence d'Hh (carré). Le complexe cytoplasmique permet la formation du Ci répresseur (Ci-R). 2) En présence de faibles niveaux d'Hh, Smo est partiellement phosphorylée, permettant la formation d'un dimère de Smo hétérogène avec une molécule de Smo inactive et une molécule de Smo active (cercle). Dans cet état, Smo interagit partiellement avec le complexe de transduction, induisant la formation d'une forme de Ci pas totalement active. 3) La présence de forts niveaux d'Hh conduit à une forme de Smo hyperphosphorylée qui permet la formation d'un dimère de Smo active. Chacun des monomères de Smo peut interagir avec un complexe cytoplasmique, aboutissant à des phosphorylations multiples des protéines appartenant aux deux complexes. Cette cascade de phosphorylation induit la formation du Ci activateur (Ci-A), probablement due à l'action de la kinase Fu.

Afin de potentialiser l'activation de la voie *via* Smo, il paraît logique de penser que la présence d'Hh doit inhiber la dégradation de Smo. Dans le paragraphe traitant de la dégradation de Smo (2.3.1.1), l'ubiquitination de Smo a été montrée comme nécessaire à sa dégradation. De manière intéressante, Hh est capable de diminuer cette ubiquitination, car une forme sauvage de Smo est moins ubiquitinylée dans des cellules activées par Hh. L'effet d'Hh sur l'ubiquitination de Smo est dépendant des phosphorylations de Smo par la PKA et CK1. En effet, l'inhibition de l'ubiquitination de Smo par Hh est abolie quand des cellules sont traitées avec un inhibiteur de la PKA. De plus, une forme non phosphorylable par la PKA

et CK1 est constamment ubiquitinylée, à l'inverse une forme constitutivement phosphorylée, affichent une réduction de son ubiquitination. Ces résultats montrent qu'Hh induit la phosphorylation de Smo par la PKA et CK1, et ces phosphorylations permettent d'inhiber l'ubiquitination de Smo et ainsi sa localisation à la membrane (Li et al., 2012). Les mêmes auteurs avaient identifié la β -arrestine Krz (krz) comme étant impliquée dans l'internalisation de Smo *via* son interaction avec sa queue cytoplasmique. Cette interaction est régulée par la présence d'Hh et également par l'état de phosphorylation de Smo, puisqu'une forme de Smo constamment phosphorylée se lie moins à Krz qu'un mutant de Smo incapable d'être phosphorylée. Ainsi l'action inhibitrice de Krz est contrecarrée par les phosphorylations de PKA et CK1 sur Smo, induites par la présence d'Hh.

Une autre protéine a été impliquée dans la régulation du trafic de Smo, il s'agit de la déubiquitinase UBPY/USP8, dont j'avais brièvement parlé dans la section 2.3.3.1. Les cellules mutantes pour UBPY/USP8 se caractérisent par une augmentation de l'ubiquitination de Smo ainsi qu'une réduction de la localisation membranaire de Smo, suggérant cette fois-ci un rôle positif de cette protéine sur la régulation de Smo (Li et al., 2012). L'étude de Xia et al., 2012 a confirmé le rôle de USP8 dans la régulation de Smo. En effet, les auteurs montrent que la surexpression d'USP8 permet l'accumulation de Smo *in vivo* et *in vitro*, et empêchent son internalisation dans les endosomes et sa dégradation par les lysosomes en réduisant l'ubiquitination de Smo. Des délétions de Smo ont permis d'identifier le domaine situé entre les acides aminés 625 et 753 comme étant la zone d'interaction entre USP8 et Smo. Dans ce domaine se trouvent les sites de phosphorylation de la PKA et CK1, suggérant une possible régulation de cette interaction par ces phosphorylations. Ceci a été confirmé par des expériences d'immunopécipitation, où l'interaction entre USP8 et Smo est diminuée quand un mutant de Smo non phosphorylable est utilisé, et est augmentée avec forme de Smo constamment phosphorylée (Fig. 23).

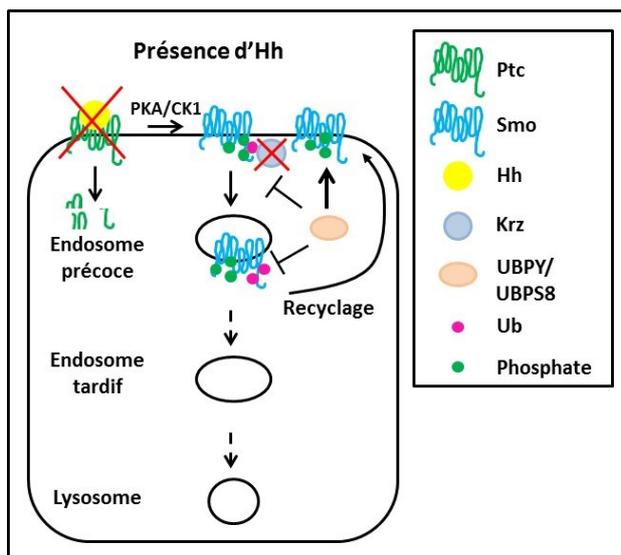


Fig.23 : Inhibition de la dégradation de Smo en présence d'Hh.

En présence d'Hh, la phosphorylation de Smo par les kinases PKA et CK1 inhibent la dégradation de Smo, favorisant ainsi son activation. Une forme de Smo phosphorylé n'est plus reconnue par Krz, qui était nécessaire à son internalisation, à l'inverse cette forme phosphorylée de Smo interagit avec USP8 qui va augmenter sa déubiquitination. Ce processus est dynamique, car les formes de Smo qui auraient pu être internalisées et encore ubiquitinylées, peuvent être recyclées grâce à l'action de USP8

(modifiée de Li et al., 2012).

L'ensemble des publications que j'ai abordé dans ce chapitre révèle l'importance des mécanismes de régulation contrôlant l'internalisation (Krz, Vps36 et Hrs), l'ubiquitination (Uba1 et UBPY/UBPS8) et la phosphorylation de Smo (PKA, CK1 et GSK3). Malgré ces avancées, aucun lien fonctionnel direct n'a été découvert entre Ptc et les mécanismes conduisant à la régulation de Smo. De plus, la régulation de Smo pourrait s'avérer encore plus compliquée, par la découverte d'autres protéines. Par souci de clarté de l'exposé, j'ai préféré décrire l'aspect complexe de la régulation de Smo dans un nouveau paragraphe même si des processus de phosphorylations entrent également en jeu dans cette régulation.

2.2.3.2.3 La régulation complexe de Smo

Par nature, Hh est un morphogène, c'est-à-dire une molécule capable d'induire différentes réponses cellulaires en fonction de sa concentration. Afin de traduire correctement le signal Hh, les cellules Hh doivent être capables d'interpréter les différents niveaux d'Hh, ceci passe par une régulation complexe de la protéine Smo. Cette fine adaptation de Smo aux différentes doses d'Hh est permise par de nombreuses protéines, telles que les kinases CK2, Gish β et GprK2 ainsi que les phosphatases PP1 et PP2A. Dans ce chapitre, j'ai choisi de parler de GprK2, car durant ma thèse, je me suis intéressée à cette protéine, et également des phosphatases PP1 et PP2A dont les fonctions sur la régulation de Smo sont relativement bien documentées.

Le rôle de Gprk2 dans la régulation de Smo

Chez la drosophile, il existe deux GRKs (protéines G couplées à des récepteurs kinases), GprK1 et GprK2, où seulement GprK2 est capable d'interagir et de réguler Smo (Chen et al., 2010). Cette kinase a un rôle positif dans la voie Hh (Molnar et al., 2007; Cheng et al., 2010), puisque GprK2 est nécessaire pour l'activation des gènes cibles de hauts niveaux d'Hh (*en*, *ptc*) mais pas pour les gènes cibles régulés pour des niveaux plus faibles d'Hh (*dpp*) (Chen et al., 2010). En effet, dans des clones mutants de *gprk2*, l'expression des gènes *en* et *ptc* est diminuée alors que l'expression de *dpp* n'est pas affectée. L'effet de GprK2 sur l'activation des gènes cibles passe par son rôle de kinase puisqu'une forme inactive du domaine kinase de GprK2 (« GprK2 kinase dead ») est incapable de sauver l'expression des gènes activés à hauts niveaux d'Hh (*en*). GprK2 phosphoryle Smo dans deux régions différentes de sa queue cytoplasmique, la sérine741 et la thréonine742 (GPS1 : site 1 de phosphorylation par GprK2) et les sérines 1013 et 1015 (GPS2 : site 2 de phosphorylation par GprK2). Les GPS1 sont situés dans la région comportant les sites PKA/CK1/GSK3 (Chen et al., 2010), suggérant une possible collaboration entre GprK2 et PKA/CK1 pour l'obtention d'une forme hyper-phosphorylée de Smo. Des essais kinases réalisés avec les formes mutantes de Smo dans lesquelles différentes combinaisons de mutations des résidus de PKA, CK1 et GprK2 ont été faites, indiquent que la phosphorylation de Gprk2 se déroule en aval de celles de PKA et CK1. En effet, la phosphorylation de la PKA et CK1 stimule la phosphorylation de Smo par GprK2, alors que la phosphorylation de GPS1 par Gprk2 n'influence pas les phosphorylations de PKA et CK1. Ces résultats indiquent que PKA/CK1 et

GprK2 coopèrent pour augmenter la phosphorylation de Smo, phosphorylation impliquée dans l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo et la dimérisation de Smo (Zhao et al., 2007a). Pour compléter leur étude, les auteurs ont ensuite testé l'effet de GprK2 sur les changements de conformation de Smo, en utilisant la même technique de FRET que Zhao et al., 2007a. La présence d'Hh, entraîne une augmentation du FRET entre deux molécules de Smo *via* leur partie C-terminale, indiquant une augmentation de leur proximité qui traduit une dimérisation renforcée de Smo, et une diminution du FRET intra-moléculaire de la queue cytoplasmique, démontrant une ouverture de la conformation de Smo (Zhao et al., 2007a). En absence de GprK2, l'augmentation de FRET entre deux molécules de Smo est réduite et la réduction du FRET intra-moléculaire est affectée. Ces résultats montrent que GprK2 agit à la fois sur la dimérisation et sur l'ouverture de la conformation de Smo. Ainsi PKA/CK1 et GprK2 induisent une hyper-phosphorylation de Smo afin d'augmenter l'environnement acide de la région C-terminale de Smo qui est nécessaire à l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo, renforçant son activation.

Cependant, il semblerait que l'action de GprK2 sur l'activation de Smo ne nécessite pas seulement son activité kinase, puisqu'une forme de Smo mimant une phosphorylation constante par GprK2 est incapable de sauver les hauts niveaux de transduction dans des mutants *gprK2* (Chen et al., 2010). Des expériences de FRET révèlent que GprK2 est capable d'induire la dimérisation et le changement de conformation de la queue cytoplasmique également *via* un mécanisme indépendant de son activité kinase. Pour explorer ce mécanisme, les auteurs ont analysé l'interaction entre GprK2 et Smo. De manière intéressante, GprK2 se lie à Smo indépendamment de son activité kinase, puisqu'une forme kinase inactive de GprK2 est toujours capable d'interagir avec Smo. La délétion du domaine SAID de Smo (618-818), abolit l'interaction entre GprK2 et Smo, suggérant que l'interaction entre ces deux protéines est médiée par ce domaine. Ainsi, un des aspects de ce mécanisme indépendant de l'activité kinase de GprK2, serait de promouvoir son interaction avec le domaine SAID de Smo afin d'empêcher son effet auto-inhibiteur. Récemment, une étude semble avoir élucidé une partie du mécanisme selon lequel GprK2 agit indépendamment de son activité kinase pour réguler Smo. Il s'agit de l'étude de Jiang et al., 2016 que j'ai déjà mentionnée dans la section expliquant comment Ptc inhibe Smo (2.2.1.2). Dans cette publication, les auteurs montrent que l'activité de Smo est régulée par son interaction directe avec les PI4Ps *via* un domaine Arginine situé vers la position 730 de la région C-terminale de Smo. Cette interaction favorise la phosphorylation de Smo par PKA et CK1 et également sa dimérisation, changement de conformation impliquée dans son activation. De manière intéressante, ils ont identifié GprK2 comme étant impliquée dans la régulation de Smo par les PI4Ps. En effet, dans leur étude, les auteurs analysent le rôle du domaine PH (« pleckstrin homology ») de GprK2 sur l'activation de la voie Hh. L'expression de GprK2 délétée de ce domaine (GprK2 Δ C) dans des mutants pour *gprK2* ne restaure pas l'expression des hauts niveaux de transduction. De plus, des expériences *in vitro* montrent que la phosphorylation de Smo n'est pas affectée par l'expression de GprK2 Δ C, suggérant que la perte de ce domaine n'affecte pas l'activité kinase de GprK2. Ces résultats indiquent que la

fonction du domaine PH de GprK2 peut probablement être impliquée dans le mécanisme par lequel GprK2 régule Smo indépendamment de son activité kinase. Pour étudier le rôle de ce domaine PH de GprK2 dans la régulation de Smo, les auteurs ont mené différentes expériences en utilisant le mutant GprK2 Δ C. *In vivo*, l'expression de GprK2 sauvage augmente la localisation membranaire des PI4P alors que GprK2 Δ C n'induit aucun changement. De plus, GprK2 Δ C a une localisation cytosolique alors que la forme sauvage se trouve principalement à la membrane plasmique. Ces expériences montrent que le domaine PH de GprK2 est requis pour l'enrichissement des Pi4Ps à la membrane plasmique des cellules par l'intermédiaire de la localisation membranaire de GprK2. Enfin, des expériences d'essai kinase associées à l'utilisation de différents mutants de *gprK2*, ont permis de démontrer que le domaine PH de GprK2 induit l'activation de Smo indépendamment de l'activité kinase de GprK2 en provoquant l'enrichissement des Pi4Ps sous l'effet d'Hh. Ces Pi4Ps entraînent la phosphorylation et l'activation de Smo en provoquant sa dimérisation.

L'ensemble des données sur GprK2 suggère un modèle plus complexe pour expliquer la régulation de Smo, dans lequel Smo à l'état activé existerait sous deux formes différentes par leur niveau de phosphorylation et leur conformation. Une forme moins active dont la régulation est dépendante des phosphorylations de PKA et CK1. Ces phosphorylations permettent l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo ainsi que la dimérisation de deux molécules de Smo *via* cette même région. Cette forme moins active de Smo est responsable de l'expression des gènes cibles activés à des niveaux intermédiaires d'Hh. Une deuxième forme hyper active de Smo qui est régulée par GprK2 *via* un mécanisme dépendant de son activité kinase et un mécanisme indépendant de son activité kinase, probablement *via* son rôle sur les Pi4Ps. Cette forme induit l'expression des gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh (Fig. 24).

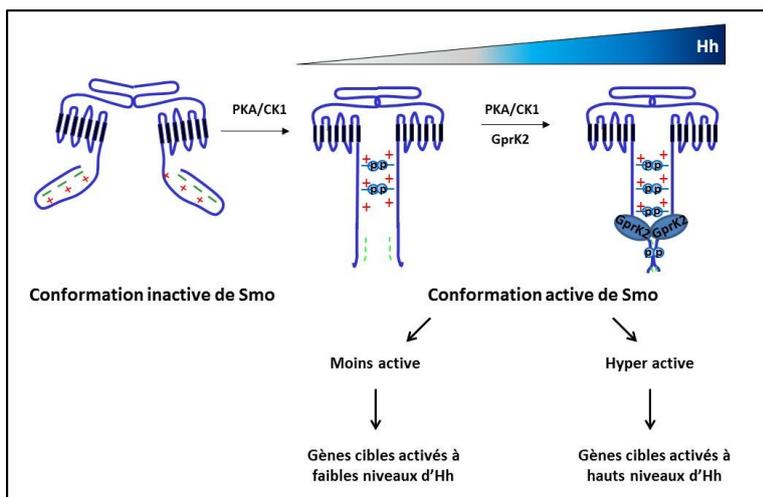


Fig. 24 : La régulation différentielle de Smo par GprK2

En absence d'Hh, Smo n'est pas phosphorylé, aboutissant à une conformation inactive. En présence de faible quantité d'Hh, PKA/CK1 phosphoryle Smo conduisant à l'ouverture de la queue cytoplasmique de Smo, et à la dimérisation partielle de deux molécules de Smo. Cette conformation aboutit à un premier

niveau d'activation de Smo qui permet l'expression des gènes cibles à faibles niveaux d'Hh. En présence de fortes doses d'Hh, la phosphorylation de GprK2 qui s'ajoute à celles de PKA et CK1, permet une conformation encore plus active de Smo, probablement due à une dimérisation plus fortes des régions C-terminales de Smo. Cette conformation hyper active est responsable de l'expression des gènes cibles activés à forts niveaux d'Hh (modifiée à partir de Chen et al., 2010).

En plus, de son rôle de chaperonne entre les Pi4Ps et Smo, Gprk2 régule le trafic de Smo en présence d'Hh (Cheng et al., 2010). Même si cette régulation de Smo induit sa dégradation, j'ai choisi d'en parler dans le paragraphe consacré à l'activation de Smo, car il s'agit d'un processus de désensibilisation qui est nécessaire à réprimer une forme activée de Smo afin d'empêcher une trop forte activation de la voie.

Chez la drosophile, l'analyse de mutants « gains de fonctions » et « perte de fonctions » par l'équipe de Cheng et al., 2010, indiquent que la protéine Gprk2 favorise l'internalisation d'une forme activée de Smo, probablement en phosphorylant Smo. La surexpression de Krz induit le même phénotype que la surexpression de GprK2, une diminution de Smo, suggérant que ces protéines coopèrent pour réprimer Smo. On peut imaginer que la phosphorylation de Smo par GprK2 entraîne le recrutement de Krz afin de provoquer l'internalisation de Smo. C'est d'ailleurs le cas chez les mammifères. L'étude menée par Chen et al., 2004 montre que la phosphorylation de Smo par GRK2 (orthologue de GprK2 chez les mammifères) permet le recrutement de la β -arrestine2 (orthologue de Krz chez les mammifères) et ainsi l'adressage de Smo à la dégradation. Même si à ce jour, aucune étude similaire n'a été faite chez la drosophile, et l'idée que GprK2 puisse permettre l'internalisation de Smo en présence de Krz est plausible. En effet, dans le chapitre traitant de l'activation de Smo par l'inhibition de sa dégradation, j'ai décrit que les phosphorylations de Smo par PKA et CK1 étaient responsables de l'inhibition de l'interaction entre Krz et Smo (Li et al., 2012). Ici, il semblerait que la phosphorylation de Smo par GRK2/GprK2 soit responsable du recrutement de la β -arrestine2/Krz sur Smo. Ainsi, selon la kinase qui la phosphoryle, la protéine Smo sera soit stabilisée (PKA et CK1), soit dégradée (GprK2). De manière intéressante, l'activité de ces kinases est corrélée aux quantités de morphogène Hh reçu. Ainsi, pour des niveaux intermédiaire d'Hh, PKA et CK1 phosphorylent Smo, conduisant à sa stabilisation, *via* l'inhibition de son interaction avec Krz. A hauts niveaux d'Hh, la phosphorylation de Smo par GRK2/GprK2 est responsable de sa dégradation probablement *via* le recrutement de β -arrestin2/Krz. Il reste à découvrir le lien fonctionnel afin de mieux comprendre la complexité qui régule l'activation par GprK2 ou la dégradation de Smo par le complexe GprK2/Krz.

Le rôle des phosphatases PP1 et PP2A dans la régulation de Smo

L'interprétation correcte du gradient Hh, nécessite différents niveaux de phosphorylations de Smo qui sont permis par un certain nombre de kinases : PKA et CK1 pour les faibles doses d'Hh, GprK2 mais également CK2 et Gish pour les fortes doses d'Hh. L'état de phosphorylation d'une protéine est souvent le résultat d'une balance entre l'activité de kinases et de phosphatases. Ainsi, il est juste de penser que Smo peut également être régulé par des phosphatases. Une étude récente révèle que la régulation de l'état de phosphorylation de Smo est médié par l'action de deux phosphatases, PP1 et PP2A (Su et al., 2012). Ces deux phosphatases ont été découvertes lors d'un crible *ARNi* basé sur le fait que bloquer l'activité d'une phosphatase entraîne l'accumulation à la membrane plasmique de Smo ainsi que sa phosphorylation. De manière intéressante, différents rôles pour ces

phosphatases sont apparus. En effet, PP1 semble agir sur des formes de Smo faiblement phosphorylées alors que PP2A régule des formes de Smo hyper-phosphorylées. PP1 et PP2A interagissent directement avec Smo *in vitro*, ce qui valide l'idée que la fonction d'une phosphatase passe par son interaction directe avec son substrat. *In vivo*, l'inhibition de PP1 entraîne un « faible » phénotype « gain de fonction » d'Hh, alors que l'expression d'un dominant négatif de PP2A induit un « fort » phénotype « gain de fonction » d'Hh. Grâce à la génération d'un anticorps spécifique de la forme de Smo phosphorylé uniquement par la PKA, les auteurs ont pu déterminer quelles espèces de Smo phosphorylées étaient visées par les phosphatases PP1 et PP2A. PP1 déphosphoryle uniquement une forme de Smo phosphorylée par la PKA, alors que PP2A déphosphoryle une forme de Smo phosphorylée par la PKA et CK1, en ciblant des sites CK1.

Cette publication suggère un modèle dans lequel la phosphorylation différentielle de Smo, permise par distinctes kinases et phosphatases, traduit les différentes doses d'Hh. Selon les auteurs, la présence d'une très faible quantité d'Hh permet un premier état de phosphorylation de Smo, régulé par un couple de kinase/phosphatase inconnu, responsable de l'activation des gènes cibles de bas niveaux d'Hh. PKA et PP1 sont suffisants pour induire une forme de Smo phosphorylée uniquement par la PKA qui est capable de traduire des niveaux intermédiaire d'Hh. Enfin, CK1 et PP2A facilitent la signalisation des hauts niveaux d'Hh en maintenant la phosphorylation de Smo par la PKA et en ajoutant la phosphorylation par CK1 (Fig. 25).

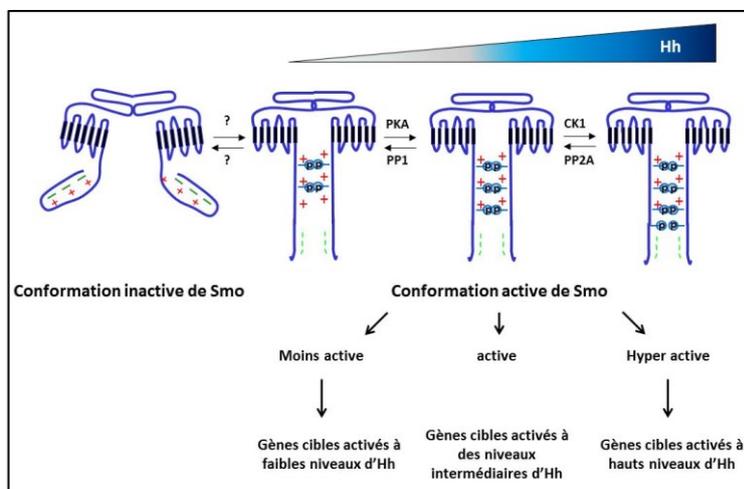


Fig. 25 : La régulation différentielle de Smo par PKA/PP1 et CK1/PP2A

En absence d'Hh, Smo a une conformation inactive. En présence de faibles niveaux d'Hh, l'état faiblement phosphorylé de Smo est contrôlé par un couple kinase/phosphatase inconnu, aboutissant à conformation moins active de Smo. Dans cette conformation, Smo agit sur

l'expression des gènes cibles activés à faibles niveaux d'Hh. L'action de PKA/PP1 permet la formation d'une forme de Smo un peu plus phosphorylée. Cette conformation active de Smo est responsable de l'activation des gènes caractéristique des niveaux intermédiaires d'Hh. L'état hyperphosphorylé de Smo est dû au couple CK1/PP2A, conduit à la conformation hyper active de Smo qui régule l'expression des gènes activés pour de hautes doses d'Hh (modifiée à partir de Su et al., 2012).

Mais ce modèle a été remis en question par la découverte de GprK2 comme kinase impliquée dans les hauts niveaux de transduction. On peut proposer que la fonction éventuelle de ces phosphatases pourrait être de désensibiliser la forme active de Smo. Même si le modèle de Su et al., 2012 est critiquable, il apporte une notion importante que le gradient d'Hh est traduit au niveau de Smo par différents états de phosphorylations. Ces états de phosphorylations différentielles seront transcrits au complexe de transduction afin d'adapter la réponse génique en fonction des doses d'Hh perçues.

2.2.4 Le(s) complexe(s) de signalisation

La transduction de la voie est un mécanisme complexe qui nécessite la combinaison de nombreuses régulations afin de transmettre le signal Hh de la membrane au noyau de la cellule. Le complexe formé par Fu/Cos2/Ci (Robbins et al., 1997; Sisson et al., 1997) agit comme l'élément central de la transduction de la voie Hh. Selon le signal, des modifications affectant la phosphorylation, la maturation, la stabilité et la localisation subcellulaire de ce complexe vont permettre l'expression des gènes cibles adaptée à la quantité de morphogène Hh perçue par la cellule. Le rôle majeur du complexe Fu/Cos est de réguler l'activité du facteur de transcription Ci. Dans ce chapitre, je tâcherai de montrer qu'un même complexe, selon le signal Hh, permet soit la formation d'un Ci-Répresseur (Ci-Rep : « Ci-Repressor »), le complexe Fu/Cos2 est alors qualifié de répresseur, soit la formation d'un Ci-Activateur (Ci-Act : « Ci-Activator »), le complexe est alors appelé activateur. J'insisterai sur le fait que le rôle activateur ou répresseur de ce complexe est permis par des changements de conformation entre les protéines au sein du complexe, et j'aborderai l'importance de Smo dans cette transition.

Avant de commencer ce chapitre, et afin de mieux comprendre le rôle des protéines du complexe sur la régulation de Ci, il est nécessaire de parler des différentes isoformes de Ci présentes dans la cellule en fonction du signal Hh.

2.2.4.1 Les différentes isoformes de Ci en fonction du signal Hh

La protéine Ci est le seul facteur de transcription de la voie de signalisation Hh. Ci est une protéine de 155 Kda qui contient un domaine de fixation à l'ADN de type « Zinc Finger » dans sa région N-terminale (Slusarski et al., 1995) et un domaine nécessaire à l'activation de la transcription, le domaine CBP (« CREB Binding Domain ») dans sa partie C-terminale (Chen et al., 1999). Deux sites de localisation nucléaire (NLS : « nuclear localization signal ») et d'exportation nucléaire (NES : « Nuclear Export Signal ») sont situés sur Ci afin de lui permettre de naviguer entre le cytoplasme et le noyau, et ainsi d'exercer sa fonction de facteur de transcription (Wang et Holmgren, 1999 ; Fig. 26a).

Selon le signal, Ci existe sous différents états dans la cellule. En absence d'Hh, Ci est un répresseur de 75KDa (Ci-Rep) (Aza-blanc et al., 1997), et les mécanismes permettant sa formation seront décrits au cours de ce chapitre. Le signal Hh induit la présence d'au moins deux isoformes de Ci en fonction de la quantité d'Hh. Pour des niveaux intermédiaires d'Hh,

une forme dite Ci-155 ou Ci-FL (« Full length ») régule l'expression des gènes cibles activés à des niveaux faibles ou intermédiaires d'Hh. A des niveaux élevés, Hh induit l'apparition du Ci activateur (Ci-Act), mais les mécanismes permettant sa formation ne sont toujours pas connus à l'heure actuelle. La différence d'activité entre ces deux protéines est due à leur région C-terminale. Cette région contient le domaine CBP qui est responsable de l'association de la polymérase (Pol II) et de co-activateurs de la transcription avec Ci. Ces associations favorisent l'ouverture de la chromatine et ainsi l'activation de la transcription. La délétion de ces domaines conduit à l'absence de la transcription des gènes cibles, confirmant l'importance de cette région dans le rôle activateur de Ci (Alexandre et al., 1996). Ci-Rep ne possède pas de domaine CBP qui a été enlevé lors d'un processus protéolytique contrôlé, et de ce fait, il ne peut pas s'associer avec l'ARN pol II et les co-activateurs de la transcription. La protéine Ci-Rep est capable de se fixer sur l'ADN, mais incapable d'activer la transcription. De plus, récemment une étude a identifié le complexe Atrophin-Rpd3 agissant comme un co-répresseur de Ci. Celui s'associe au domaine N-terminal de Ci seulement en absence d'Hh, et régule négativement la transcription des gènes en jouant sur les niveaux d'acétylation des histones (Zhang et al., 2013 ; Fig. 26b).

Dans le disque imaginal de l'aile, Ci s'exprime uniquement dans le compartiment antérieur. L'utilisation de l'anticorps 2A1 qui reconnaît la partie C-terminale de Ci permet de décrire le profil d'expression très caractéristique de Ci (Slusarski et al., 1995 ; Fig. 26c). Ci-Act s'exprime dans 2 à 3 rangées de cellules proches de la frontière A/P, là où la quantité d'Hh est maximale. Cette forme de Ci est très peu détectée avec l'anticorps Ci2A1, et cette diminution d'immunodétection peut être interprétée, soit par une faible présence du Ci-Act, ou bien par une modification de sa nature biochimique ou structurale qui affecterait sa reconnaissance par l'anticorps 2A1. Ci-Act est cependant visualisable avec un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de Ci (Aza-Blanc et al., 1997), favorisant la seconde explication. Ci-155 s'exprime, sous forme d'un plateau dans quatre à cinq rangées de cellules, situées juste après Ci-Act vers la région antérieure du compartiment, qui reçoivent des doses intermédiaires ou faibles d'Hh. Enfin le Ci-Rep se trouve dans les cellules qui ne reçoivent pas d'Hh, localisées loin dans l'antérieur, et n'est pas reconnu par l'anticorps 2A1. Ceci s'explique par le fait que Ci-Rep ne possède pas de région C-terminale, domaine ciblé par l'anticorps. Ce profil différentiel d'expression des formes de Ci, révélé par cet anticorps, indique que l'activité de Ci est dépendante de la quantité de signal Hh perçue par les cellules (Fig. 26d). L'effet d'Hh sur ces différentes formes de Ci a été démontré par l'utilisation de mutants de composants de la voie Hh (Methot et Basler, 1999). Dans les mutants Smo, la quantité de Ci-155 diminue au profit du Ci-Rep, démontrant un clivage constitutif de Ci en absence d'Hh. L'analyse de mutants pour Ptc, montre une stabilisation de Ci-155, et Ci-Act, ainsi qu'une l'activation des gènes cibles, indiquant une activation constitutive de la voie Hh.

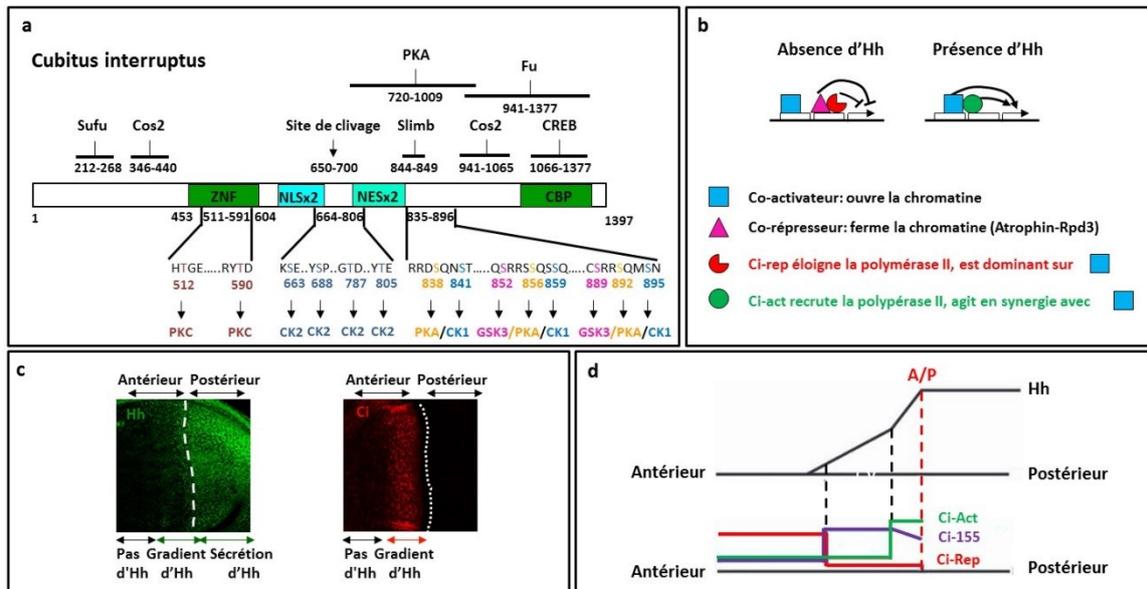


Fig. 26 : La régulation de Ci en fonction du signal Hh

a) Représentation schématique de la protéine Ci. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale se trouve le domaine de liaison à l'ADN (ZNF : « Zinc Fingers Domain »), le site d'import nucléaire (NLS), le site d'export nucléaire (NES) et le domaine d'activation de la transcription (CBP : « CREB Binding Protein »). Les sites de phosphorylations des différentes kinases agissant sur Ci ainsi que les interactions avec les protéines du complexe de transduction sont indiqués sur le schéma (*adaptées à partir de l'HDR de Laurent Ruel*).

b) Ci-Rep, Ci-155 et Ci-Act peuvent interagir avec l'ADN par le domaine ZNF, mais ont des fonctions opposées. Ci-Rep empêche la polymérase II et ces co-activateurs d'effectuer la transcription, mais s'associe à un de ses co-répresseurs identifié (Atrophin-Rpd3) afin d'entraîner la fermeture de la chromatine conduisant à l'inhibition de la transcription de ses gènes cibles (1). Ci-155 et Ci-Act recrutent la polymérase II qui est associée à la machinerie de transcription par le domaine CBP. Cette association permet au complexe d'agir en synergie avec les co-activateurs de la transcription qui induisent l'ouverture de la chromatine, facilitant ainsi la transcription des gènes cibles de Ci (2) (*modifiée à partir de Müller et Basler, 2000*)

c) Disques imaginaux d'ailes sauvages immunomarqués avec Hh ou Ci (2A1). Hh est sécrété par les cellules du compartiment postérieur, et agit sous forme de gradient dans les cellules du compartiment antérieur. Le gradient d'Hh est corrélé avec l'expression des différentes isoformes de Ci. Les formes Ci-Act (proche de l'A/P) et Ci-Rep (domaine où Hh est absent) ne sont pas reconnues par l'anticorps 2A1, alors que l'anticorps 2A1 reconnaît la forme Ci-155 situé dans la zone où les cellules reçoivent des niveaux intermédiaires d'Hh. Cet outil est très utile pour visualiser et quantifier le degré de signalisation Hh dans différents contextes génétiques.

d) Les trois isoformes de Ci s'expriment dans trois zones le long de l'axe antéro-postérieur, qui correspondent à des niveaux d'Hh différents. Le signal Hh est produit dans le compartiment postérieur, et diffuse selon un gradient de concentration dans le compartiment antérieur (reflète l'immunomarquage d'Hh en **C.1**). Les niveaux d'expression des protéines Ci-Rep (violet), Ci-155 (vert) et Ci-Act (rouge) varient également le long de l'axe antéro-postérieur (*modifiée à partir de Wang et Holmgren, 1999*).

2.2.4.2 La formation du Ci-Répresseur par le complexe Fu/Cos2 en absence d'Hh

En absence d'Hh, Ptc inhibe Smo par différents mécanismes, ce qui entraîne d'une part la dégradation de Smo et d'autre part une localisation cytoplasmique du complexe Fu/Cos2/Ci. Au sein de ce complexe, Fu et Cos2 ont un rôle déterminant pour permettre la formation du Ci-Rep. Dans le chapitre suivant, je décrirai l'importance de ce complexe dans la formation du Ci-Rep.

2.2.4.2.1 Le complexe répresseur Fu/Cos2

L'importance de Cos2 dans l'inhibition de la voie Hh vient de l'observation que dans des clones mutants « perte de fonction » de Cos2, Ci 155 s'accumule. Ceci indique une diminution de la formation du Ci-Rep, probablement due à un défaut de protéolyse du Ci-155 (Sisson et al., 1997; Wang et Holmgren, 2000). A l'inverse, la surexpression de Cos2 dans le disque de l'aile entraîne une diminution de l'expression de Ci (Wang et Holmgren, 2000), associée à une réduction de l'expression d'un *ptc-lacZ*, confirmant un rôle négatif de Cos2 sur la voie Hh. Cos2 est une protéine de type kinésine (Farzan et al., 2008; Sisson et al., 1997; Wang et Jiang, 2004), capable de se déplacer le long des microtubules (MTs : « Microtubules ») en hydrolysant de l'ATP. Cos2 est formée par trois domaines : un domaine moteur (MT) constitué du site de fixation à l'ATP et du site de fixation des microtubules situé dans sa partie N-terminale ; un domaine « Hep repeats » localisé dans sa région centrale et qui aurait un rôle dans sa dimérisation ; un domaine Cargo dans sa partie C-terminale, qui servirait à interagir avec des molécules destinées à être transportées (Goldstein, 1993) ou avec d'autres protéines de la voie Hh, notamment avec Smo. Les protéines Fu et Ci interagissent avec Cos2 dans des domaines déjà identifiés (Monnier et al., 2002 ; Fig. 27).

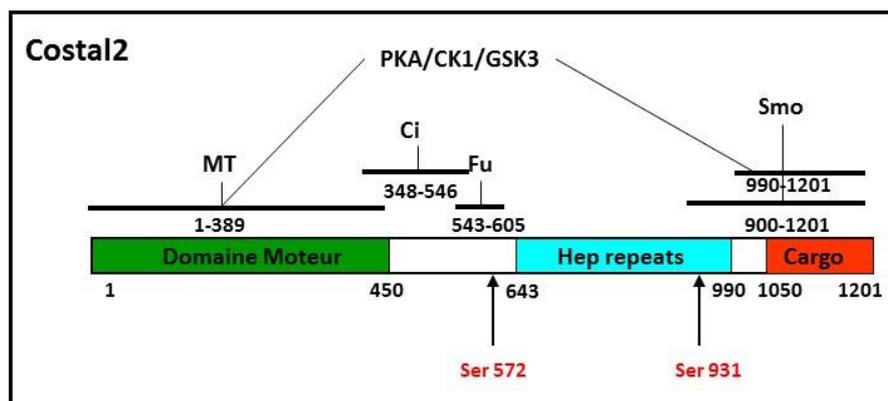


Fig. 27 : Représentation schématique de la protéine Costal2

Cos2 est caractérisée par la présence d'un domaine moteur en N-terminal, responsable de la liaison aux microtubules, d'un domaine « Hep repeats » et d'un domaine Cargo dans son extrémité C-terminale. La position des domaines de fixations aux différents composants de la voie Hh est indiquée sur le schéma. Les deux sérines phosphorylées par Fu sont également annotées. La sérine 572 se trouve dans le domaine d'interaction avec Fu alors que la sérine 931 se localise dans la zone d'interaction avec Smo (*modifiée à partir de l'HDR de Laurent Ruel*).

En absence d'Hh, Cos2 peut agir de différentes manières pour inhiber la voie Hh. Cos2 peut par exemple promouvoir la formation du Ci-Rep (Zhang et al., 2005). Grâce à des expériences d'immuno-précipitation et de localisations subcellulaires, les auteurs ont montré que Cos2 forme un complexe avec les kinases PKA/CK1 et GSK3, kinases responsables de la phosphorylation de Ci et par conséquent de la formation du Ci-Rep. De plus, l'expression de ces kinases, dans des clones mutants pour Cos2 où normalement Ci-155 s'accumule, restaure la formation du Ci-Rep. Ces expériences suggèrent que Cos2 agit comme une protéine d'échaffaudage en rapprochant le substrat Ci, de ses kinases (PKA/CK1 et GSK3), permettant la maturation de Ci au sein du complexe que l'on peut qualifier de « complexe répresseur ».

Cependant, Cos2 semble pouvoir inhiber l'activité de Ci par un autre mécanisme que celui impliquant la formation du Ci-Rep. En effet, la surexpression d'un mutant de *ci* ne pouvant pas être protéolysé, induit l'expression ectopique de Ptc. La co-expression de ce mutant avec Cos2 restaure un niveau normal de Ptc, indiquant que Cos2 inhibe l'activité de Ci indépendamment de sa protéolyse (Wang et Holmgren, 2000). Des expériences de Chen et al., 1999 montrent que la surexpression de Cos2 dans des cellules en culture bloque l'entrée de Ci dans le noyau. Ceci suggère que Cos2 agirait sur l'activité de Ci en séquestrant Ci dans le cytoplasme, l'empêchant ainsi d'aller activer ces gènes cibles dans le noyau des cellules. D'ailleurs, les expériences *in vivo* de Wang et Holmgren en 2000 sont venues renforcer l'idée apportée par Chen et al., 1999. Afin d'évaluer le rôle de Cos2 dans l'import nucléaire de Ci, ils ont traité des disques mutants pour Cos2 avec du LMB (leptomycin B), drogue bloquant l'export nucléaire de Ci. Dans ces disques, ils ont observé une accumulation de Ci dans le noyau, confirmant que Cos2 est requis pour empêcher l'entrée de Ci dans le noyau. De plus ils ont identifié le domaine CORD (Costal2 responsive domain) de Ci, comme étant suffisant pour entraîner sa séquestration dans le cytoplasme par Cos2.

Etant donné que Cos2 est une kinésine, il est probable que les MTs participent à la fonction inhibitrice de Cos2, soit en favorisant la formation du Ci-Rep, soit en séquestrant Ci dans le noyau ou bien les deux. Cos2 interagit avec les microtubules seulement en absence d'Hh (Robbins et al., 1997; Sisson et al., 1997; Stegman et al., 2000). Farzan et al., ont montré que Cos2 peut se déplacer le long des MTs en transportant Fu et Ci. Un mutant de *cos2*, incapable d'hydrolyser de l'ATP (S182N), interagit toujours avec les MTs ainsi que Ci, mais est incapable de se déplacer le long des MTs (Farzan et al., 2008). L'analyse par Western Blot des différentes formes de Ci a révélé que le mutant Cos2 S182N affecte l'activité de Ci indépendamment de la formation du Ci-Rep (Ho et al., 2005). L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les MTs contribuent à la fonction inhibitrice de Cos2 en séquestrant Ci dans le cytoplasme et non pas en agissant sur la formation du Ci-Rep.

Cependant une nuance est à prendre en compte dans le rôle de Cos2 dans la voie Hh. En effet, l'expression de Cos2 à des niveaux non physiologiques bloque toutes les formes de Ci, dont le Ci-Act, dans le cytoplasme, conduisant à la perte d'activation de la voie, suggérant une fonction positive de Cos2 sur Ci. L'analyse plus en détail des phénotypes mutants de *cos2* a confirmé cette fonction activatrice de Cos2 sur Ci, puisqu'on observe une

accumulation de Ci-155 sans activation des gènes cibles à hauts niveaux (Wang et Holmgren, 2000). Le rôle activateur de Cos2 sera abordé plus tard au cours de ce chapitre.

L'autre protéine essentielle au complexe cytoplasmique est la protéine kinase Fu. Fu est une sérine/thréonine kinase constituée d'un domaine catalytique en N-terminal (Cat) et un domaine régulateur en C-terminal (Reg) (Fig. 28).

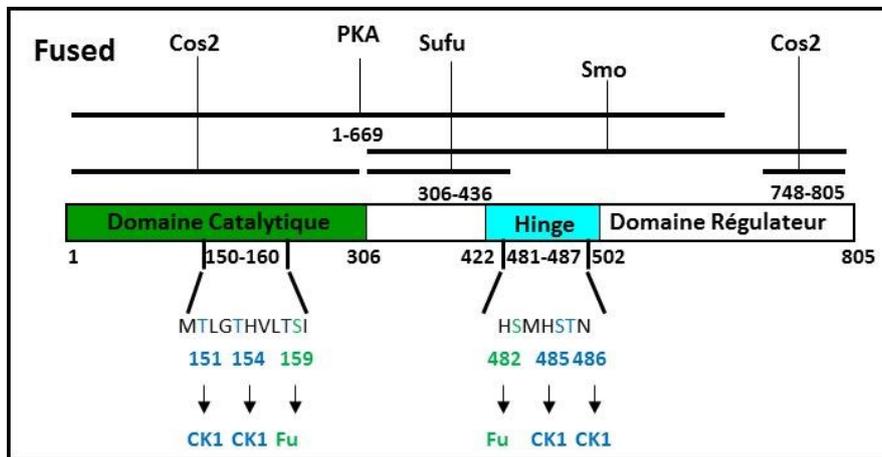


Fig. 28 : Représentation schématique de la protéine Fused

Fu est composé d'un domaine catalytique en N-terminal, qui interagit avec Cos2 et d'un domaine régulateur en C-terminal, qui se lie avec de nombreuses protéines : Sufu, Smo et Cos2. La PKA semble interagir à cheval entre les deux domaines (Ranieri et al., 2014). Les sites de phosphorylation annotés participent à l'activation de la kinase Fu. (Adaptée à partir de l'HDR de Laurent Ruel).

L'étude de cette protéine dans la voie Hh est basée sur l'utilisation de différents allèles mutants. Les allèles de classe I, par exemple fu^1 , sont caractérisés par une mutation du domaine kinase de Fu, résultant en une perte de son activité kinase (Alves et al., 1998; Therond et al., 1996). Les allèles de classe 2, l'instar de fu^A , sont une délétion du domaine C-terminal de Fu. Une observation rapide de ces allèles donne plutôt un rôle activateur à Fu, puisque les ailes des mouches portant ces allèles mutants affichent une réduction de l'espace entre les veines 3 et 4, phénotype caractéristique d'une inactivation de la voie Hh. Cependant dans ces disques, une activation ectopique de Dpp est observée avec une stabilisation de Ci-155 et une absence de Ci-Rep (Alves et al., 1998). Cette expérience suggère que Fu a une fonction dans la formation du Ci-Rep, ou bien que la protéine Fu joue un rôle dans la répression des gènes cibles. Ce phénotype rappelle celui des clones mutants de *cos2*, indiquant une relation entre ces deux protéines dans la régulation de Ci. Comme je l'ai dit plus haut, Fu, Cos2 et Ci forment un complexe (Robbins et al., 1997) au sein duquel Fu interagit par son domaine régulateur avec Cos2 (Monnier et al., 2002). D'ailleurs, dans les mutants de classe II, où le domaine régulateur est délété, l'interaction entre Fu et Cos2 est abolie alors que cette interaction est toujours présente dans les mutants *fu* de classe I, indiquant que l'activité kinase de Fu n'est donc pas requise pour la liaison entre Fu et Cos2 (Robbins et al., 1997). Ces résultats suggèrent que le rôle répressif de Fu pourrait être

attribué à sa capacité à former un complexe avec Cos2 *via* son domaine régulateur. Une étude menée par Ascano et al., 2002 renforce cette idée en montrant que le domaine régulateur de Fu se comporte comme un dominant négatif en réprimant la voie. L'ensemble de leurs résultats indique qu'en absence d'Hh, Fu est nécessaire à maintenir l'intégrité du complexe répresseur Fu/Cos2/Ci, complexe qui inhibe l'activité de Ci en permettant la formation du Ci-Rep et l'import de Ci dans le noyau.

De manière intéressante, en plus de sa fonction de protéine d'échaffaudage dans le complexe répresseur, Fu a été montrée comme pouvant inhiber la voie Hh en agissant négativement sur Smo (Malpel et al., 2007). Les auteurs de ce papier ont d'abord observé une colocalisation de Fu et Smo dans des vésicules en absence d'Hh. De manière intéressante, ils ont identifié que les 59 derniers acides aminés de la queue cytoplasmique de Smo étaient suffisants pour interagir avec Fu. L'utilisation d'un mutant délété de ses 59 derniers acides aminés (Smo Δ Fu) leur a permis de montrer que le recrutement de Fu par Smo dans les vésicules était dépendant de ce petit domaine. L'expression de Smo Δ Fu conduit à la stabilisation de Ci-155 ainsi qu'à l'activation ectopique des gènes cibles. Ce résultat a été confirmé par l'analyse d'ailes dans lesquelles l'expression de Smo Δ Fu induit un phénotype d'activation de la voie. De plus, l'expression de Smo Δ Fu dans des individus mutants pour *fu*, et plus particulièrement avec des allèles de classe 1 (perte de l'activité catalytique de Fu), restaure un phénotype sauvage. Ceci suggère que l'activité kinase de Fu est nécessaire à l'effet inhibiteur de Fu sur Smo. Les auteurs sont arrivés à la conclusion que les 59 derniers acides aminés de Smo interagissent avec Fu et que cette interaction, en absence d'Hh, conduit à inhiber le signal Hh. Dans le chapitre consacré aux résultats, je réétudierai et confirmerai l'effet de Smo Δ Fu, mais je fournirai une interprétation différente de son effet avec de nouvelles données.

Comme je l'ai expliqué au-dessus, le rôle du complexe répresseur, et en particulier de Fu et de Cos2, est de permettre la formation du Ci-Rep en absence d'Hh. Pour cela, ils agissent comme une plateforme afin de rapprocher Ci des kinases impliquées dans sa maturation en répresseur, notamment PKA, CK1 et GSK3.

2.2.4.2.2 La régulation de la formation du Ci-Répresseur

Comme Smo, Ci est un substrat des kinases PKA, CK1 et GSK3 (Chen et al., 1998; Jia et al. 2002; Price and Kalderon, 2002). A l'inverse du rôle positif de ces kinases sur Smo, leur fonction est ici négative puisque la phosphorylation de Ci aboutit à la formation du Ci-Rep qui inhibe le signal Hh. La première des kinases à avoir été impliquée dans la maturation du Ci-Rep est la PKA. En effet, dans des mutants « perte de fonction » de la *pka*, Ci-155 est stabilisé (Johnson et al., 1995) et Ci-Rep n'est pas formé, conduisant à une activation ectopique de Ptc et Dpp (Jiang et Struhl, 1998). Afin de démontrer que l'effet de la PKA sur Ci est bien dû à son activité kinase, l'équipe de Chen et al., 1998 a généré une forme de Ci où les sites de phosphorylation de la PKA ont été mutés. L'expression de cette forme mutée de Ci empêche la protéolyse de Ci, indiquant que la phosphorylation de Ci par la PKA entraîne le

clivage de Ci et ainsi la formation du Ci-Rep. Tout comme avec Smo, la PKA peut agir comme une première kinase, permettant de pré-phosphoryler Ci afin que cette dernière devienne un substrat pour d'autres kinases, notamment CK1 et GSK3 (Jia et al., 2002; Price et Calderon, 2002). Des expériences d'essai kinase ont permis de montrer que la formation du Ci-Rep nécessite d'abord la phosphorylation par la PKA, puis par GSK3 et enfin par CK1 (Jia et al., 2005). Dans ce papier, les auteurs attribuent également un faible rôle de Gish (CK1 γ) dans la formation du Ci-Rep. Cette kinase a aussi un rôle dans la phosphorylation de Smo, démontrant là encore un parallèle entre les phosphorylations de Smo et celles de Ci. Cependant, cette observation n'est pas valable pour toutes les kinases, puisque CK2, kinase connue pour phosphoryler Smo, peut également phosphoryler Ci mais cette fois-ci, cette phosphorylation a un rôle positif sur le signal Hh (Jia et al., 2010).

En ce qui concerne les kinases PKA, Gsk3, CK1 et Gish, elles jouent un rôle double et opposé dans le mécanisme de transduction du signal. D'une part, elles inhibent la voie de signalisation Hh en phosphorylant Ci, permettant la formation du Ci-Rep en absence d'Hh. D'autres part, en présence d'Hh, elles agissent comme des régulateurs positifs du signal Hh en phosphorylant Smo, qui est alors capable d'activer la transduction. Ainsi, en fonction du signal Hh, ces kinases ont des substrats différents, ce qui implique une régulation fine, et probablement des changements de conformation dans le complexe de transduction afin que les kinases choisissent le bon substrat. Durant ma thèse, je me suis d'ailleurs intéressée au rôle central du complexe Smo/Fu et de son importance dans la transition qui conduit à la formation d'un complexe activateur.

Etant donné que la régulation de la formation du Ci-Rep implique les mêmes kinases que l'activation de Smo, il est possible qu'à l'instar de Smo, une balance entre l'activité de kinases et phosphatases contrôle l'état de phosphorylation de Ci. Le papier de Jia et al., 2009 a identifié la phosphatase PP2A comme pouvant réguler l'état de phosphorylation de Ci. Les mutations « perte de fonction » *pp2a* conduisent à une diminution du niveau de Ci-155 associé à une réduction de certains gènes cibles comme *dpp*. Ces résultats indiquent que PP2A active la voie de signalisation Hh en régulant le niveau de Ci-155. L'analyse des interactions génétiques entre PP2A et les kinases impliquées dans la formation du Ci-Rep, leur a permis de montrer que PP2A contrecarre l'action de PKA et CK1 sur le signal Hh. En effet, PP2A diminue la phosphorylation de Ci-155 induite par la PKA, suggérant que PP2A inhibe la formation du Ci-Rep. Cependant, ce papier ne montre pas d'interaction directe entre PP2A et Ci, et il est possible que l'action de PP2A sur Ci puisse se faire de manière indirecte via un autre mécanisme pouvant impliquer d'autres protéines. D'ailleurs, une étude de Hernández et al., 2010 montre que l'activité kinase de GSK3 chez les mammifères est régulée par PP2A. Sachant que le rôle de GSK3 est conservé entre vertébrés et invertébrés, il est possible que PP2A agisse sur l'activité kinase de GSK3 afin de réguler la formation du Ci-Rep. Ceci suggère donc un mécanisme d'action indirecte de PP2A qui devra être confirmé par des études supplémentaires.

2.2.4.2.3 La formation du Ci-Répresseur

Dans le paragraphe précédent, j'ai parlé des protéines régulant la formation du Ci-Rep. De façon logique, je vais ici m'intéresser aux protéines impliquées directement dans la protéolyse de Ci.

Les multiples phosphorylations qui se déroulent sur Ci créent un site atypique de reconnaissance pour la protéine Supernumerary limbs (Slimb) qui est une protéine à boîte F. Slimb est une protéine clé du complexe ubiquitine ligase E3 de type SCF (« E3 Skp1-Cullin-F-box »), puisque c'est elle qui reconnaît le substrat devant être dégradé. Une fois son substrat ciblé, l'ubiquitine ligase E3 provoque l'addition de monomères ou de polymères d'ubiquitines sur ce dernier, conduisant à sa dégradation par le protéasome. Dans des disques mutants pour *slimb*, Ci-155 s'accumule, indiquant un défaut de maturation de Ci en répresseur (Jiang et Struhl, 1998). Les mutations des autres membres du complexe conduisent également à un blocage de la formation du Ci-Rep (Noureddine et al., 2002; Ou et al., 2002). Ceci indique que c'est bien le complexe SCF qui est responsable de la protéolyse de Ci. De manière intéressante, Jia et al., 2005 ont montré que c'est la phosphorylation par CK1 qui est reconnue par Slimb. Or, CK1 n'agit sur Ci que si la PKA et GSK3 ont déjà pré-phosphorylé Ci, indiquant que Ci doit être hyperphosphorylé pour être adressé au protéasome. Plusieurs études ont permis d'aboutir au modèle de maturation de Ci (Jia et al., 2005; Smelkinson et Kalderon, 2006; Smelkinson et al., 2007). Ainsi en absence d'Hh, l'hyperphosphorylation de Ci-155 permet sa fixation à Slimb, induisant son ubiquitination par le SCF et à la formation du Ci-Rep. Cependant, à l'heure actuelle il n'y a pas d'explication au fait que le protéasome ne dégrade pas Ci totalement. L'analyse de la structure de Ci semble indiquer que la lysine en position 750, proche du domaine en doigt de Zinc, formerait une structure stable qui agirait comme un signal d'arrêt de la protéolyse (Wang et Price, 2008 ; Fig. 29 et Fig. 30 à gauche).

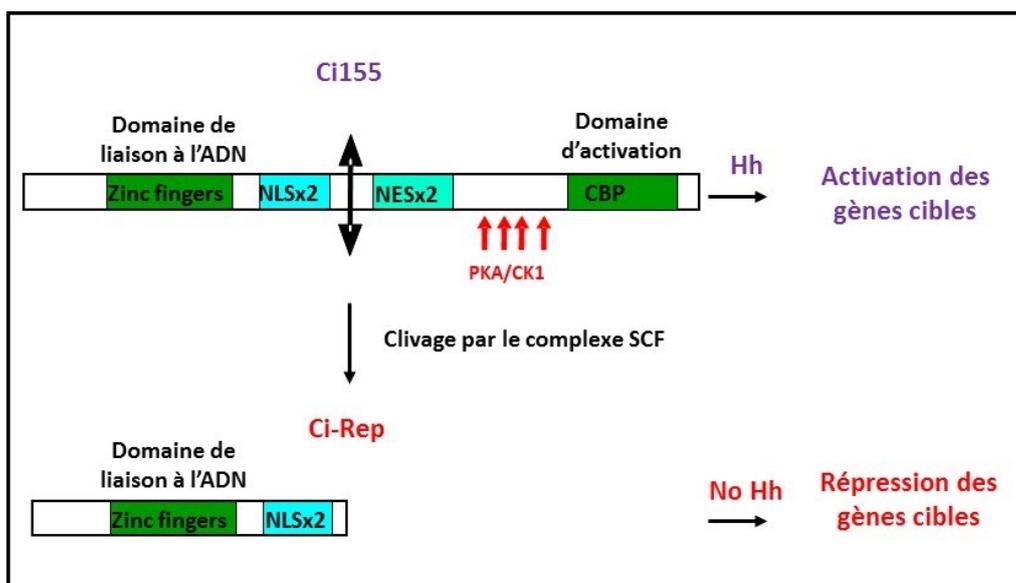


Fig. 29 : La formation du Ci-Répresseur en absence d'Hh

En absence d'Hh, PKA/CK1/GSK3 phosphorylent Ci-155, induisant une forme de Ci-155 hyperphosphorylée qui va être reconnue par le complexe ubiquitine ligase E3 de type SCF. Ce complexe apporte Ci-155 au protéasome qui va permettre la dégradation partielle de son extrémité C-terminale, aboutissant à la formation du Ci-Rep. Ci-Rep ne possède plus le domaine d'activation de la transcription, mais contient toujours le domaine de fixation à l'ADN, sa fixation conduit à la répression des gènes cibles de la voie Hh. En présence d'Hh, ces kinases ne phosphorylent plus Ci, puisqu'elles sont relocalisées vers Smo, permettant au Ci-155 d'activer ces gènes cibles (*modifiée à partir de l'HDR de Laurent Ruel*).

En plus de la dégradation partielle de Ci qui conduit à la formation du Ci-Rep, il existe des mécanismes de dégradation totale de Ci dans différents contextes de signalisation que je vais maintenant décrire.

2.2.4.3 La dégradation de Ci

En absence d'Hh, Ci peut être totalement dégradée, sous l'action de la protéine Debra (Dbr), qui est capable d'interagir avec Ci (Dai et al., 2003). La phosphorylation de Ci par la PKA, ainsi que la liaison de Slimb sur Ci, sont deux événements nécessaires pour que Dbr puisse dégrader Ci. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Slimb, Ci et Dbr forment un complexe au sein duquel Ci est polyubiquitinylé. En utilisant des drogues inhibant soit le protéasome, soit les lysosomes, les auteurs ont montré que la forme de Ci ubiquitinylée par Dbr est adressée aux lysosomes. La voie lysosomiale implique plusieurs étapes : la protéine devant être dégradée, est d'abord dirigée vers les endosomes précoces puis vers les corps multivésiculaires (« MVB : Multivesicular Body ») et enfin dans les lysosomes. L'ubiquitination a lieu dans les MVB et sert de signal pour diriger la protéine vers les lysosomes (Katzmann et al., 2001). Des expériences de microscopie électronique révèlent la présence de Dbr dans les MVBs, alors que Ci se trouve à la fois dans les endosomes précoces et les MVBs (Dai et al., 2003). Ceci suggère que la protéine Ci doit être préalablement dirigée vers les endosomes, puis dans les MVBs où elle sera ubiquitinylée par Dbr afin d'être dégradée par les lysosomes (Fig. 30 à droite).

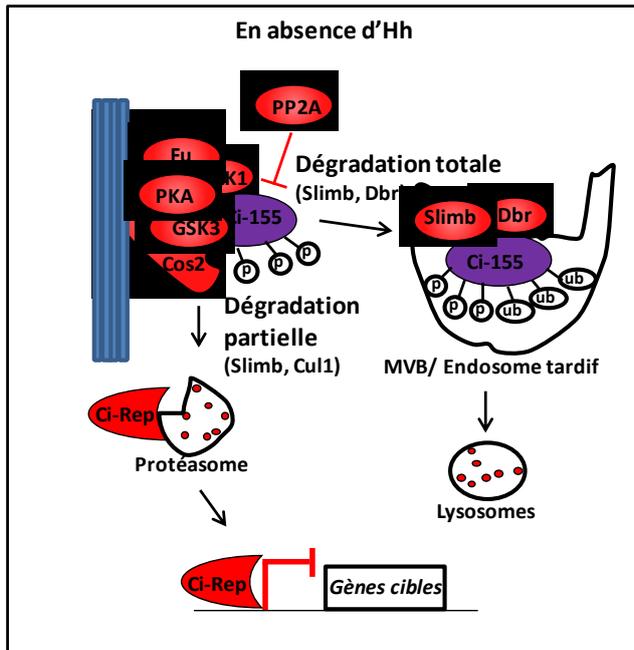


Fig. 30 : La régulation de Ci en absence d'Hh

Représentation schématique des méthodes alternatives pour la dégradation de Ci en absence d'Hh. Dans les cellules qui ne reçoivent pas le signal Hh, les phosphorylations de Ci-155 induisent sa dégradation partielle par le protéasome pour former le Ci-Rep, mais ces phosphorylations peuvent également entraîner la dégradation totale de Ci-155 par un autre mécanisme. La protéine Slimb est également impliquée dans ce processus, puisqu'elle va permettre à la protéine Ci d'interagir avec Dbr dans les MVBs, où Ci est ubiquitinylé et envoyé vers les lysosomes pour son élimination complète

(modifiée à partir de la thèse de Nadia Ranieri).

Un autre mécanisme de dégradation de Ci-155, en présence d'Hh cette fois-ci, a été décrit. Il fait intervenir un complexe ubiquitine ligase E3 de type CBC (culline2/ElongineB/ElongineC) (Kent et al., 2006). La famille des cullines se compose d'au moins 4 membres différents, et dans la dégradation du Ci-155, c'est la culline 3 (Cul3) qui est impliquée. L'équipe de Kent et al., 2006 a montré que la protéine Roadkill (Rdx : « Hh induced MATH » ; MATH : meprin and TRAF homology) agit comme une protéine adaptatrice en apportant Ci-155 à la Cul3, conduisant à l'ubiquitination de Ci-155, qui sera ensuite dégradé par le protéasome. De plus, ils ont démontré l'existence d'une boucle de rétro-contrôle négative, puisque que *rdx* est un gène cible des hauts niveaux d'Hh. Ainsi en présence de fortes doses d'Hh, la protéine Rdx réprime la voie Hh en entraînant la dégradation du Ci-155, affectant ainsi à la fois la formation du Ci-Rep et du Ci-Act. Un travail de Jia et al., 2010 indique un lien entre la kinase CK2 et la dégradation de Ci-155. La perte de CK2 par *ARNi* entraîne une augmentation de la dégradation de Ci alors que sa surexpression stabilise Ci. Dans ce papier, les auteurs ont identifié quatorze sites putatifs de phosphorylation de CK2 sur Ci dont les S663, S688, T787 et T805 ont été mutés pour cette étude. Ils ont montré que la phosphorylation de Ci par CK2 empêche l'ubiquitination de Ci et donc sa dégradation par une ubiquitine ligase de type E3 qu'ils n'ont pas réussi à identifier (Fig.31).

A l'instar de Ci-Rep et Ci-155, Ci-Act a été montré comme pouvant être dégradé par un complexe ubiquitine ligase E3 de type CBC, où la protéine adaptatrice n'est pas Slimb (Ci-Rep) ou Rdx (Ci-155) mais HIB (« Hh induced MATH and BTB domain ») (Zhang et al., 2006). HIB reconnaît Ci-Act et le présente à la Cul3 pour permettre son ubiquitination et dégradation par le protéasome. Tout comme *rdx*, *hib* est un gène cible des hauts niveaux d'Hh, révélant là-aussi une boucle de rétro-contrôle négatif afin de réguler le niveau de Ci-Act dans la cellule. En 2014, l'étude de Shi et al., a montré que la kinase CK1 protège

spécifiquement Ci-Act de la dégradation. En effet, la réduction de l'activité de CK1 conduit à une déstabilisation de Ci-Act, et par conséquent à une perte d'activation du signal Hh. CK1 agit en phosphorylant Ci-Act sur de multiples sérines/thréonines dans le domaine Degron de Ci-Act, empêchant la reconnaissance de Ci-Act par Hib, et donc sa dégradation (Fig. 31).

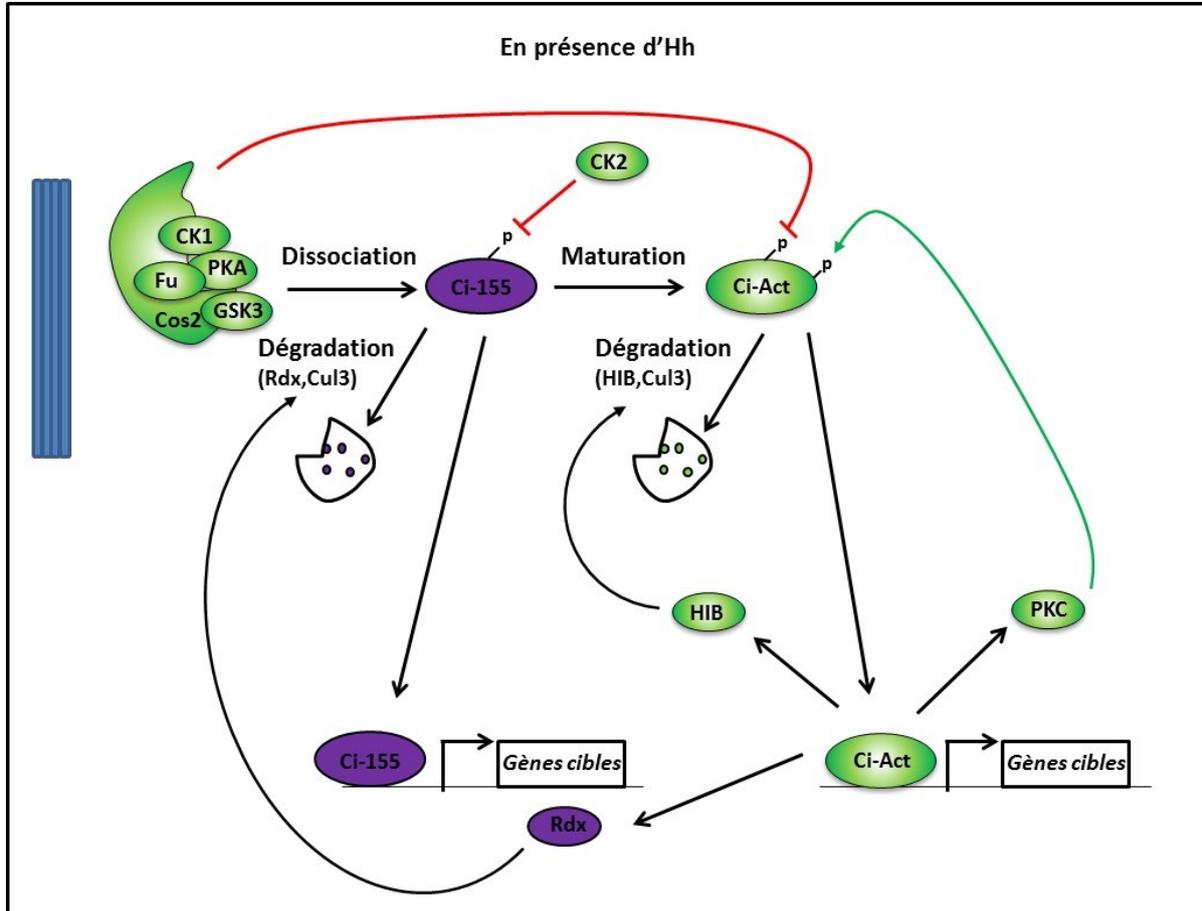


Fig. 31 : La régulation de Ci en présence d'Hh

En présence de faibles ou intermédiaires concentrations d'Hh, Ci-155 se dissocie du complexe et peut aller directement dans le noyau pour induire l'expression des gènes cibles activés à de faibles ou intermédiaires niveaux d'Hh. Pour de hautes doses d'Hh, Ci-155 va être mûrifié en Ci-Act qui sera transloqué dans le noyau pour contrôler l'expression des gènes cibles activés pour des hauts niveaux d'Hh, dont les gènes *hib*, *rdx* et *pkc*. Afin de contrôler les niveaux de Ci-155 et de Ci-Act dans la cellule, le complexe Rdx/Cul3 s'associe au Ci-155, alors que le complexe HIB/Cul3 interagit avec Ci-Act. Les différents complexes formés vont permettre l'ubiquitination, puis la dégradation des deux isoformes de Ci par le protéasome, révélant deux boucles de rétro-contrôle négatif. Comme abordé dans la section traitant de la régulation de la formation des formes activatrices de Ci : Ci-155 et Ci-Act, l'activation de la PKC par Ci-Act forme une boucle de rétro-contrôle positif, car la phosphorylation de Ci-Act par la PKC, promeut sa capacité de liaison à l'ADN, permettant d'augmenter la transcription des gènes activés pour des hauts niveaux d'Hh. Deux kinases, CK1 et CK2 permettent de protéger respectivement Ci-Rep et Ci-Act de leur dégradation en les phosphorylant, empêchant ainsi la reconnaissance de Ci-155 par le complexe Rdx/Cul3 et de Ci-Act par le complexe HIB/Cul3.

Entre dégradation partielle pour former le répresseur et dégradation totale pour contrôler la quantité globale de Ci, il reste à découvrir comment la cellule décide la façon dont elle va dégrader Ci. Un lien possible est la protéine Sufu.

2.2.4.4 Le complexe cytoplasmique Sufu/Ci

En plus du complexe Fu/Cos2/Ci, il existe un second complexe appelé Sufu/Ci qui contrôle la stabilité et l'activation de Ci. Sufu ne ressemble à aucune des protéines de la voie Hh (Preat, 1992), rendant difficile les spéculations à propos de son rôle dans cette signalisation. Le gène *sufu* code pour une protéine de 468 acides aminés qui est composée d'une séquence PEST (« Proline, Glutamic acid, Serine, Threonine ») et d'un domaine NES (Pham et al., 1995; Fig. 32). Cette séquence permet un rapide « turnover » des protéines qui la contiennent, mais à l'heure actuelle, la nécessité de posséder cette caractéristique dans la voie Hh n'est pas comprise (Rogers et al., 1986). Comme la plupart des protéines de la voie Hh, Sufu a été découverte lors d'un crible génétique dont le but était d'identifier des protéines pouvant restaurer le phénotype « perte de fonction d'Hh » de *fu* (Préat, 1992). Les mouches mutantes pour *Sufu* sont viables et ne présentent aucun phénotype. En particulier, le développement des tissus y compris de l'aile, n'est pas affecté. Ceci contraste avec le phénotype fort et létal des mutants où la protéine SUFU est absente chez les vertébrés, qui se caractérise par un « gain de fonction » de la voie Shh. Ces mutants sont capables de supprimer les phénotypes des deux classes mutantes de *fu*, et l'analyse de la perte de Sufu dans les individus *fu^A* (allèle de classe II) révèle un nouveau phénotype ressemblant à celui des mutants *cos2* (Preat et al., 1993). Ceci suggère que la fonction de Sufu serait de contrebalancer celle de la protéine Fu, probablement en interagissant à la fois avec Fu mais aussi avec Cos2. D'ailleurs, des analyses biochimiques ultérieures indiquent que la protéine Sufu est présente dans deux complexes différents, le complexe Sufu/Fu/Cos2/Ci et le complexe Sufu/Ci (Ogden et al., 2003; Robbins et al., 1997; Stegman et al., 2000). Une étude menée par Lum et al., en 2003 a défini le rôle d'Hh sur la régulation de ces deux complexes. En effet, Sufu interagit avec Ci indépendamment du signal Hh, alors que son interaction avec le complexe Fu/Cos2 est faible, instable, et détectée seulement en présence d'Hh. Des expériences de doubles hybrides en levure (Monnier et al., 1998) et d'immunoprécipitations dans le système d'expression baculovirus (Ogden et al., 2003; Stegman et al., 2000) indiquent que Sufu se lie directement à Fu et Ci au sein de ces deux complexes. Le domaine d'interaction entre Sufu et Fu a été localisé dans le domaine régulateur de Fu entre les résidues 306 et 436 de Fu (Monnier et al., 1998). Sufu se fixe à la partie N-terminale de Ci au niveau du domaine de liaison à l'ADN entre les acides aminés 212-268 (Methot et Basler, 2000 ; Monnier et al., 1998), suggérant un rôle de Sufu dans la régulation de la transcription par Ci, fonction qui a été démontrée chez les vertébrés (Cheng et Bishop, 2002; Paces-Fessy et al., 2004).

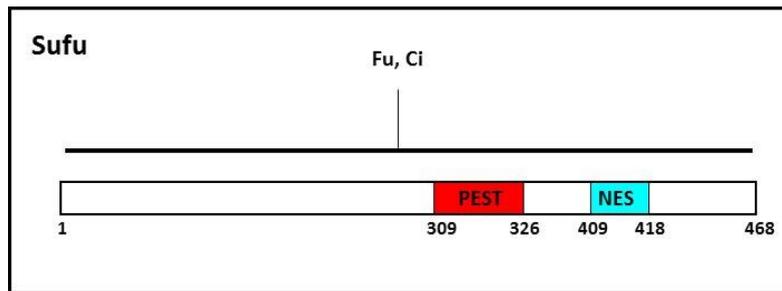


Fig. 32 : Représentation schématique de la protéine Sufu

Sufu est composé d'une séquence PEST et d'un domaine NES. Fu et Ci interagissent avec Sufu sur des domaines qui n'ont pas été déterminés (modifiée à Aikin et al., 2008).

En plus d'appartenir au même complexe que Fu, Cos2 et Ci, Sufu partage un autre point commun avec ces protéines, puisqu'elle est également phosphorylée en présence d'Hh. Cette phosphorylation est probablement due à la kinase Fu car les mutants de *fu* se caractérisent par une diminution de la phosphorylation de Sufu (Lum et al., 2003). Le rôle de Fu sur la phosphorylation de Sufu a été confirmé en 2011 par Zhang et al, et également par Zhou et Kalderon, la même année. Ces derniers ont d'ailleurs identifié les sérines 321 et 324 de Sufu comme cibles principales de la kinase Fu.

Dans la voie de signalisation Hh, Sufu est défini comme étant un régulateur négatif. Le principal exemple de cette fonction est la régulation de la translocation nucléaire de Ci. En effet, dans des clones exprimants Sufu, la quantité de Ci nucléaire est diminuée alors qu'à l'inverse, des cellules mutantes pour *Sufu* révèlent une augmentation de Ci dans le noyau (Methot et Basler. 2000). Ces expériences indiquent que Sufu régule négativement la voie Hh en séquestrant Ci dans le cytoplasme, empêchant l'entrée de Ci dans le noyau. De plus, l'activation ectopique de la voie Hh entraîne une accumulation de Ci-155, accumulation qui est réduite en absence de Sufu (Méthot et Basler, 2000; Ohlmeyer et Kalderon, 1998) . De manière intéressante, Fu a un effet opposé sur la stabilisation de Ci-155, puisque sa mutation induit une augmentation du niveau de Ci-155, associé à une activation ectopique du signal Hh (Alves et al., 1998 ; Ohlmeyer et Kalderon. 1998). Cette observation suggère que Ci-155 est une protéine labile qui est stabilisée et protégée de la dégradation grâce à son interaction avec SuFu en absence d'Hh. En présence d'Hh, la kinase Fu est activée, phosphoryle Sufu, entraînant la dissociation de Ci du complexe SuFu/Ci, qui va alors transloquer dans le noyau pour activer ces gènes cibles. Ceci a été validé par des expériences *in vitro* de Shi et al., en 2011 qui montrent que l'expression d'une forme activée de Fu induit une localisation nucléaire de Ci alors qu'avec une forme de Fu dépourvue de son activité kinase Ci reste dans le cytoplasme.

En 2006, Sisson et al., ont montré qu'en plus de Ci, le complexe Sufu/Ci est aussi capable de transloquer dans le noyau après un traitement avec la Leptomycin B (LMB : drogue bloquant l'export nucléaire : Fukuda et al., 1997). Dans leur étude, ils avaient également noté, à l'instar de Shi et al., 2011, que cette translocation nucléaire est dépendante de la présence d'Hh, puisque dans des mutants « pertes de fonction » de *Smo*,

Sufu/Ci reste dans le cytoplasme. Chez la drosophile, le rôle du complexe Sufu/Ci dans le noyau n'est pas documenté contrairement aux vertébrés où Sufu régule l'activité transcriptionnelle des protéines Gli par différents procédés (Cheng et Bishop 2002; Paces-Fessy et al., 2004; Zhang et al., 2016; chapitre 3). Cependant, cette fonction de régulation de l'activité du facteur de transcription pourrait être conservée chez la drosophile, puisque Sufu et Ci peuvent se lier aux chromosomes polytènes des glandes salivaires (Sisson et al., 2006). Des études complémentaires devront être menées pour mieux comprendre le rôle de Sufu sur l'activité du facteur de transcription Ci. Récemment, l'étude de Shi et al., en 2011 a révélé que Sufu, suite à sa phosphorylation par Fu, était localisée de façon nucléaire indépendamment de Ci, suggérant une autre fonction de Sufu, mise à part celle de réguler l'activité de Ci, à l'intérieur du noyau. Il est à noter que Sufu possède une séquence NES afin de sortir du noyau (Fig. 32), mais la séquence NLS n'a pas encore été identifiée. Cela suggère que soit la séquence NLS n'a pas été identifiée peut-être parce qu'elle n'obéit pas au consensus habituel ou bien que pour entrer dans le noyau, Sufu a besoin d'être associée à une protéine inconnue à l'heure actuelle.

Après un lien possible entre Sufu et régulation des gènes cibles, je vais aborder l'influence d'Hh sur la formation du complexe activateur qui nécessite de nombreux évènements.

2.2.4.5 La formation du Ci-Activateur par le complexe Fu/Cos2

Quand les cellules reçoivent le signal Hh, Ptc est dégradé, permettant la stabilisation et la relocalisation de Smo à la membrane plasmique. La protéine Smo se dissocie et va aller interagir avec le complexe Fu/Cos2/Ci. Cette interaction permet la transmission du signal Hh de Smo au complexe cytoplasmique par la phosphorylation de ces trois composants (Lum et al., 2003; Ogden et al., 2003; Ruel et al., 2003), aboutissant à la formation du Ci en activateur transcriptionnel

2.2.4.5.1 Le complexe activateur Fu/Cos2

La première étape du mécanisme d'activation est la phosphorylation de Smo par la kinase PKA. Comme je l'ai mentionné dans le paragraphe traitant de la régulation de la formation du Ci-Rep, la PKA se caractérise par une dualité de fonction dans la transduction du signal Hh. En absence d'Hh, elle permet la formation du Ci-Rep alors qu'en présence d'Hh elle permet l'activation de Smo. De ce fait, un mécanisme doit exister pour que la PKA choisisse le bon substrat en fonction du signal Hh.

Dans mon laboratoire, Ranieri et al., 2014 ont montré que la présence d'Hh provoque une relocalisation de la PKA de Ci vers Smo au sein du complexe de transduction. De manière intéressante, ils ont d'abord montré que la phosphorylation de Smo par la PKA est dépendante de la présence des protéines Fu et Cos2. En effet, dans des mutants pour l'une ou l'autre de ces protéines, la phosphorylation de Smo (détectée par un anticorps phospho-spécifique) est abolie. Des expériences, *in vivo* et *in vitro*, leur ont permis de monter une

association constitutive de la PKA avec le complexe Fu/Cos2, qui est indépendante du signal Hh. Au sein de ce complexe, il semblerait que ce soit la protéine Fu qui apporte la PKA à proximité de Smo et non Cos2. En effet, la PKA n'est plus associée à Cos2 dans des mutants Fu alors qu'elle reste associée à Fu dans des mutants *cos2*. De plus, cette association entre Fu et PKA est indépendante de l'activité kinase de Fu, indiquant un rôle structural de la protéine Fu, rôle que j'ai déjà évoqué dans le chapitre précédent sur la formation du Ci-Rep et qui a été confirmé par des expériences de cette étude. En effet, la formation du Ci-Rep est abolie dans les mutants « perte de fonction » de *fu* ou *cos2* alors qu'elle n'est pas affectée dans des mutants *fu*¹, mutants qui n'ont plus d'activité catalytique. Ainsi, ces résultats montrent que le complexe Fu/Cos2 permet de réguler la phosphorylation de Ci et Smo par la PKA, et également que la présence de Fu, mais pas son activité, est nécessaire pour rapprocher la PKA de ces substrats, lesquels sont associés à Cos2.

Afin de démontrer que le déplacement de la PKA de Ci vers Smo a lieu au sein du même complexe, et qu'il ne s'agit pas de deux complexes différents, comme le papier de Li et al., 2014 le suggère, les auteurs ont immunoprécipité Smo et analysé la présence de Ci et de la PKA. Sachant que Ci n'interagit pas directement avec Smo, la présence simultanée de Ci et de la PKA dans les immunoprécipitats de Smo, et le fait que la protéine Ci ne soit pas phosphorylée par la PKA malgré sa présence, confirme que Smo bloque l'accès de la PKA à l'un de ses substrats Ci. En utilisant la technique de complémentation par fluorescence bimoléculaire (BIFC : « Bimolecular fluorescence complementation ») qui permet de visualiser la proximité entre deux protéines, ils ont pu démontrer qu'en absence d'Hh, la PKA s'associe avec Ci alors qu'en présence d'Hh cette association est diminuée au profit de l'interaction entre PKA et Smo. Ce changement d'association peut s'expliquer par le fait que la PKA a une plus grande affinité pour Smo que pour Ci. De plus, cette augmentation de l'interaction PKA/Smo est corrélée avec une diminution de l'interaction PKA/Ci. L'ensemble de ces résultats a permis aux auteurs de proposer un modèle dans lequel la PKA est constamment présente et active au sein du complexe de transduction. Le signal Hh induit une relocalisation de la PKA de Ci à Smo et cette relocalisation constitue la première étape du mécanisme d'activation de la voie Hh. De ce fait, la présence de Smo au sein du complexe Fu/Cos2 permet de qualifier le complexe d'activateur.

Comme je l'ai dit dans la partie réservée à Smo, la présence d'Hh induit la phosphorylation de Smo par de nombreuses kinases. Plus la quantité d'Hh est importante, plus Smo est phosphorylée. Le complexe de transduction doit garder cette information de phosphorylation différentielle reçue par Smo à la membrane plasmique et la retranscrire au Ci-Act, qui va alors activer les gènes cibles dans le noyau en fonction des doses d'Hh perçues par la cellule. Claret et al., en 2007 ont mis en évidence une boucle de rétro-contrôle entre Smo/Fu qui est requise pour les hauts niveaux d'activation de la voie Hh. Dans leur étude, Ils ont montré qu'en présence d'Hh, Smo induit la relocalisation de Fu à la membrane plasmique, relocalisation qui permet probablement d'activer la kinase Fu. En effet, l'expression d'une forme de Fu ancrée à la membrane (Gap-Fu) conduit à une activation ectopique de la voie Hh, suggérant que la localisation membranaire de Fu contrôle son

activité. Une fois à la membrane, Fu augmente la stabilisation et la phosphorylation de Smo, aboutissant à la forme hyper-phosphorylée de Smo qui contrôle l'expression des gènes activés à hauts niveaux d'Hh (Fan et al., 2012; Su et al., 2012). Cependant, dans ce papier, les auteurs n'ont pas pu déterminer si l'augmentation de la phosphorylation de Smo observée en présence de Fu était due à l'action directe de Fu sur Smo.

Récemment, ces mêmes chercheurs ont publié des résultats qui affinent leur précédente étude en identifiant les sites de phosphorylation de Fu sur Smo (Sanial et al., 2017). En effet, quatre groupes de Sérine/thréonine (Ct) situés dans la partie C-terminale de Smo entre les positions 916 et 1036 sont phosphorylés par Fu. La phosphorylation de ces sites est nécessaire pour obtenir la forme hyper-phosphorylée de Smo, ainsi que l'expression des gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh, confirmant ainsi leur étude de 2007. Cette boucle de rétro-contrôle positive de Fu sur Smo apporte une complexité supplémentaire à la régulation de cette dernière, puisque Fu vient s'ajouter aux nombreuses kinases qui phosphorylent déjà Smo. Les auteurs expliquent le rôle de Smo et Fu sur l'activation des hauts signaux d'Hh dans un modèle que je décrirai plus en détail dans la partie discussion de ce manuscrit. D'après eux, l'activation de Fu se fait en plusieurs étapes, étapes qui sont corrélées à l'activation différentielle de Smo. Ainsi, la transmission des différentes doses d'Hh est communiquée au complexe de transduction *via* la relation entre Fu et Smo.

La protéine Fu a un rôle majeur dans la transduction du signal Hh. En absence d'Hh, elle agit comme une protéine d'échafaudage afin de rapprocher Ci de la PKA alors qu'en présence d'Hh, son activité kinase est essentielle à l'activation des gènes cibles de la voie Hh (Fukumoto et al., 2001). En effet, dans les mutants *fu* dépourvus d'activité catalytique (*fu¹*), Ci-155 est stabilisé, mais les gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh ne s'expriment pas (Alves et al., 1998). Cette donnée importante suggère que l'activité kinase de Fu est requise dans la fonction du Ci-Act, et cet aspect sera débattu plus tard.

Pour mieux comprendre l'activation de Fu, je vais revenir sur sa structure. Fu est constituée d'un domaine catalytique en N-terminal et un domaine régulateur en C-terminal (Fig.28). C'est par son domaine régulateur que Fu interagit avec de nombreuses protéines du complexe de transduction : Cos2 (Robbins et al., 1997 ; Sisson et al., 1997) ; Smo (Malpel et al., 2007) ; Sufu (Monnier et al., 1998) ; PKA (Ranieri et al., 2014) et même avec son domaine catalytique, formant ainsi une boucle intramoléculaire (Ascano et Robbins, 2004). D'ailleurs, Ascano et Robbins ont proposé un modèle de changement de conformation dans la structure de la kinase Fu pour expliquer comment s'effectue son activation. En absence d'Hh, le domaine catalytique et le domaine régulateur interagissent entraînant une conformation dite « fermée » de Fu qui est alors inactive et donc incapable de phosphoryler ses substrats. La présence d'Hh induit l'ouverture de cette conformation, permettant l'activation de la kinase Fu (Fig. 33).

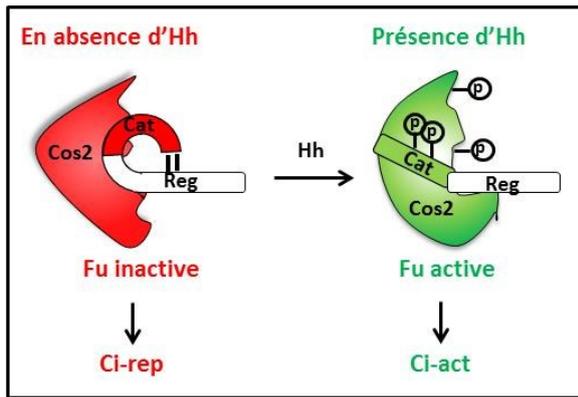


Fig. 33 : Le modèle d'activation de la kinase Fu

En absence d'Hh, le domaine catalytique (Cat) interagit avec le domaine régulateur (Reg) de Fu, aboutissant à une conformation « fermée » de la protéine Fu. Cette conformation est inactive, mais essentielle pour agir comme plateforme avec Cos2 afin d'induire la formation du Ci-Rep. La présence d'Hh entraîne l'ouverture de cette conformation, probablement par des phosphorylations dues à

CK1 ou à Fu elle-même. Une fois activée, Fu peut phosphoryler ces substrats comme Cos2, mais également induire la formation du Ci-Act par un mécanisme encore inconnu.

Hh pourrait entraîner l'ouverture de la structure de Fu en induisant de nombreuses phosphorylations notamment sur les thréonines 151, 154 et 159 localisées dans la boucle d'activation du domaine catalytique de Fu, mais également sur des résidus situés dans le domaine régulateur (S482, S485, T486) (Zhou et Kalderon, 2011). Ces phosphorylations peuvent être dues à la kinase Fu elle-même, les résidus en position 159 et 482 ont été identifiés comme étant des sites d'autophosphorylation de la kinase Fu, mais également à la kinase CK1 qui viendrait phosphoryler les sérines et thréonines 151, 154, 485 et 486 après que Fu ait été pré-phosphorylée. L'activation de la kinase Fu nécessite son interaction avec le complexe Smo/Cos2. En effet, l'activation ectopique induite par l'expression d'une forme hyper phosphorylée de Smo est perdue dans le double mutant pour Smo et Cos2 (Zhou et Kalderon, 2011). De manière intéressante, l'addition de Gap-Fu (Fu constitutivement activée et localisée à la membrane plasmique) restaure l'expression d'En. Ainsi Cos2 est requis pour permettre à Smo d'activer Fu, probablement en entraînant l'agrégation de Fu à la membrane plasmique qui va alors pouvoir s'activer par autophosphorylation. Cette idée a été validée par Shi et al., 2011 qui ont montré qu'Hh promeut la dimérisation de Fu de façon dépendante de Cos2 par des expériences de FRET. En forçant la dimérisation de Fu, ils ont obtenu une kinase constamment phosphorylée et activée, démontrant que la dimérisation de Fu est suffisante pour induire son activation. Ces expériences démontrent également que Cos2, comme la plupart des protéines de la voie Hh, peut agir comme un régulateur négatif ou positif en fonction du signal Hh. En absence d'Hh, Cos2 favorise la formation de Ci-Rep alors qu'en présence d'Hh elle permet l'activation de la kinase Fu et de Ci.

Une fois activée, Fu phosphoryle ses substrats dont la protéine Cos2 (Liu et al., 2007; Nybakken et al., 2002; Ruel et al., 2007). La phosphorylation de Cos2 par Fu se fait sur deux sérines : la sérine en position 572 et la sérine en position 931 (Nybakken et al., 2002 ; Fig.27). Dans mon laboratoire, Ranieri et al., ont généré des anticorps spécifiques de ces deux sérines afin d'étudier la fonction de ces résidus dans l'activation de Ci. Les auteurs ont montré que les phosphorylations sur ces sérines traduisent un état d'activation différentielle du complexe de transduction, permettant la formation d'une forme activatrice de Ci, adaptée à la dose d'Hh perçue. En effet, l'analyse des formes phosphorylées de Cos2 indique

que le gradient de Ci-155 est similaire au signal détecté par l'anticorps dirigé contre la sérine 572 alors le profil d'activation de la sérine 931 coïncide avec celui du Ci-Act. De plus, dans le mutant *gprk2*, protéine nécessaire à l'activation des gènes cibles à hauts niveaux en favorisant la conformation hyper-active de Smo (2.2.3.2.3), la phosphorylation de la sérine 931 est perdue alors que celle sur la sérine 572 n'est pas affectée. Ces résultats montrent que l'activation différentielle de Smo, corrélée à différentes étapes d'activation de Fu, (Sanial et al., 2017) est révélée au sein du complexe de transduction par la phosphorylation différentielle des sérines 572 et 931 (Ranieri et al., 2012).

L'étude de Sanial et al., 2017, ainsi que les publications de Ranieri et al., 2012 et Chen et al., 2010, ont permis d'élaborer un modèle dans lequel l'existence et la formation séquentielle de deux complexes de transduction permettent de transmettre un signal adapté aux doses d'Hh perçues par la cellule. A des niveaux intermédiaires d'Hh, Smo est phosphorylée par la PKA et CK1, aboutissant à une conformation active de Smo par l'ouverture de sa queue cytoplasmique et sa dimérisation (Zhao et al., 2007). Cette conformation de Smo permet d'activer Fu à un premier niveau qui est suffisant pour phosphoryler Cos2 sur la sérine 572 et aboutir à la formation du Ci-155. A des forts niveaux d'Hh, GprK2 induit l'hyper-phosphorylation de Smo qui va alors renforcer la dimérisation des extrémités C-terminales de Smo, aboutissant à la conformation hyper-active de Smo (Chen et al., 2010). Fu sera alors activée à un second niveau dans un complexe qualifié d'hyper-actif, où Cos2 est phosphorylée sur les sérines 572 et 931, qui est responsable de la formation du Ci-Act (Fig. 34). Cependant, une étude récente de Zadorozny et al., 2015 a montré que la phosphorylation de Cos2 par Fu sur les deux sérines, n'est pas requise pour la formation du Ci-155 et du Ci-Act due à l'activité de Fu en présence d'Hh. Ceci suggère que ces sites sont plus des rapporteurs de l'état d'activation de la kinase Fu que des effecteurs du mécanisme d'activation.

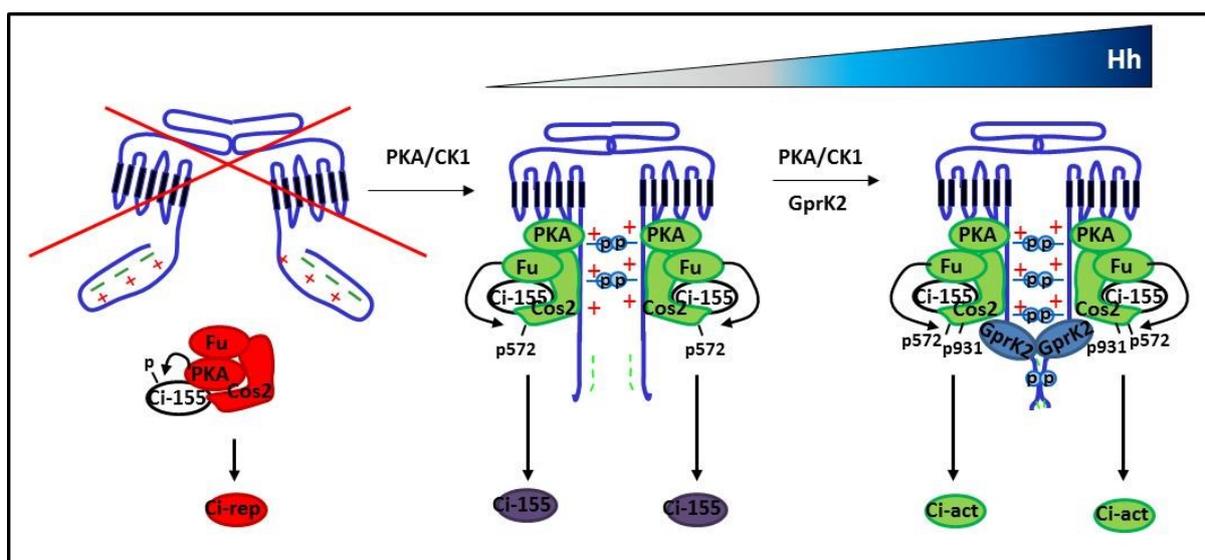


Fig. 34 : Le complexe Fu/Cos2 est activé de façon différentielle selon les niveaux d'Hh

En absence d'Hh, la PKA phosphoryle Ci, conduisant à la formation du Ci-Rep. En présence de faibles doses d'Hh, les kinases PKA et CK1 (CK1 n'est pas représenté ici pour faciliter la représentation graphique) phosphorylent Smo, entraînant l'ouverture de sa queue cytoplasmique. Cette conformation active de Smo induit un premier état d'activation de la kinase Fu qui va alors, d'une part phosphoryler Cos2 sur la sérine 572, et d'autre part conduire à l'activation partielle du Ci-155, probablement en permettant sa libération du complexe Fu/Cos2. A de fortes concentrations d'Hh, GprK2 phosphoryle Smo, renforçant ainsi la dimérisation des queues cytoplasmiques et aboutissant à une conformation hyper active de Smo. Dans cet état, Smo est responsable d'un second niveau d'activation de la kinase Fu. Fu phosphoryle alors Cos2 sur la sérine 931, et induit la formation du Ci-Act par un mécanisme qui reste à découvrir. En fonction des quantités d'Hh dans les cellules, ces deux complexes peuvent cohabiter, cela permet d'ailleurs une régulation plus fine des gènes cibles de la voie (Adaptée à partir de l'HDR de Laurent Ruel).

2.2.4.5.2 La régulation de la formation des formes activatrices de Ci : Ci-155 et Ci-Activateur.

Comme je l'ai expliqué au-dessus, il existe deux complexes activateurs en fonction des niveaux d'Hh. A des niveaux intermédiaires, un complexe actif se forme et permet la formation du Ci-155. La présence de hautes doses d'Hh induit le passage d'un complexe actif à un complexe hyper-actif dont le rôle est de produire le Ci-Act.

La formation du Ci-155 ne nécessite aucune modification post-traductionnelle en apparence. Il s'agit juste d'empêcher sa maturation en Ci-Rep en éloignant les kinases PKA/GSK3/CK1 de Ci et ce processus est dépendant de Smo. Ci-155 doit ensuite se dissocier du complexe de transduction pour aller réguler ces gènes cibles au niveau du noyau. De nombreux papiers ont montré que c'est l'activation de Fu qui induit la libération de Ci du complexe et sa translocation nucléaire (Ruel et al., 2007; Shi et al., 2011).

La formation du Ci-Act est un mécanisme encore étudié à l'heure actuelle, même si de récentes publications semblent donner des informations sur sa formation. Ce qui est connu est que cette forme de Ci est présente à des hauts niveaux d'Hh, et permet par conséquent l'expression des gènes cibles activés pour des hautes doses d'Hh. La régulation du Ci-Act implique la maturation du Ci-155 en Ci-Act. Le passage du Ci-155 à Ci-Act n'est pas beaucoup documenté même s'il semblerait que des phosphorylations soient impliquées. De manière évidente, Fu pourrait être une kinase agissant sur Ci, puisque les mutants qui ne possèdent plus d'activité catalytique (*fu¹*), ne sont pas capables d'activer les gènes cibles de hauts niveaux de la voie Hh. D'ailleurs des sites putatifs de Fu ont été localisés dans la région N-terminale de Ci, mais pour le moment, aucune étude n'a démontré un lien direct entre Fu et Ci.

Une partie des résultats de ma thèse sera consacrée à comprendre la relation entre ces deux protéines. Récemment la kinase PKC a été impliquée dans la régulation des gènes activés à hauts niveaux d'Hh (Jiang et al., 2014). Les auteurs ont montré que la PKC phosphoryle Ci sur deux résidus, les thréonines 512 et 590 qui se trouvent dans le domaine de liaison à l'ADN de Ci. Par des expériences de retard sur gel, ils ont montré que ces

phosphorylations augmentent la liaison de Ci à l'ADN, favorisant ainsi l'activation de ses gènes cibles. L'expression de la PKC est induite par Hh, démontrant ainsi une boucle de rétro-contrôle positif visant à promouvoir l'activation des gènes exprimés à hautes doses d'Hh (Fig. 31).

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre et détailler le mécanisme qui conduit à la formation du Ci-Act. Notamment, il serait intéressant de trouver une caractéristique biochimique permettant de visualiser directement cette isoforme et son profil d'expression.

Chapitre 3 : La voie de signalisation Shh chez les vertébrés

Chez les vertébrés, la transmission du signal Shh est classée en deux modes différents soit la voie canonique, similaire à la voie Hh chez la drosophile, soit la voie non canonique, dont deux types ont été identifiés. Durant ce chapitre, je m'intéresserai à ces deux voies, en essayant de faire le comparatif entre le mécanisme de transduction du signal Hh chez la drosophile et celui de la voie canonique chez les vertébrés. Le but de cette comparaison est de montrer que la drosophile est un bon modèle pour étudier une partie de la signalisation Shh des vertébrés.

3.1 Le cil primaire

La voie canonique ainsi que l'un des deux types des voies non canoniques de Shh se déroulent dans le cil primaire, structure fine non mobile qui est composée de microtubules. Ces cils primaires sont présents à la surface de la plupart des cellules des vertébrés mais pratiquement absents de celles des drosophiles, excepté dans les neurones sensoriels olfactifs où la voie Hh semble fonctionner de la même façon que chez les vertébrés (Kuzhandaivel et al., 2014). Les protéines du transport intraflagellaire (IFT) sont nécessaires pour l'assemblage et la maintenance du cil primaire, et certains membres de cette famille sont essentiels au bon déroulement de la transmission du signal Hh, dont les protéines des complexes IFT-A et IFT-B (Goetz et Anderson, 2010; Pedersen et Rosenbaum, 2008). Des mutations affectants les composants de la kinésine du complexe IFT-B, laquelle permet le transport antérograde de la base au sommet du cil, entraînent une perte du signal Hh (Goetz et Anderson, 2010). A l'inverse, des mutations sur la dynéine du complexe IFT-A qui est responsable du transport rétrograde allant du sommet à la base du cil, aboutit à une activation aberrante de la voie Hh (Goetz et Anderson, 2010). Cependant, à heure actuelle, le mécanisme par lequel les complexes IFT-A et IFT-B agissent sur le signal Hh, n'est pas documenté. Ces complexes pourraient interagir directement avec les composants de la voie Hh afin de réguler leur activité et leur localisation dans le cil, ou bien agir indirectement sur le signal Hh en maintenant l'architecture du cil. Des études récentes favorisent plutôt le deuxième mécanisme, suggérant que la fonction du cil serait de réunir les composants du signal Hh dans une même structure, agissant plutôt comme un échafaudage (Ocbina et al., 2011).

3.2 La voie canonique Shh

3.2.1 Le récepteur Ptch

Chez les vertébrés, il existe deux gènes *patched* qui codent pour deux protéines : Ptch1 et Ptch2. Ces deux protéines agissent de façon redondante dans la voie Shh, de ce fait, je poursuivrai ce chapitre en écrivant Ptch pour Ptch1 et Ptch2.

Comme chez la drosophile, Ptch est capable de se lier avec Shh, et de réprimer le signal Shh *via* son effet inhibiteur sur Smo. La réception du signal Hh/Shh sur Ptc/Ptch est renforcée par la présence de ses co-récepteurs Ihog et Boi chez la drosophile, et Cdo (« CAM-related/downregulated by oncogenes ») et Boc (« brother of CDO ») chez les vertébrés ainsi que Gas1 (« growth arrest-specific 1»), qui est spécifique aux vertébrés (Allen et al., 2011). L'élimination de ces deux ou trois co-récepteurs chez la drosophile, et chez la souris respectivement, conduit à la perte totale du signal Hh/Shh, démontrant l'importance et la conservation du rôle de ces co-récepteurs dans le mécanisme de transduction d'Hh/Shh (Allen et al., 2011; Zheng et al., 2010). Il est à noter, qu'en plus de Cdo, Boc et Gas1, les vertébrés possèdent une 4^{ème} protéine capable de se lier à Hh, Hip1 (« HH-interacting protein 1 »), qui n'a pas de fonction établie dans la réception du signal Hh (Bosanac et al., 2009; Chuang et McMahon, 1999). Cependant, Hip1 peut séquestrer et ainsi limiter la diffusion du morphogène Hh en entrant en compétition avec Ptc pour la liaison de ce dernier (Chen et Struhl, 1996; Chuang et McMahon, 2003). En addition de sa fonction de récepteur de Shh, Ptch agit comme un régulateur négatif de la voie en inhibant Smo. De manière intéressante, les localisations de Ptch et Smo dans le cil sont mutuellement exclusives, quand Ptch est présent, Smo ne l'est pas, et *vice versa*. La perte de Ptch est d'ailleurs suffisante pour entraîner une localisation constitutive de Smo dans le cil (Rohatgi et al., 2007). En absence de Shh, Ptch se trouve dans le cil et maintient Smo dans une conformation inactive, suggérant que le mécanisme de changement de conformation de Smo est conservé entre drosophile et vertébrés, conformation qui empêche l'entrée de Smo dans le cil (Rohatgi et al., 2007). A l'instar de la drosophile, le mécanisme par lequel Ptch inhibe Smo reste encore assez flou et les mêmes hypothèses ont été invoquées pour expliquer cette régulation. En effet, Bijlsma et al., 2006 ont montré que Ptch pouvait agir comme une pompe à proton en régulant le niveau de 3 β -hydroxysteroids (en particulier la pro-vitamine D3) qui réprime l'activité de Smo. Cependant le rôle de ces vitamines dans la modulation de l'activité de Smo *in vivo* reste à prouver. De plus, la voie de signalisation Shh et la relocalisation de Smo pourraient être également régulées par plusieurs oxystérols, notamment par des dérivés du cholestérol (Corcoran et Scott, 2006; Dwyer et al., 2007). Chez la drosophile, Yavari et al., 2010 ont montré que Ptc pouvait inhiber la voie Hh en régulant la synthèse des phosphatidylinositol 4-phosphate (Pi4P), révélant qu'une augmentation ou une diminution des niveaux de Pi4P intracellulaires menait à une activation ou inhibition de la voie Hh respectivement. Récemment, une étude chez les vertébrés a montré que les niveaux de phosphatidylinositols étaient également importants pour réguler la voie Shh dans le cil (Dyson et al., 2017). En effet, la mutation d'INPP5E (Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase E) conduit à un phénotype perte de fonction de *shh* chez la souris associé à une diminution des gènes cibles de la voie. Comme cette protéine transforme les Pi (4,5)P₂ en Pi4P, l'enlever induit une diminution du niveau de Pi4P, ce qui est en accord avec l'étude faite par Yavari et al., 2010, démontrant ici encore une conservation des mécanismes entre drosophile et vertébrés. Quel que soit le mécanisme par lequel Ptch inhibe Smo, Smo est ensuite dégradée, mais ce processus n'est pas bien décrit chez les vertébrés.

3.2.2 La répression du signal en absence d'Hh

En absence du ligand Shh, le mécanisme de transduction doit aboutir à la répression des gènes cibles de la voie. Contrairement à la drosophile, où un seul facteur de transcription, Ci, est capable de réguler les gènes cibles de la voie Hh, chez les vertébrés cette fonction est assurée par trois protéines de la famille Gli (« Glioma-associated oncogene ») : Gli1, Gli2 et Gli3. Gli2 et Gli3 sont à la fois des répresseurs (Gli-Rep : « Gli-Repressor ») et activateurs (Gli-Act : « Gli-Activator ») transcriptionnels alors que Gli1 est une cible de la voie Shh, en agissant uniquement en tant qu'activateur de la transcription. La maturation des Gli nécessite un complexe de protéines : SUFU, Kif7 et Kif 27, STK36 et ULK3, associé au cil primaire (Cheung et al., 2009; Endoh-Yamagami et al., 2009; Liem et al., 2009; Svärd et al., 2006).

En absence de Shh, le facteur de transcription Gli3 est dirigé vers le protéasome pour une dégradation partielle permettant la formation du Gli3-Rep (Tempé et al., 2006), alors que, Gli1 et Gli2 subissent une dégradation complète par le protéasome (Kaesler et al., 2000; Pan et al., 2006). Cependant, Gli 2 peut également subir un clivage protéolytique partiel, mais la maturation de Gli3 en Gli-Rep est plus efficace que celle de Gli2 (Pan et al., 2006). Ainsi, Gli3 sert de répresseur majeur alors que Gli2 aurait plus un rôle d'activateur que de répresseur (Hui et al., 2011). La différence d'efficacité de protéolyse entre Gli2 et Gli3 est due à une divergence de 200 résidus dans leur partie C-terminale, appelée PPD (« Processing Determinant Domain ») (Pan et Wang, 2007). Il a été proposé que le PPD de Gli3 entraîne l'arrêt précoce de la protéolyse, soit par une diminution de l'affinité de liaison avec le protéasome, soit à cause d'une structure secondaire qui empêche le protéasome de continuer sa fonction. Il reste cependant à déterminer l'intérêt de former une faible quantité de Gli2-Rep alors que la forme répressive de Gli3 semble suffisante pour inhiber la voie Shh efficacement. De plus, c'est la phosphorylation par la PKA qui permet d'initier la maturation de Gli2 et Gli3 en répresseurs ou la déstabilisation de Gli2-FL qui mène à sa dégradation totale par le protéasome (Pan et al., 2009). Le fait que Gli2 puisse être complètement dégradé suite à sa phosphorylation par la PKA, empêchant ainsi sa fonction activatrice, révèle une nouvelle fonction de la PKA (Fig. 33, à gauche).

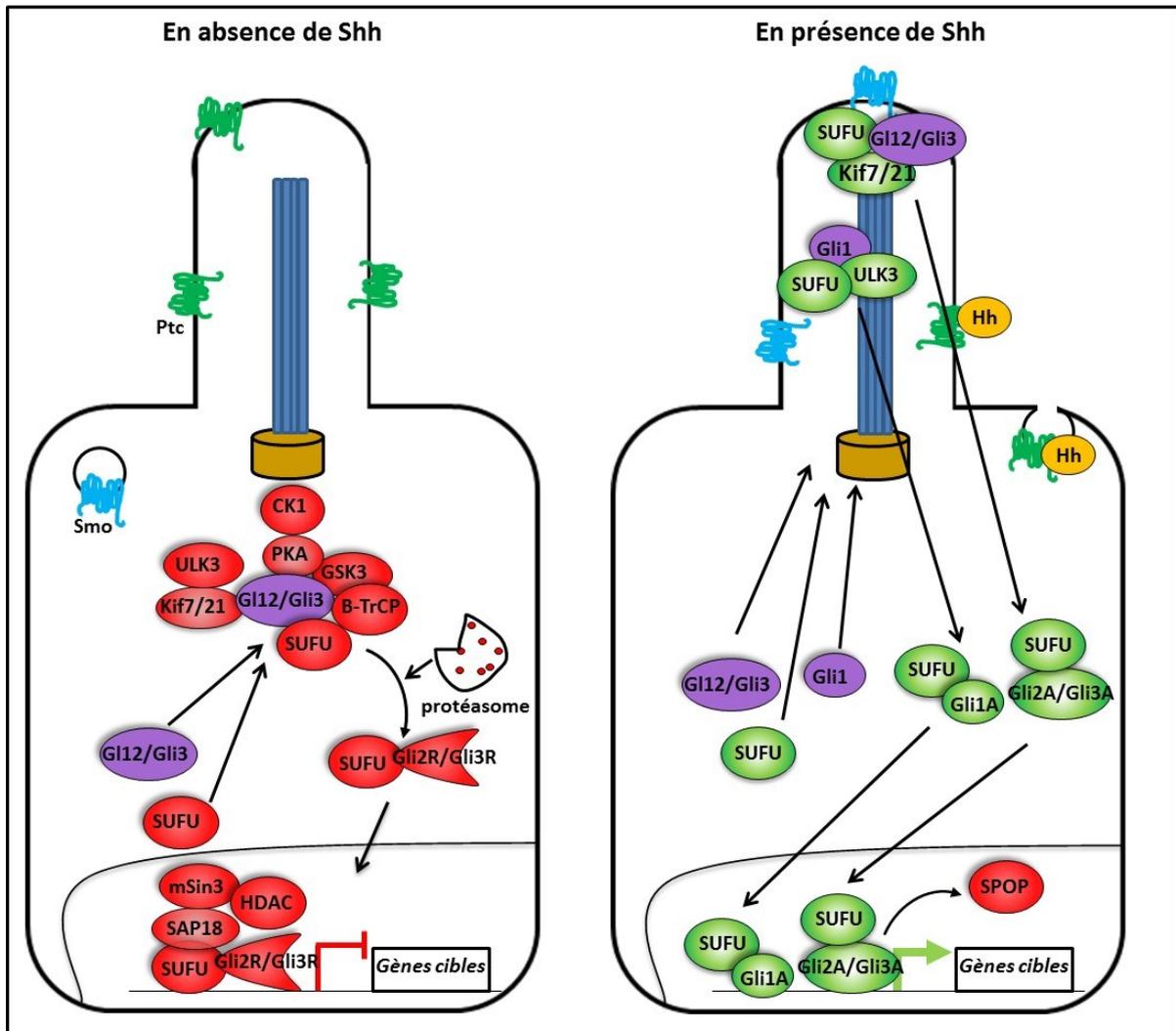


Fig. 33 : La voie canonique de signalisation Shh chez les vertébrés

En absence de Shh, Ptc est localisé dans le cil et empêche l'entrée de Smo. SUFU s'associe, stabilise et accompagne Gli2 et Gli3 au niveau de la zone basale du cil. Les protéines Gli2 et Gli3 sont phosphorylées par les kinases PKA/GSK3/CK1 au sein d'un complexe formé où se trouvent également les protéines ULK3, Kif7/Kif27, SUFU. Ces phosphorylations permettent de générer un motif qui est reconnu par le β -TrCP, molécule adaptatrice de l'ubiquitine ligase E3 de type SCF. L'ubiquitination de Gli2 et Gli3 dirige ces protéines vers le protéasome, dans lequel Gli2 est, soit totalement, soit partiellement dégradée comme Gli3 afin de former les formes répressives Gli2R et Gli3R. Le complexe SUFU/Gli2R/Gli3R forme alors un complexe répresseur qui va aller réprimer les gènes cibles dans le noyau, notamment en coopérant avec SAP18. En présence de Shh, Ptc est internalisé, permettant la localisation de Smo dans le cil. L'activation de Smo entraîne l'inhibition de la forme répressive de Gli3 et l'activation de Gli2, Gli1 et Gli3 (dans une moindre mesure), qui vont entrer dans le noyau et activer les gènes cibles de la voie Shh. Dans le mécanisme d'activation, SUFU pourrait participer à toutes les étapes. D'abord le complexe SUFU/Gli-Rep est exporté du noyau, puis SUFU est libéré et peut alors former un complexe activateur avec Gli1 mais également avec Gli2/Gli3. Ces complexes se dirigent vers le cil, où ils sont modifiés et rendus aptes à entrer dans le noyau grâce aux différents événements résultants de l'activation de Smo. Il semblerait qu'ULK3 fasse partie du complexe SUFU/Gli1 afin de favoriser la translocation nucléaire de Gli1 en association avec SUFU.

Une fois dans le noyau, les complexes SUFU/Gli1A et SUFU/Gli2A/Gli3A activent les gènes cibles de la voie Shh. A noter que le complexe Gli2A/Gli3A peut subir une dégradation *via* la protéine SPOP dans le noyau.

Chez les vertébrés la protéine SUFU, contrairement à son homologue Sufu de la drosophile, a un rôle essentiel dans le développement normal d'un individu et la maturation de Gli-FL (« Full length ») (Gli2 et Gli3) en Gli-Rep. En effet, dans des souris mutantes pour *sufu*, les niveaux de Gli-FL et Gli-Rep sont diminués, entraînant par conséquent une activation aberrante de la voie Hh qui ressemble à un phénotype « perte de fonction » de *ptch* ce qui conduit à la mort au cours de l'embryogénèse (Cooper et al., 2005; Svärd et al., 2006). D'un point de vue mécanistique, la protéine SUFU agit de différentes façons et à différents endroits dans la cellule pour inhiber le signal Shh. Comme chez la drosophile, elle est capable de séquestrer les facteurs de transcription Gli2-FL et Gli3-FL, afin d'empêcher leur translocation nucléaire et donc l'activation de la voie (Humke et al., 2010). Ainsi, en absence de SUFU, il a été proposé que Gli-FL entre dans le noyau, où il serait converti en Gli-Act. De manière intéressante, cette forme activatrice est reconnue par la protéine SPOP, molécule adaptatrice qui apporte Gli-Act à la Cul3 permettant son ubiquitination et sa dégradation dans le noyau (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2006, Zhang et al., 2009). Ceci est encore similaire à la drosophile où la protéine HIB et non SPOP, permet la dégradation du Ci-Act. De plus, il semblerait que SUFU et SPOP entrent en compétition pour la liaison de Gli-Act dans le noyau, puisque le niveau de Gli-Act est restauré dans des cellules où SUFU et SPOP ont été éliminées (Wang et al., 2010). L'ensemble de ces données indique que SUFU régule négativement la voie Shh en stabilisant Gli-FL dans le cytoplasme et en empêchant la dégradation et en séquestrant Gli-act dans le noyau.

Un autre rôle de SUFU est de promouvoir la phosphorylation de la partie C-terminale de Gli-FL par les protéines PKA qui agit comme une kinase primaire afin de fournir un substrat déjà phosphorylé aux protéines GSK3 β et CK1 α (Kise et al., 2009; Tempé et al., 2006). Gli-155 est alors reconnue par la protéine β -TrCP (l'équivalent de Slimb chez la drosophile) qui amène Gli-FL à l'ubiquitine ligase E3 de type SCF, puis sera ubiquitinylée et dégradée partiellement afin de générer le Gli-Rep (Bhatia et al., 2006; Wang et al., 2006). Cette fonction de SUFU rappelle la fonction de Cos2 chez la drosophile, suggérant un échange de fonction de ces deux protéines au cours de l'évolution. En plus de son rôle dans la formation du Gli-Rep, il semblerait que SUFU puisse accompagner Gli-Rep dans le noyau, servant ainsi de « transporteur » (Zhang et al., 2016). Ceci semble plausible étant donné que SUFU régule négativement la voie Shh, en inhibant la transcription *via* son interaction avec la protéine SAP18, membre du complexe répresseur formé par les histones déacétylases et mSin3 (Cheng et Bishop, 2002 ; Paces-Fessy et al., 2004). Des études récentes indiquent que la fonction inhibitrice de SUFU, sur la signalisation Shh, est contrôlée par ses interactions avec différentes protéines. En effet, la protéine Rusc a été montrée comme appartenant au complexe SUFU/GLi, servant à renforcer la séquestration de Gli-FL par SUFU en absence de Shh (Jin et al., 2016). Quant à la protéine kinase Nek2A, elle phosphoryle SUFU permettant

d'inhiber sa dégradation par le protéasome, et ainsi de réguler le niveau intracellulaire de SUFU (F. E. N. Zhou et al., 2017).

En plus de SUFU, les protéines de la famille des kinésines-4, notamment Kif7 et Kif27, sont également requises pour la formation de Gli-Rep. Kif7 serait l'homologue le plus proche de Cos2. Chez le poisson zèbre (Tay et al. 2005), la perte de fonction de Kif7 avec des morpholinos induit une augmentation de la voie Hh, suggérant que Kif7 agit comme un régulateur négatif de la voie à l'instar de Cos2 chez la drosophile (Tay et al., 2005). De plus, Kif7 interagit avec Gli1, indiquant que le complexe Kif7/Gli1 est conservé dans l'évolution, et que son rôle est probablement important dans le mécanisme de transduction (Tay et al., 2005). Chez les oiseaux, les reptiles et les mammifères, deux homologues de Cos2 ont été trouvés : Kif7 et Kif27, montrant qu'une duplication de l'ancêtre commun Cos2 a sûrement eu lieu après l'émergence de la lignée des poissons (Wilson et al., 2009b). Cheung et al., 2009 ont démontré que les activités transcriptionnelles de Gli étaient inhibées en interagissant avec Kif27 pour Gli2 et Kif7/Kif27 pour Gli3. De plus, la mutation « perte de fonction » de *kif7* chez la souris augmente l'expression de Gli-FL et diminue celle de Gli-Rep, induisant un phénotype « gain de fonction » de la voie Shh (Cheung et al., 2009; Liem et al., 2009). Le mécanisme par lequel Kif7 et Kif27 régulent la formation de Gli-Rep n'est pas documenté. Cependant, comme décrit précédemment, la phosphorylation des protéines Gli par les kinases PKA, GSK3 β et CK1 α est renforcée par SUFU, des analyses génétiques semblent indiquer que SUFU et Kif7 coopèrent afin de réguler négativement la voie Shh (Law et al., 2012). Ainsi Kif7 et Kif27 pourraient agir avec SUFU comme des protéines d'échafaudages pour rapprocher les kinases de leur substrat, démontrant là aussi une probable conservation de fonction entre Cos2 et ses homologues vertébrés Kif7 et Kif27. Néanmoins, il serait intéressant de prouver l'existence d'un complexe SUFU/Kif7 (ou Kif27) /PKA/GSK3 β /CK1 α /Gli-FL pour confirmer ce modèle.

Les homologues de la kinase Fu, la protéine Sérine/thréonine kinase 36 (Stk36 : « serine-threonine protein kinase 36 ») (Wilson et al., 2009b) et la protéine ULK3 (« unc51 like kinase3 ») (Maloverjan et al., 2009) ont aussi une fonction dans la formation de la forme répressive de Gli-FL. Chez le poisson zèbre, en plus de sa fonction dans la régulation de la voie Shh, Stk36 est également impliquée dans l'assemblage de la paire centrale et l'orientation du cil (Wilson et al., 2009b ; Nozawa et al., 2013). Chez la souris, la mutation de Stk36 n'a aucun effet sur la voie Hh, mais affecte la ciliogénèse du cil, comme chez le zébrafish. De plus, Stk36 n'est pas capable de s'associer avec Kif7, mais peut s'associer avec Kif27, homologue de Cos2 seulement chez la souris. Ceci suggère que chez la souris, Stk36 et Kif27 sont impliquées dans la formation du cil, et qu'il pourrait exister une autre protéine homologue de Fu dont la fonction serait de réguler la voie Shh en association avec Kif7 comme chez le poisson zèbre. De manière intéressante, l'équipe de Maloverjan et al., 2009 a identifié l'homologue de Fu humain, ULK3. Ils ont montré, qu'en absence de Shh, ULK3 interagit avec SUFU afin d'induire la maturation de Gli-FL en Gli-Rep.

L'ensemble des données sur les protéines SUFU, Kif7 et Kif 27, STK36 et ULK3 indique que la fonction du complexe répresseur, à savoir de rapprocher le substrat Gli/Ci de ses kinases PKA/GSK3/CK1, est conservée entre la drosophile et les vertébrés, exception faite du rôle majoritaire de SUFU chez les vertébrés.

Néanmoins, une complexité est ajoutée chez les vertébrés pour la formation du Gli-Rep, puisque le cil primaire joue un rôle dans la maturation de Gli-FL en Gli-Rep à la fois *in vivo* et *in vitro* (Goetz et al., 2010). En effet, comme je l'ai dit plus haut, le cil aurait pour fonction de concentrer les différents composants de la voie Shh afin qu'ils puissent exercer leur fonction. De ce fait, les protéines Kif7, PKA, GSK3 β , CK1 α et Gli-FL se localisent dans les corps basaux ainsi que dans le cil primaire en absence de Shh (Chen et al., 2011; Fumoto et al., 2006; Liem et al., 2009; Tuson et al., 2011). L'activité de Kif7 dans la formation du Gli-rep est dépendante de la présence du cil, car des souris où le cil et Kif 7 sont en même temps absents, affichent un phénotype de type ciliaire (Liem et al., 2009). En revanche, des cellules mutantes en même temps pour le cil et SUFU montrent une activation aberrante de la voie Shh, caractéristique du mutant SUFU, indiquant que le rôle de SUFU dans la formation de Gli-Rep est indépendant du cil (Jia et al., 2009). Bien que SUFU ne puisse pas se localiser dans le cil seul, sa présence peut être observée avec Gli-FL, indiquant que Gli recrute SUFU pour le cil primaire (Humke et al., 2010; Tukachinsky et al., 2010). Ainsi, le complexe SUFU/Gli est dirigé vers le cil primaire pour permettre la maturation de Gli-FL en Gli-Rep en association avec Kif7/Kif27, ULK3/StK36 et les kinases PKA, GSK3 β et CK1 α .

3.2.3 L'activation du signal en présence d'Hh

La liaison de Shh sur Ptc induit la relocalisation de Ptc à la base du cil où il sera internalisé, permettant à Smo d'entrer dans le cil et d'activer la voie Shh (Rohatgi et al., 2007). Malgré quelques différences structurales entre Smo des vertébrés et Smo de la drosophile, le mécanisme d'activation est conservé. Chez la drosophile, les multiples phosphorylations dues aux kinases PKA, CK1 et Gprk2 entraînent un changement de conformation de la queue cytoplasmique de Smo qui va adopter une conformation ouverte, dite active, pour induire la suite du processus d'activation du signal Shh (Chen et al., 2010; Jia et al., 2004; Molnar et al., 2007; Zhao et al., 2007a). Bien que les sites de la PKA ne soient pas retrouvés dans la queue cytoplasmique de Smo chez les vertébrés, ceux de CK1 et GRK2 (« G protein coupled receptor kinase2 », homologue de Gprk2) ont été gardés au cours de l'évolution (Chen et al., 2011; Meloni et al., 2006). En plus de ces sites, le domaine Arginine, qui est responsable de l'ouverture de conformation de Smo et de l'activation de la voie Hh chez la drosophile, a également été retrouvé chez les vertébrés. De ce fait, les phosphorylations de la partie C-terminale de Smo par ces deux kinases permettent un changement de conformation de Smo, favorisant son entrée dans le cil (Chen et al., 2011), qui est permise par les protéines β -arrestin et la sous-unité motrice de la kinésine2, Kif3a (Kovacs et al., 2008; Milenkovic et al., 2009). Même si la PKA ne peut pas phosphoryler Smo, il semblerait que cette protéine exerce une action positive sur la voie Hh. En effet en culture

cellulaire, l'expression d'une forme active de la PKA permet la relocalisation dans le cil et l'activation de Smo, alors que le blocage de son activité avec des petites molécules inhibitrices, empêche l'expression des gènes cibles induites par Smo en présence de Shh (Milenkovic et al., 2009).

Une fois activée, la protéine Smo va permettre d'une part, de bloquer la protéolyse de Gli-FL en Gli-Rep, et d'autre part de promouvoir la formation du Gli-Act par un mécanisme encore inconnu actuellement. Néanmoins, l'action activatrice de Smo passe par le recrutement du complexe SUFU/Gli-FL dans le cil puis à la libération de la séquestration de Gli-FL par SUFU (Humke et al., 2010; Tukachinsky et al., 2010; Zeng et al., 2010). Ce désassemblage du complexe SUFU/Gli implique également la protéine Kif7, car celle-ci se localise dans le cil en présence de Shh (Endoh-Yamagami et al., 2009). Une fois libéré de son interaction avec SUFU, le facteur de transcription Gli-FL entre dans le noyau où il est converti en Gli-Act afin de réguler l'expression des gènes cibles de la voie Shh (Tukachinsky et al., 2010). La translocation nucléaire de Gli-FL requiert un transport rétrograde car l'élimination de la Dynéine2 par shARN empêche la localisation nucléaire de Gli-FL et par conséquent l'activation de la voie (Kim et al., 2009). Etant donné que la présence de Gli-FL dans le noyau est dépendante de son transport *via* des protéines motrices, il est logique que dans des cellules traitées avec des drogues qui déstabilisent les microtubules cytoplasmiques, Gli-FL s'accumule dans le cytoplasme (Kim et al., 2009). De manière intéressante, le modèle de la dissociation du complexe SUFU/Gli en présence de Shh vient d'être un peu bousculé par le papier de Zhang et al., 2017 qui révèle que SUFU reste associé à la protéine Gli mais transloqué avec elle dans le noyau. En effet, ils ont montré que la présence de Shh induit une accumulation de SUFU nucléaire. Cette accumulation de SUFU est dépendante de sa phosphorylation par les kinases PKA et GSK3, confirmant le rôle positif qui avait été attribué à la PKA par Milenkovic et al., 2009, et montrant encore une fois la dualité de fonction de chaque kinase de la voie Shh. De plus, par des expériences de liaison à la chromatine, ils ont prouvé l'existence des complexes SUFU/Gli1 et SUFU/Gli3 à l'ADN. Des analyses complémentaires leur ont permis d'attribuer un rôle de chaperonne à la protéine SUFU qui va en présence de Shh, transporter le Gli-Act, déjà activé dans le cytoplasme, au niveau du noyau, et faire sortir le Gli-Rep hors du noyau. Ainsi, d'après les auteurs, SUFU permettrait de faire transiter les protéines Gli-FL à travers le cil pour former les formes activatrices, Gli-Act. Ceci est différent du modèle de dissociation dans lequel l'activation des protéines Gli se fait dans le noyau. De plus, cette étude montre une divergence forte entre les vertébrés, où SUFU a une fonction majeure dans la signalisation Shh, et la drosophile, chez qui SUFU a un rôle secondaire.

Quel que soit la façon dont Gli-FL entre dans le noyau, seule ou avec SUFU, Gli doit être mûri en activateur. Comme je l'ai dit plus haut, le mécanisme de formation des formes activatrices de Gli n'est pas documenté, néanmoins il est probable que des kinases soient impliquées, car des formes phosphorylées de Gli1, Gli2 et Gli3 sont détectées dans le noyau en présence de Shh (Humke et al ; 2010 ; Maloverjan et al., 2009). Une partie de ces phosphorylations est due à ULK3. Des essais kinases *in vitro* ont montré que les protéines Gli

sont phosphorylées en présence de cette kinase ULK3, entraînant l'activation des protéines Gli (visible par des expériences de mesure d'activité transcriptionnelle), suggérant que les phosphorylations pourraient être responsables de la formation des Gli activateurs. ULK3 semble agir davantage sur Gli1 que Gli2 et Gli3, et induit notamment la translocation nucléaire de Gli1 de façon dépendante de son activité kinase (Maloverjan et al., 2009). Ainsi la phosphorylation sur Gli1 semble être activatrice. En ce qui concerne les phosphorylations sur Gli2 et Gli3, que ce soit par ULK3 ou d'autres kinases, elles pourraient plutôt entraîner leur dégradation que leur activation. En effet, SPOP (« Speckle-type POZ protein ») protéine impliquée dans la dégradation de Gli-Act, a été retrouvée dans le noyau en présence de Shh (Wang et al., 2010 ; Humke et al., 2010). De plus, il est à noter que dans le mécanisme d'activation, Gli3 joue un rôle mineur, puisque des mutants « perte de fonction » de *gli3* affichent un phénotype d'activation ectopique de la voie Shh, suggérant une fonction principalement répressive de Gli3 (Büscher et al., 1997). Cependant Gli 3 a été montré comme pouvant activer la transcription de Gli1, justifiant le fait que Gli3 puisse agir à la fois comme répresseur et activateur de la voie Shh. Néanmoins, Gli2 et Gli1 semblent être les acteurs majeurs du mécanisme d'activation. D'ailleurs, une autre modification post-traductionnelle, impliquée dans l'activation de la voie Shh, n'a été identifiée que sur Gli1 et Gli2, il s'agit de l'acétylation. Canettieri et al., en 2010 ont montré que les protéines Gli1 et Gli2 sont acétylées, et que la présence de Shh induit leur déacétylation par l'histone déacétylase 1 (HDAC1) associée à une augmentation de leur activité transcriptionnelle. Récemment, la β -arrestin1 a été identifiée comme étant responsable de l'acétylation de Gli1, acétylation qui inhibe l'activité transcriptionnelle de Gli1 (Miele et al., 2017). Tout comme Gli3, Gli 2 régule l'activité transcriptionnelle de Gli1 (Sasaki et al., 1999) et entre Gli1 et Gli2, il semblerait que Gli2 soit le principal activateur de la voie, car des souris déficientes pour le gène *gli2* affichent des défauts développementaux plus importants que des souris mutantes pour *gli1* (Ding et al., 1998; Park et al., 2000). Les différentes formes activatrices de Gli permettent la transcription des gènes cibles impliqués dans la différenciation et la prolifération cellulaire, mais également dans le renouvellement des cellules souches. Tous ces processus biologiques sont notamment importants pour l'homéostasie et la réparation tissulaire (chapitre 1). De plus, Gli-Act peut aussi induire l'expression de régulateurs négatifs comme *ptch* afin de contrôler l'activation de la voie Shh (Fig. 33, à droite).

Durant ce chapitre, j'ai décrit la voie canonique de Shh en m'efforçant de montrer la conservation du mécanisme de transduction au cours de l'évolution, entre la drosophile et les vertébrés. Même si chez les vertébrés, le signal Shh implique plus de protéines, la fonction de chacune des protéines est similaire à celle de son homologue chez la drosophile (Tableau 1).

Gène chez la Drosophile	Gène chez les vertébrés	Fonction	Conservé	Type de protéine
<i>hh</i>	<i>shh, ihh, dhh</i>	Ligand	Oui	Morphogène
<i>ptc</i>	<i>ptch1, ptch2</i>	Récepteur du signal Hh, inhibiteur de Smo	Oui	Récepteur à 12 domaines transmembranaires
<i>smo</i>	<i>smo</i>	Transduction du signal: changement de conformation permettant son activation	Oui	Récepteur à 7 domaines transmembranaires de la famille des GPCRs
<i>ihog, boi</i>	<i>cdo, boc</i>	Co-réception du signal	Oui	Protéines transmembranaires avec des domaines immunoglobulines et fibronectines de type III
	<i>gas1</i>	Co-réception du signal	Non	Glycoprotéine à ancre GPI
	<i>hip</i>	Diffusion Hh	Non	Glycoprotéine membranaire de type I
<i>costal2</i>	<i>Kif7, kif27</i>	Transduction du signal: protéine d'échafaudage en absence et présence de d'Hh/Shh	Oui	Kinésine
<i>fu</i>	<i>Stk36, ulk3</i>	Transduction du signal: protéine d'échafaudage en absence d'Hh/Shh et participe à l'activation probablement par son activité kinases en présence d'Hh/Shh	Oui, mais des études sont nécessaires afin de valider cette conservation	Kinases de type Sérine-thréonine
<i>pka, ck1, gsk3β</i>	<i>pka, ck1, gsk3β</i>	Transduction du signal: formation du répresseur par phosphorylation, activation de Smo par phosphorylation (ck1 et gsk3β)	Oui (ck1 et gsk3β) Oui, pour la répression et non pour l'activation de Smo (pka)	Kinases de type Sérine-thréonine
<i>gprk2</i>	<i>grk2</i>	Transduction du signal: hyper-activation de Smo par phosphorylation	Oui	Kinase de type Sérine-thréonine
<i>sufu</i>	<i>sufu</i>	Transduction du signal: Stabilisation des facteurs de transcription, protéine chaperonne chez les vertébrés	Oui, mais rôle beaucoup plus important chez les vertébrés que chez la drosophile	
<i>ci</i>	<i>gli1, gli2, gli3</i>	Transduction du signal: répresseur s ou activateur s de la voie	Oui	Facteurs de transcription
<i>slimb</i>	<i>B-trcp</i>	Transduction du signal: formation du répresseur par ubiquitination	Oui	Protéine adaptatrice appartenant au complexe ubiquitine ligase E3 de type SCF
<i>hib</i>	<i>spop</i>	Transduction du signal: dégradation de l'activateur par ubiquitination	Oui	Protéine adaptatrice appartenant au complexe ubiquitine ligase E3 de type CBC

Tableau 1 : Tableau comparatif des protéines de la voie Hh/Shh chez la drosophile et chez les vertébrés

3.3 Les voies non canoniques de Shh

En plus de la voie canonique, le signal Shh peut entraîner l'activation de ces gènes cibles et ainsi exercer son rôle de morphogène par un autre mode de transmission du signal, la voie non canonique. Contrairement à la voie canonique, dont le mécanisme de régulation est dépendant des facteurs de transcription Gli, la voie non canonique permet une réponse génique indépendamment de l'activité des protéines Gli. La voie non canonique de Shh a été classée en deux groupes : le type I, qui implique la fonction de la protéine Ptch non liée à son effet inhibiteur sur Smo, et le type II qui requiert l'activité de Smo (Fig. 34).

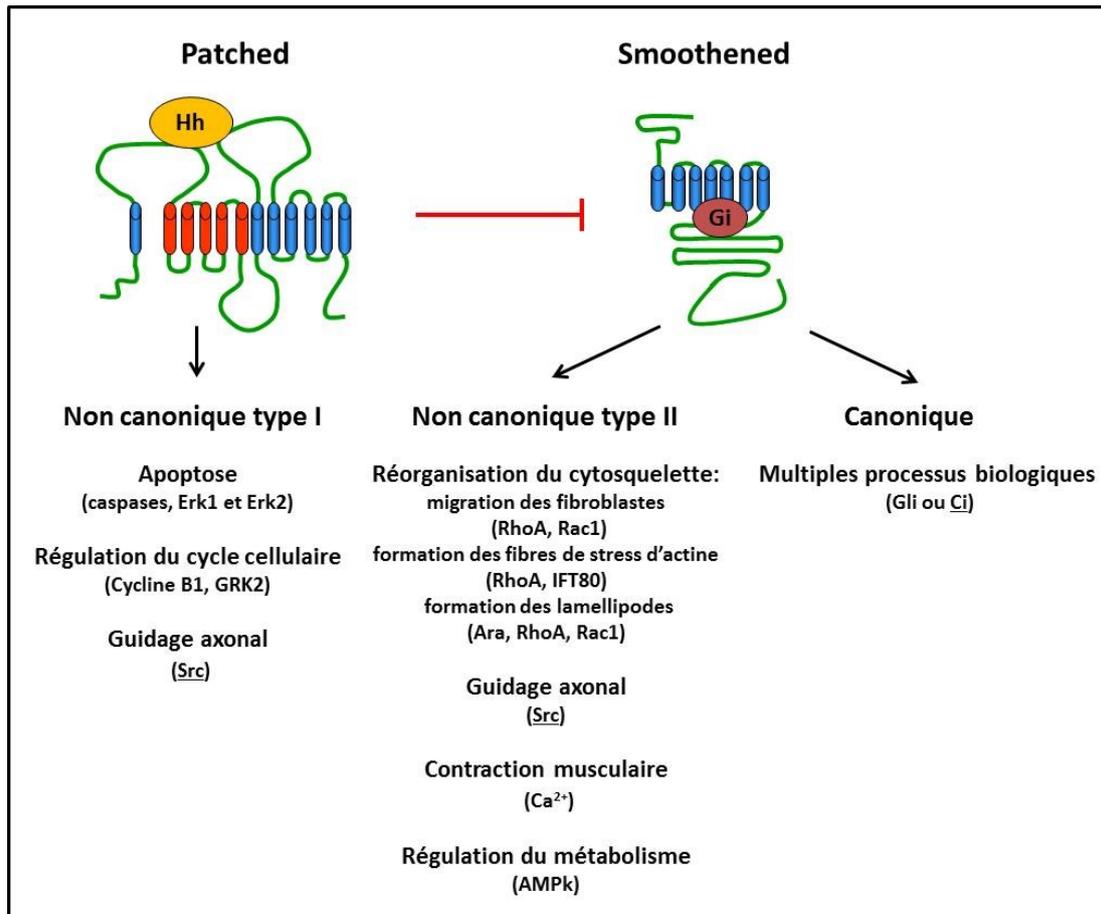


Fig. 34 : Les voies canoniques et non canoniques de Shh/Hh.

La voie non canonique de type I requiert la liaison d'Hh à son récepteur Ptc, qui va permettre une nouvelle fonction de Ptc non associée à son inhibition de Smo. Les processus de l'apoptose, de la régulation du cycle cellulaire, mais aussi le guidage axonal sont contrôlés par la voie non canonique Shh/Hh de type I. Le type II est dépendant de Smo, et régule des mécanismes biologiques comme la réorganisation du cytosquelette, le guidage axonal, la contraction musculaire et le métabolisme. Il est à noter que le guidage axonal a été montré comme pouvant être régulé à la fois par une voie non canonique de type I mais aussi de type II (Li et al., 2010; Yam et al., 2009). La voie canonique contribue aux fonctionnements de nombreux processus biologiques *via* l'activation des facteurs de transcription Glis chez les vertébrés et Ci chez la drosophile. Les termes surlignés correspondent aux mécanismes connus chez la drosophile.

3.3.1 La voie non canonique de type I : voie dépendante de Ptch

La voie non canonique de type I a été impliquée dans deux processus cellulaires : l'apoptose et la régulation de la cycline B1 dans le cycle cellulaire (Fig. 34).

3.3.1.1 L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée nécessaire au cours du développement normal d'un individu comme pour la formation des membres, dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et également dans la suppression des tumeurs. Le signal Shh contrôle l'apoptose soit en augmentant l'expression de gènes codant pour des protéines « anti-apoptotique » à l'instar de bcl-2 (Cayuso et al., 2006; Katoh et Katoh, 2009) soit en activant la kinase Akt (Riobó et al., 2006).

De nombreuses publications ont montré que Ptch agit comme un facteur pro-apoptotique indépendamment de la voie canonique de Shh. En effet, l'induction de l'apoptose par Ptch dans des cellules n'est pas empêchée par l'addition de Smo, suggérant que l'action de Ptch est indépendante de Smo (Thibert et al., 2003). Le rôle de Ptch dans ce processus passe par sa fonction de récepteur dit « à dépendance ». Par définition, un récepteur à dépendance est capable d'induire deux signaux opposés en fonction de l'absence ou de la présence de son ligand. En absence de ce dernier, le récepteur à dépendance propage un message pro-apoptotique alors qu'en présence du ligand, un signal permettant de la prolifération, survie ou migration cellulaire est véhiculé (Delcros et Mehlen, 2013). En 2003, Thibert et al., ont révélé que les caspases 3, 7 et 8 pouvaient se lier à la région C-terminale de Ptch, entraînant le clivage de cette partie qui est essentielle à l'activité pro-apoptotique de Ptch. Cette forme tronquée de Ptc ou une forme soluble du domaine C-terminal (CTD) de Ptc est capable d'induire l'apoptose dans des cellules *in vitro* (Thibert et al., 2003). Il a été proposé que le CTD entre dans le noyau afin de médier l'activation de facteurs pro-apoptotiques en régulant la voie ERK (Chang et al., 2010; Kagawa et al., 2011), mais des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce mécanisme.

Il existe une divergence dans la fonction de du CTD de Ptc entre la drosophile et les vertébrés. En effet, le CTD est indispensable pour la répression de la voie Hh chez la drosophile (Johnson et al., 2000), alors que des études génétiques chez la souris ont démontré que le CTD servait plus dans la voie non canonique de Shh notamment *via* son rôle sur l'induction de l'apoptose et la prolifération cellulaire (Makino et al., 2001; Mille et al., 2009; Nieuwenhuis et al., 2007; Sweet et al., 1996). Ce processus de prolifération cellulaire implique la régulation du cycle cellulaire, et plus particulièrement l'action de la cycline B1 que je vais maintenant décrire.

3.3.1.2 La régulation de la cycline B1 dans le cycle cellulaire

Les cellules d'un individu ne sont pas éternelles, elles peuvent mourir naturellement ou suite à des dégâts subis, comme je l'ai mentionné dans la partie sur l'homéostasie et la réparation tissulaire. Le cycle cellulaire participe à ce processus et la progression dans le

cycle cellulaire est permise par l'action conjointe de cyclines et de leurs partenaires, les kinases cycline-dépendantes (CDK). La régulation de l'expression, de la phosphorylation, de la localisation sub-cellulaire ainsi que des interactions entre ces complexes et d'autres protéines influencent l'activité de ces complexes et donc la progression ou non dans le cycle cellulaire.

La transition de la phase G2/M implique la translocation nucléaire du complexe cycline B1/Cdk1 (aussi appelé « MPF : M-Phase promoting factor ») dans lequel la cycline B1 forme la sous-unité régulatrice et Cdk1 la sous-unité catalytique (Takizawa et Morgan, 2000). La phosphorylation de la cycline B1 permet l'entrée du MPF dans le noyau et induit la mitose (Jenkins, 2009). De manière intéressante, la voie non canonique de Shh a été impliquée dans ce processus, notamment en jouant sur le niveau de cycline B1 (Barnes et al., 2001). Des analyses biochimiques ont montré que Ptch interagit uniquement avec la forme phosphorylée de la cycline B1 par ses boucles intra-cellulaires entre le domaine transmembranaires 6 et 7. Par cette interaction, Ptch bloque l'entrée en mitose, en provoquant la sortie du noyau du MPF et la présence de Shh conduit à la rupture de l'interaction entre Ptch et le MPF, permettant à ce dernier de transloquer dans le noyau et d'amorcer la phase de mitose. Une étude menée chez le zébrafish par Jiang et al., en 2009 a apporté un nouveau joueur, la protéine GRK2, dans la régulation du MPF par Ptch. En effet, la présence de Shh induit l'accumulation de GRK2 qui est corrélée à une diminution du complexe Ptch/MPF. Cette réduction de l'interaction Ptch/MPF est abolie dans des cellules dépourvues de GRK2, démontrant la fonction de GRK2 dans la dissociation du complexe Ptch/MPF. Les auteurs ont proposé un mécanisme dans lequel Shh serait responsable d'un changement de conformation de Ptch favorisant son interaction avec GRK2, laquelle entraîne la séparation du MPF du nouveau complexe récemment formé GRK2/Ptch. Le MPF peut alors transloquer dans le noyau pour exercer sa fonction.

Ces publications révèlent la fonction non canonique de Ptch dans la régulation du cycle cellulaire *via* son action sur la localisation sub-cellulaire de la cycline B1. Récemment, une étude a montré que la mutation de Ptch, identifiée dans le syndrome nevoid du carcinome basocellulaire, entraîne une dérégulation de sa fonction sur le complexe MPF, favorisant ainsi la prolifération cellulaire qui est caractéristique de cette maladie (Yu et al., 2014). Une meilleure connaissance de cette voie non canonique de type 1, notamment sur les mécanismes de croissance et survie cellulaire, pourrait apporter de nouvelles cibles thérapeutiques.

3.3.2 La voie non canonique de type II : voie dépendante de Smo

Les processus biologiques régulés par la voie non canonique de type II sont plus nombreux que ceux contrôlés par la voie non canonique de type I. En effet, parmi ces processus on trouve la contraction musculaire, la régulation du métabolisme, l'organisation du cytosquelette, la migration des fibroblastes et le guidage des axones. Dans ce chapitre, j'ai choisi d'arbitrairement de m'intéresser à deux mécanismes : la réorganisation du cytosquelette et le contrôle du métabolisme (Fig. 34).

3.3.2.1 La réorganisation du cytosquelette par les petites protéines G : GTPases.

La ressemblance structurale entre Smo et les GPCRs, et le fait que les GPCGs activent des GTPases, protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette (Ridley, 2006), laisse penser que Smo pourrait intervenir dans ce processus en agissant sur les GTPases. La réorganisation du cytosquelette est permise par la famille Rho qui se divise en trois sous-familles : Rho, Cdc42 et Rac. Ces sous-familles de protéines interviennent dans la polymérisation de l'actine, permettant ainsi le réarrangement de cytosquelette qui est nécessaire aux mouvements des cellules, à l'instar de la migration des fibroblastes.

D'ailleurs, une étude a montré que Shh stimule la migration des fibroblastes en activant les petites GTPases de la famille RhoGTPase : RhoA et Rac (Polizio et al., 2011). Le pré-traitement de ces cellules avec un antagoniste de Smo, KAAD cyclopamine, bloque la migration de ces cellules en réponse à Shh ou à son agoniste. Ces résultats indiquent que la migration des fibroblastes par la voie Shh est un processus dépendant de Smo. Des expériences complémentaires leur ont permis de montrer que Smo induit la migration des fibroblastes en régulant positivement l'axe Gi (protéine G hétérotrimérique) /Pi3K/Akt qui contrôle l'activation des protéines RhoA et Rac1. Pour s'assurer que l'activation de RhoA et Rac1 est indépendante de l'activité transcriptionnelle des Gli, les auteurs ont inhibé leurs transcriptions en exprimant une forme répressive de Gli3, Gli3R. Cette forme entre en compétition avec les Gli endogènes pour la liaison de leurs régions promotrices sur leurs gènes cibles, agissant comme un fort répresseur de la transcription. L'expression de Gli3R ne perturbe ni l'activation des protéines de la famille Rho ni la migration des fibroblastes induites par l'agoniste de Smo. Ce résultat indique que Smo contrôle la migration des fibroblastes indépendamment de la transcription des Gli, confirmant que ce processus est régulé par la voie non canonique de type II.

Une autre étude a révélé que la protéine IFT80 (protéine de transport intraflagellaire 80) est capable de contrôler le choix entre la voie canonique ou la voie non canonique de type II de Shh dans la différenciation des ostéoblastes (Yuan et al., 2016). La découverte IFT80 ouvre de nouvelles perspectives permettant de découpler ces mécanismes.

3.3.2.2 La régulation du métabolisme

Le maintien d'un état stable que ce soit à l'échelle d'un organisme entier ou bien au niveau d'une cellule, nécessite des milliers de réactions chimiques qui sont souvent reliées entre elles par des voies de signalisations. Ce métabolisme cellulaire contrôle finement l'équilibre énergétique qui peut être affecté lors de stress environnementaux. Afin de répondre à ces changements, la cellule exprime une protéine qualifiée de senseur métabolique, l'AMPk (« AMP-activated protein kinase ») (Hardie et al., 2012). La perturbation de la balance énergétique, caractérisée par une diminution de l'ATP, induit l'activation de l'AMPk. Cette protéine agit en favorisant d'une part la production d'ATP grâce à l'augmentation de l'activité et de l'expression de protéines impliquées dans le catabolisme et d'autre part en inhibant l'anabolisme qui est consommateur d'ATP.

De manière intéressante, une étude récente a révélé que la voie non canonique de type II de Shh induit un métabolisme anaérobie au détriment du métabolisme aérobie dans les muscles et les tissus adipeux bruns *via* son action sur l'AMPk (Teperino et al., 2012). Cette transition du métabolisme est perdue dans des cellules où Smo est absent mais toujours présente dans les mutants Gli, indiquant que ce phénomène est dépendant de Smo mais pas de Gli. De manière intéressante, la régulation du métabolisme par cette voie non canonique Smo/AMPk est dépendante de la présence du cil. En effet, des cellules mutantes pour les protéines IFT88 et Kif3a, protéines impliquées dans la ciliogénèse, n'arrivent plus à activer la voie non canonique en réponse à la présence d'un agoniste de Smo, SAG. Par des analyses d'immunoprécipitation et l'utilisation de mutants Smo incapables de se localiser dans le cil, ils ont établi que la voie non canonique de Smo *via* l'AMPk se déroule au niveau de la base du cil. En conclusion, le cil reste une structure essentielle pour que l'axe Smo/AMPk de la voie non canonique soit fonctionnel, comme pour la voie canonique.

Dans l'ensemble de ce chapitre consacré aux vertébrés, j'ai décrit la voie canonique de Shh, qui ressemble à la voie Hh chez la drosophile, et les voies non canoniques de Shh de type I et type II. Une question vient à l'esprit, existe-t-il des voies non canoniques d'Hh chez la drosophile ? La réponse à cette question est oui. Chez la drosophile, le signal Hh peut être aussi transmis indépendamment du facteur de transcription Ci. Une étude de Suzuki et Saigo en 2000 a montré que le développement de l'organe de Bolwig, organe photorécepteur dans le cerveau de la larve, est dépendant de la voie non canonique d'Hh. Hh induit l'expression d'*atonal* (*ato*) ainsi que la formation de l'organe de Bolwig, et cet effet passe par les protéines Ptc et Smo. En effet, l'expression d'*ato* est augmentée dans des mutants pour *ptc*, et à l'inverse, des clones mutants pour *smo* affichent une diminution de l'expression d'*ato*. Grâce à des analyses de génétiques, les auteurs ont montré que la perte de Ci ou Fu n'affecte pas l'expression d'*ato*, et que l'expression d'une forme constitutivement activée de Ci n'est pas capable de restaurer le phénotype mutant d'Hh. L'ensemble de leur résultat suggère, d'une part que la formation de l'organe de Bowlig nécessite la voie non canonique d'Hh, et d'autre part que cette voie est probablement l'équivalent d'un type II puisque Smo est crucial pour ce mécanisme.

Une autre publication récente implique de nouveau la voie non canonique d'Hh dans le processus de guidage axonal chez la drosophile (Ricolo et al., 2015). Dans leur étude, les auteurs ont montré qu'Hh, Ptc et Smo s'expriment dans le système nerveux central durant l'embryogénèse. Hh est nécessaire pour orienter les axones, car des mutants nuls pour *hh* ont des défauts morphologiques des axones dans le système nerveux central. L'activation de la voie canonique d'Hh par l'expression d'une forme active de Ci n'induit pas de phénotype axonal, indiquant que la fonction d'Hh passe probablement par une voie non canonique. Des expériences génétiques leur ont permis de montrer qu'Hh et Ptc agissent *via* Netrin/Frazzled pour guider les axones. De manière intéressante, chez les vertébrés, le guidage des axones est permis par une voie Shh non canonique de type II dépendante des protéines src (Yam et al., 2009). Les auteurs ont montré que, chez la drosophile, la protéine src42A est impliquée dans la croissance orientée des axones. En effet, cette protéine est exprimée dans le

système nerveux central et son absence dans des embryons où Hh est surexprimé réduit les défauts de morphogénèse, dus à l'activation aberrante de la voie non canonique d'Hh. Ainsi cette publication révèle un rôle d'Hh dans le guidage axonal *via* une voie non canonique dont le type n'a pas été défini, qui fait intervenir les protéines Netrin/Frazzled et Src42A (Fig 34).

Le fait que le signal Hh chez la drosophile puisse être également transmis *via* des voies non canoniques comme chez les vertébrés, renforce la légitimité de ce modèle animal dans l'exploration du fonctionnement normal mais aussi anormal de la voie Hh, qui est responsable du développement de nombreux cancers. D'un point de vue de la recherche fondamentale, les voies non canoniques d'Hh ouvrent un vaste champ exploratoire dans le signal Hh, puisque très peu de choses sont connues sur ces voies chez la drosophile, comme le montre la figure 34. Cette nouvelle perspective rend la voie de signalisation Hh plus complexe mais également plus fascinante qu'elle ne l'est déjà.

Résultats

Durant l'introduction, j'ai montré que la voie de signalisation Hh est impliquée dans de nombreux processus au cours du développement embryonnaire et tout au long de la vie d'un individu. Au laboratoire, nous sommes intéressés par différents aspects du signal Hh. Nous tentons de comprendre, d'une part, comment la protéine Hh est sécrétée par les cellules productrices, puis par quels moyens elle est transportée à travers la matrice extracellulaire afin d'atteindre les cellules réceptrices. D'autre part, nous essayons de savoir de quelle façon le mécanisme de transduction permet aux cellules d'induire la ou les réponses cellulaires adaptées à la quantité d'Hh perçue. Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur le deuxième axe de recherche qui est développé au laboratoire : la transduction du signal Hh. Ce mécanisme nécessite de multiples interactions entre les protéines du complexe de transduction, également nommé à juste titre le complexe de signalisation. Que ce soit en absence ou en présence d'Hh, ce complexe est constitué en majorité des mêmes protéines, suggérant que ces protéines ont un double rôle afin de permettre la régulation de Ci en répresseur ou activateur de la transcription. Une des questions qui vient à l'esprit est par quels mécanismes un complexe composé des mêmes constituants peut-il être répresseur en absence d'Hh ou activateur en présence d'Hh ? C'est la question à laquelle j'ai voulu répondre pendant mon doctorat. Mon travail a consisté à étudier l'effet d'Hh sur la formation d'un complexe activateur, et cette thématique sera divisée en deux chapitres :

Chapitre 1 : Etude du mécanisme d'activation de la kinase Fu dans la voie de signalisation Hh.

Chapitre 2 : Rôle des protéines Fu, PKA et Smo dans la formation d'un complexe répresseur ou un complexe activateur selon le signal Hh.

Avant de présenter les résultats obtenus pendant mon doctorat, j'ai choisi de décrire plus en détail l'expression des protéines impliquées dans la transduction du signal Hh dans le disque imaginal de l'aile chez la larve de *Drosophile*, modèle du laboratoire (Fig. 35 et Fig. 36)

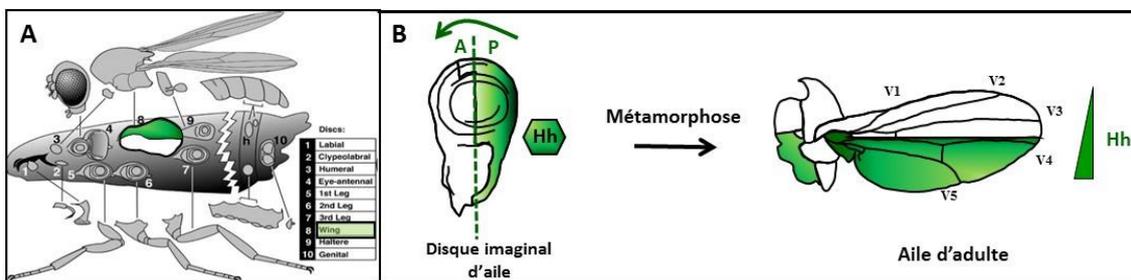


Fig. 35 : Le disque imaginal de l'aile de *Drosophile* : modèle d'étude du laboratoire

A) Représentation schématique des disques imaginaires chez la larve et des organes qui en résultent chez la drosophile adulte.

B) Schéma d'un disque imaginal de l'aile et de l'aile adulte correspondante obtenue après la métamorphose. L'expression graduée d'Hh dans ces deux structures est colorée en vert.

Comme je l'ai déjà évoqué durant l'introduction, dans le compartiment postérieur du disque se trouve les cellules productrices à partir desquelles la protéine Hh est maturée puis sécrétée. Une fois produite, Hh traverse la matrice extracellulaire et diffuse sous forme graduée au niveau du compartiment antérieur du disque où sont localisées les cellules réceptrices du signal Hh (Fig. 36a-a').

La première étape du mécanisme de transduction de la voie Hh consiste à la fixation d'Hh sur son récepteur Ptc, qui est également un gène cible activé à hauts niveaux d'Hh. La protéine Ptc est exprimée dans tout le compartiment antérieur avec une sur-expression dans 4 à 5 rangées de cellules proches de la bordure A/P, où les cellules reçoivent une forte concentration d'Hh (Fig. 36b-b') (Phillips et al. 1990). L'analyse de l'immuno-marquage pour Ptc dans le compartiment postérieur montre que Ptc est absent de ce compartiment.

Sous l'effet d'Hh, Smo est activée et son expression varie au sein du disque imaginal de l'aile. Dans le compartiment postérieur, la protéine Smo est présente à de hauts niveaux et de façon homogène, alors que dans le compartiment antérieur, Smo s'exprime fortement dans 3 à 4 rangées de cellules proches de la frontière A/P, puis son expression décroît graduellement et rapidement dans les cellules s'éloignant de l'A/P. Le manque de Ptc dans le compartiment postérieur a pour conséquence la stabilisation de Smo, ce qui réunit toutes les conditions pour une activation de la voie Hh qui n'aboutit jamais en raison de l'absence de Ci. Ainsi le compartiment postérieur constitue un bon outil pour étudier la transduction du signal Hh tout en s'affranchissant des boucles de rétro-contrôles positives ou négatives causées par l'expression des gènes cibles de la voie. Nous avons d'ailleurs utilisé cette propriété dans le chapitre 1 des résultats pour analyser l'effet d'un mutant de Smo. Pour comprendre l'expression particulière de Smo dans le compartiment antérieur, il faut s'intéresser au morphogène Hh. Ce dernier est présent à de fortes concentrations à l'A/P permettant la réception et traduction du signal dans ces cellules *via* la protéine Smo. Plus on s'éloigne de l'A/P, plus le niveau d'Hh diminue graduellement, et cette diminution est corrélée à la déstabilisation de Smo, expliquant par la perte d'immuno-marquage de la protéine Smo (Fig. 36c').

Dans les cellules réceptrices du signal, le gradient d'Hh induit l'activation différentielle de Smo, qui nécessite la fonction de la protéine Gprk2. Cette protéine est impliquée dans la transmission des hauts niveaux d'Hh, ce qui explique l'augmentation de sa présence proche de l'A/P, visible sur le schéma et l'immuno-marquage (Fig. 36d-d'). De plus, l'expression homogène de Gprk2 dans le disque suggère un rôle de cette protéine à de plus faibles doses d'Hh ou même en absence d'Hh, rôle qui sera abordé dans le premier chapitre des résultats.

En fonction du signal Hh, Smo adopte des conformations plus ou moins actives qui vont permettre de transmettre l'information différentielle au complexe de transduction dans lequel se trouvent les protéines Fu, Cos2 et Ci. Les profils d'expressions de Fu (Fig. 36e-e') et Cos2 (Fig. 36f-f') sont très similaires, avec un niveau plus élevé dans le compartiment antérieur. La kinase Fu est activée en présence d'Hh, et reçoit l'information différentielle du signal grâce à Smo. Ceci est visible au niveau de Cos2, puisque Fu phosphoryle Cos2 sur la

sérine 572 pour de faibles doses d'Hh et la sérine 931 quand les cellules perçoivent de fortes concentrations d'Hh (Ranieri et al. 2012). L'analyse de l'expression des deux états phosphorylés de Cos2, grâce à des anticorps phospho-spécifiques, révèle que la forme p572-Cos2 (Fig. 36g-g') s'étend plus loin dans l'antérieur que la forme p931-Cos2 (Fig. 36h-h'), dont l'expression est restreinte à quelques rangées de cellules concentrées proches de l'A/P. Ceci est logique, puisque les cellules recevant des hauts niveaux d'Hh se trouvent à proximité de la frontière entre les deux compartiments alors que les cellules percevant des doses intermédiaires d'Hh sont situées plus loin dans l'antérieur. De plus, nous pouvons remarquer que Cos2 est phosphorylé sur ses deux sérines dans le compartiment postérieur, puisque la voie Hh est constitutivement activée dans ce compartiment.

De façon intéressante, l'expression des différents états phosphorylés de Cos2 dans l'antérieur peut être superposée à l'expression des différentes isoformes de Ci (Fig. 36i-i'). Le patron d'expression caractéristique de la protéine Ci est visualisé à l'aide de l'anticorps 2A1 qui reconnaît la partie C-terminale de Ci (Motzny et Holmgren, 1995). Ci-Act s'exprime dans 2 à 3 rangées de cellules proches de la frontière A/P, qui reçoivent la quantité maximale d'Hh, et de ce fait dans lesquelles la kinésine Cos2 est phosphorylée sur la sérine 931. L'anticorps 2A1 n'est pas capable de reconnaître le Ci-Act (se référer à la section 2.2.4.1). Dans les cellules localisées juste après celles exprimant le Ci-Act, l'anticorps 2A1 permet de visualiser la forme entière de Ci (Ci-155) (Fig. 36i'), dont le marquage se superpose à celui de p572-Cos2 (Fig. 36g'). Loin dans l'antérieur, le morphogène Hh ne diffuse pas, ce qui explique l'absence d'immuno-marquage caractéristique de la présence du Ci-Rep. En effet, l'anticorps 2A1 ne reconnaît pas le Ci-Rep qui ne possède pas de région C-terminale, domaine ciblé par l'anticorps.

En fonction des niveaux d'Hh perçus, les cellules vont exprimer des quantités relatives des différentes formes de Ci ce qui va aboutir à l'activation différentielle des gènes cibles de la voie. Ainsi, pour de hautes concentrations d'Hh, Ci induit l'expression des gènes *en* (Fig. 36j-j') et *ptc* (Fig. 36b-b') alors que pour des doses intermédiaires, le gène *collier* est activé (montré ici). Enfin, à faible niveaux d'Hh, ce sont les gènes *iroquois* (non représenté ici) et *dpp* (Fig. 36k-k') qui sont activés par Ci. L'analyse de l'expression d'En confirme que le gène codant pour cette protéine est caractéristique des hauts niveaux d'Hh car En s'exprime dans les cellules situées proche de l'A/P, là où la quantité d'Hh est élevée. Nous pouvons également visualiser la présence de la protéine En dans le postérieur (Fig. 36j-j'). Dans ce compartiment, le gène *en* n'est pas régulé par le signal Hh mais par les gènes pair-rule et participe au processus de segmentation de l'embryon (chapitre 1 de l'introduction, Ken Howard et Philip Ingham. 1986, Sanson et al. 2001). Quant à Dpp, cette protéine s'exprime dans les cellules percevant des niveaux intermédiaires à faibles d'Hh, validant ainsi que *dpp* est bien un gène activé à des doses faible d'Hh. Il est à noter que dans les cellules proches de l'A/P, l'absence d'immuno-marquage de Dpp (Fig. 36k') est causée par la protéine En, qui de par sa fonction de facteur de transcription, inhibe l'expression du gène *dpp* dans cette zone (Sanicola et al., 2015). En revanche, l'absence d'expression de Dpp loin dans l'antérieur est due au Ci-Rep dont *dpp* est un gène cible.

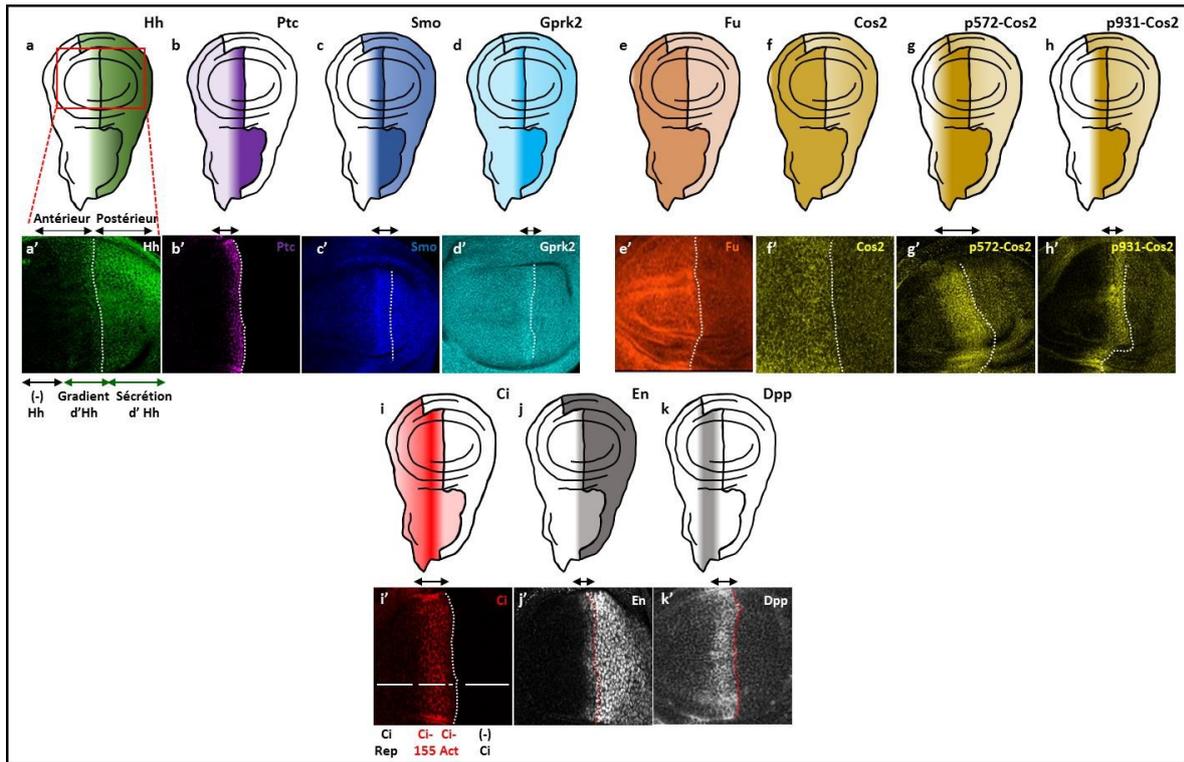


Fig. 36 : Les profils d'expression des protéines impliquées dans la transduction du signal Hh
 Représentations schématiques (a-k) et immuno-marquages associés (a'-k') des protéines participant au mécanisme de transduction de la voie Hh dans le disque imaginal de l'aile. La protéine Hh (a-a') est sécrétée dans l'antérieur sous forme d'un gradient, inhibe Ptc (b-b') ce qui a pour conséquence la stabilisation et l'activation différentielle de Smo (c-c'), notamment grâce à l'action de Gprk2 (d-d'). Smo et Gprk2 permettent l'activation de Fu (e-e'), qui phosphorylent Cos2 (f-f') sur la sérine 572 à de faibles niveaux d'Hh (g-g') et sur la sérine 931 pour de hautes doses d'Hh (h-h'). La transduction du signal aboutit à la stabilisation et l'activation de Ci (i-i') qui induit l'expression des gènes cibles de la voie comme *en* (j-j') et *dpp* (k-k') en fonction du signal d'Hh perçu par les cellules. En absence d'Hh, loin dans l'antérieur, les gènes cibles sont réprimés par Ci-Rep. Il est à noter que *ptc* et *gprk2* sont également des gènes cibles de la voie Hh. *Les immuno-marquages de Gprk2 en d' et Dpp en k' proviennent respectivement des publications de Cheng et al., 2010 et Akiyama et Gibson, 2015.*

L'étude de l'expression différentielle des protéines de la voie Hh dans des conditions sauvages (Fig.35) et mutantes chez la *Drosophila*, m'a permis de déchiffrer le mécanisme de transduction du signal Hh durant mon doctorat.

Chapitre 1 : L'étude du mécanisme d'activation de la kinase Fu dans la voie de signalisation Hh

La première étape du mécanisme d'activation de la voie Hh est la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo (Ranieri et al. 2014). Smo est alors phosphorylé par les protéines PKA et CK1 afin d'aboutir à un premier état d'activation du complexe de transduction, visualisable par la phosphorylation du résidu 572 de Cos2 par la kinase Fu. Les phosphorylations successives de Smo par les kinases Gprk2 (Chen et al. 2010), Gish (Li et al. 2016), PKC (Jiang et al. 2014) et Fu (Sanial et al. 2017) permettent l'hyper-activation de Smo et ainsi du complexe, caractérisée par la phosphorylation de la sérine 931 de Cos2 par Fu. A ce jour, le procédé par lequel la kinase Fu est activée de façon adaptée aux différentes doses d'Hh perçues n'est pas entièrement compris. En 2004, Ascano et Robbins ont publié un modèle innovant selon lequel en absence d'Hh, Fu est dans une conformation fermée, dite « inactive », due à l'interaction entre ses domaines régulateur et catalytique. La présence d'Hh pourrait entraîner une ouverture de sa conformation par autophosphorylation.

En 2007, Malpel et al. ont publié une étude dans laquelle les auteurs ont montré que les acides aminés de la position 985 à la position 1036 de la queue cytoplasmique de Smo sont suffisants pour interagir avec Fu. Au laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que l'activation différentielle de la kinase Fu pourrait être due à des changements de sa conformation, causés par son interaction avec les 52 derniers acides aminés de Smo et par l'action de Gprk2.

Dans l'article suivant, qui sera soumis prochainement, nous avons montré que Gprk2 joue un rôle essentiel dans l'activation différentielle de la kinase Fu en fonction des niveaux d'Hh reçues par les cellules. En effet, de façon surprenante, nous avons observé une présence constitutive de Gprk2 au sein du complexe de transduction. Pour de fortes doses d'Hh, nous avons visualisé une interaction directe entre les 52 derniers acides aminés de Smo et Fu qui est dépendante de Gprk2. Enfin, grâce à la technique de BiFC associée des expériences de co-immunoprécipitations, nous avons pu démontrer que le signal Hh induit des changements de conformation entre les protéines Gprk2/Smo/Fu qui permettent de rapprocher le domaine catalytique de Fu de ses substrats.

L'ensemble des résultats présenté dans ce papier, nous a permis de proposer un modèle dans lequel l'activation différentielle de Fu est permise par des remaniements intramoléculaires de sa structure, dépendants de Smo et Gprk2. Selon la quantité de morphogène Hh et l'action de Gprk2, Smo adopte des conformations plus ou moins actives, qui sont transmises au complexe de transduction et ainsi à Fu afin de permettre l'activation différentielle des gènes cibles de la voie Hh.

Protein Conformational changes in the Hedgehog signaling pathway mediate differential signaling strength

Cécile Giordano*, Laurent Ruel*¹ and Pascal Thérond¹

Institut de Biologie de Valrose (iBV); Université de Nice-Sophia Antipolis ; UMR7277 CNRS;
INSERM 1091, Centre de Biochimie; Parc Valrose ; 06108 Nice cedex2, France

* These authors contributed equally to this manuscript

¹ Corresponding authors: therond@unice.fr, ruel@unice.fr, +33492076443

Keywords: Hedgehog, Smoothened, Gprk2, Fused, differential phosphorylation

Summary

Hedgehog (Hh) is a conserved morphogen that controls cell differentiation and patterning in metazoans. The mechanism by which the extracellular morphogen gradient is translated into differential gene responses is still not well understood. In *Drosophila*, the Hh signal is transduced from the G-Protein Coupled Receptor Smoothened (Smo) to the cytoplasmic Hh Signaling Complex (HSC). In this study, we show that the Gprk2 kinase is constitutively present within the HSC and is necessary to transmit high level signaling from Smo to the Fused (Fu) kinase, a member of the HSC. We show that the last 52 amino-acids of the cytoplasmic tail of Smo, in combination with Gprk2, bind to the regulatory domain of Fu and highly activate its kinase activity. We further show that this binding induces Fu conformational changes and increases the proximity of the Fu catalytic domain to its substrate, the Costal2 kinesin. We propose a new model in which, depending on the magnitude of Hh signaling, Smo and Gprk2 modulate protein conformational changes in the HSC, which are responsible for the differential activation of the pathway.

Introduction

The Hedgehog (Hh) secreted protein family is conserved through evolution and is involved in numerous biological processes during development and adult life, including tissue organization, cell proliferation and stem cell homeostasis in metazoans (Briscoe and Thérond, 2013). In drosophila, Hh is necessary for embryonic and imaginal disc patterning (Ingham PW, 2016). The Hh signaling pathway in humans has been implicated in the genesis of several types of cancer (Scales and Sauvage, 2009) and genetic syndromes (Athar et al., 2014). Therefore, elucidating the mechanisms involved in Hh signal transduction is of interest not only for developmental biologists but also for oncologists.

The Hh receptor Patched (Ptc), is a transmembrane protein that constitutively represses Hh signaling (Hooper and Scott, 1989; Nakano et al., 1989). The binding of Hh to Ptc inhibits the repression of Smoothed (Smo), which is a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily (Robbins et al., 2012). This leads to the activation of Cubitus interruptus (Ci) the only known transcriptional mediator of the Hh response (Alexandre et al., 1996). Ci belongs to the GLI zinc-finger protein family and is a bifunctional transcription factor that can both activate or inhibit transcription (Whittington et al., 2011; Methot and Basler, 1999). An important step in Smo activation relates to its conformational change. Indeed, in the absence of Hh, inactive Smo is identified as a dimer in which the cytoplasmic tails are in a closed conformation, which in drosophila, leads to its degradation (Zhao et al., 2007; Li et al., 2012; Xia et al., 2012). This conformation is maintained by electrostatic interactions in the C-terminal domain between positively- and negatively-charged clusters. Hh activation neutralizes the positive cluster by triggering phosphorylation of an adjacent domain (Zhao et al., 2007). In drosophila, this phosphorylation is sequential and triggered by the protein kinase A (PKA) (Zhang et al., 2004; Jia et al., 2004; Apionishev et al., 2005), the casein kinase I α (CkI α) (Zhang et al., 2004; Jia et al., 2004; Apionishev et al., 2005), the CkI γ /Gilgamesh kinase (Li et al., 2016), the CkII (Jia et al., 2010), the protein kinase C (PKC) (Jiang et al., 2014), the serine-threonine kinase Fused (Fu) (Sanial et al., 2017) and the G protein-coupled receptor kinase 2 (Gprk2) (Chen et al., 2010; Cheng et al., 2010) which promote the conversion of Smo to an open conformation. This switch seems to be essential for the cell surface accumulation of Smo and signaling activation. Differences in the strength of Hh signaling are generated by the gradual phosphorylation of Smo. A greater degree of phosphorylation corresponds to stronger signaling, probably as a result of a gradual change in the conformation of the cytoplasmic tail (Jia, 2012; Fan et al., 2012).

The cascade of events between the activated Smo protein and Ci is still a matter of debate. Interestingly, Hh signaling results in a change in the balance between the activator (Ciact) and repressor (Cirep) forms of the Ci proteins by regulating its post-translational proteolytic processing. In the absence of Hh, full length Ci (Ci155) undergoes sequential phosphorylation at multiple sites, by different kinases including the priming kinase PKA, which initiates

recognition of Ci155 by the proteasome leading to a partial degradation of the C-terminal transactivation domain (Price and Kalderon, 2002; Jia et al., 2005; Smelkinson et al., 2007. Smelkinson et Kalderon, 2006; Tian et al., 2005). The remaining protein, which comprises the N-terminal and DNA-binding domains, translocates to the nucleus, and represses transcription of specific targets (Aza-Blanc et al., 1997; Methot and Basler, 1999). Activation of Smo inhibits the phosphorylation and partial proteolytic processing of Ci, allowing Ci155 to act as a transcriptional activator (Alexandre et al., 1996).

The master regulator of Ci regulation is a protein complex associated with the Smo cytoplasmic tail and composed of Fu and the kinesin protein Costal2 (Cos2) (Sisson et al., 1997; Robbins et al., 1997; Jia et al., 2003; Odgen et al., 2003; Lum et al., 2003; Aza-Blanc et al., 1997). The Hh signaling complex (HSC) directly regulates the anchoring of Ci to the microtubules, controls Ci post-translational regulation and nuclear translocation (Robbins et al., 1997; Chen et al., 1999; Wang et al., 2000; Wang and Holmgren, 1999). Interestingly, the HSC is used as a scaffold that brings kinases such as PKA in proximity to Ci and Smo (Zhang et al., 2005; Ranieri et al., 2014; Li et al., 2014). Hh signaling increases the level of Smo, which binds to the HSC and then outcompetes Ci for association with PKA, causing a switch in PKA substrate recognition from Ci to Smo (Ranieri et al., 2014).

The activation of the HSC involves its direct interaction with Smo (Ruel et al., 2003; Lum et al., 2003; Jia et al., 2003; Odgen et al., 2003). Fu consists of an N-terminal catalytic domain and a C-terminal regulatory domain (Fu-Reg). Fu-Reg interacts with several proteins of the HSC: Cos2 (Robbins et al. 1997, Sisson et al. 1997), Smo (Malpel et al., 2007; Sanial et al., 2017), Sufu (Monnier et al., 1998), and PKA (Ranieri et al., 2014). Moreover, it has been proposed that Fu-Reg interacts with the catalytic domain, possibly by intramolecular regulation, which blocks the kinase activity in the absence of Hh. In contrast, this association would be inhibited upon Hh signaling, allowing Fu catalytic activation, autophosphorylation and possibly dimerization (Ascano and Robbins, 2004; Robbins et al., 1997; Zhou and Kalderon, 2011). Moreover, forced association of Fu to membranes leads to a constitutive activation of the kinase (Claret et al., 2007).

Once activated, several post-translational changes are observed within the HSC, including the Fu-dependent phosphorylation of Cos2 on two different residues, serine 572 (S572) and 931 (S931) (Nybakken et al., 2002). We have previously shown that Cos2 phosphorylation at S572 and S931 can serve as polyvalent *in situ* indicators of Hh signaling in all tissues where Hh is active (Raisin et al., 2010) (Fig. 2a). In the wing imaginal disc, a monolayer of epithelial cells, Hh is expressed in the posterior (P) compartment and activates different cellular targets related to their position and thus distance from the Hh source. *In vivo*, low to high magnitude of Smo activation in the anterior (A) cells differentially activates Fu kinase activity and the phosphorylation of Cos2, from single phosphorylation (S572P) at low levels to double phosphorylation (S572P-S931P) at a higher signaling level close to the A/P border.

Ultimately, the double Cos2 phosphorylation correlates with a shift in the HSC distribution throughout the cell, from the cytoplasm to the plasma membrane (Ranieri et al., 2012).

GPRK2 is required for the Smo-dependent activation of target genes at high levels and, consequently, for the phosphorylation of S931, but not for S572 (Ranieri et al., 2012). Thus, there is a link between the different magnitudes of Hh signaling and the differential activation of the Fu kinase. Nevertheless, the mechanisms by which the differential conformation of Smo is transduced into different levels of Fu kinase activation is not known.

Here we present new data which reveal the convergence of several regulators of the pathway at the regulatory domain of the Fu kinase. Indeed, we show that the binding of the C-terminal end of Smo with Fu-Reg triggers Fu catalytic activation at a high level, thus acting as a Fu activating peptide. We also show that GprK2 is constitutively associated with the HSC and binds to Fu-Reg, independently of Smo. In addition, we found that the binding of Smo to Fu-Reg triggers a conformational change within the Fu protein which brings the Fu catalytic domain into closer proximity with its substrate, Cos2. We propose a new model in which, depending on the magnitude of Hh signaling, Smo and Gprk2 induce a conformational change in Fu within the HSC, which is a crucial step for the transduction of the Hh extracellular gradient into differential gene responses.

Results

Identification of a Smo peptide that behaves as an Fu activator

In order to better understand the mechanism by which the Smo protein activates the Hh pathway, we conducted an *in vivo* structure-function analysis of Smo to identify the domain(s) involved in downstream activation. At low-level Hh signaling, the partial proteolysis of Ci is repressed, resulting in the expression of the Hh transcriptional target *decapentaplegic (dpp)*, whereas at high levels of signaling, Ci is converted to CiA, leading to the expression of the two targets, *ptc* and *engrailed (en)*, in the first three rows of A cells at the A/P border (Ranieri et al., 2012; Fig. 1a). Three overlapping domains of the Smo cytoplasmic tail, Smo^{Cyto} (555-1036aa), Smo^{ΔSAID} (818-1036aa) and Smo^{Fu} (985-1036aa) (Fig. 1b), were evaluated for their ability to activate expression of *hh* targets in the dorsal compartment of imaginal discs (Fig. 1c-e). In all these *in vivo* assays, the ventral domain serves as an internal control because ventral cells are wild type.

Surprisingly, we found that, of the three Smo cytoplasmic constructs, the smallest domain of Smo (Smo^{Fu}, corresponding to the last 52 aa), is the most potent inducer of the pathway (Fig. 1e). Indeed, the impact of Smo^{Fu} on signaling activation is clearly visible in the case of the anterior enlargement of Ci155 and Ci-A (Fig.1e'), which leads to an extension of the domain of expression of target genes such as En, Ptc and *dpp* (Fig 1e''-e''', graph in e'''' and data not shown). To confirm this result, Smo^{Fu} was constitutively expressed throughout the entire pouch of the imaginal disc (Suppl. Fig.1c). Consequently, Ci-A, Ptc and En expression domains were expanded (Suppl. Fig. 1c-c'') and the corresponding adult wings displayed an increase in the vein 3 and 4 interspace, which is characteristic of increased activation of Hh signaling (Suppl. Fig. 1c''').

As Hh signal transduction depends on Smo activation at the plasma membrane, we considered whether translocation of Smo^{Fu} to the plasma membrane was sufficient to activate signaling. To test this idea, a myristoylated version of Smo^{Fu} (Myr-Smo^{Fu}), which triggers constitutive Smo^{Fu} localization at the plasma membrane, was expressed in the dorsal compartment. This led to an extension of Ci and Ptc expression (Suppl. Fig.1d), demonstrating that the membrane anchorage of Smo^{Fu} is able to activate Hh pathway.

To confirm the effect of the C-terminal domain of Smo on the Hh pathway, we used a truncated variant of Smo lacking 59 aa from the C-terminus (Smo Δ Fu; Malpel et al., 2007). Compared to Smo-WT and Smo^{Fu}, Smo Δ Fu induced a much weaker increase in Ptc expression (compare Fig.1f and 1g) indicating that depletion of the last 59 aa of Smo impairs a high level of pathway activation. Finally, signaling activity of Smo Δ Fu was rescued upon co-expression with Smo^{Fu} (Fig. 1h) to a level equivalent to Smo-WT (Fig.1f).

Since the last 59 aa of Smo are able to co-immunoprecipitate with Fu and bind directly to Fu in a two hybrid screen (Suppl. Fig. 1b; Malpel et al., 2007), we decided to test the ability of Smo^{Fu} to activate the Fu kinase both *in vitro* and *in vivo*. It is known that Cos2 phosphorylation of S572 and S931 is abrogated in absence of Hh signaling, for example, in cells expressing the dominant-negative form of Smo, Smo-AAA (Fig. 2f and Suppl. 2c-d). Similarly to our previous observation in the wing discs, we found that Smo^{Fu} is the most potent inducer of Cos2 phosphorylation compared to the other Smo cytoplasmic constructs when expressed in S2R+ cells (Sup. Fig. 2c). *In vivo*, expression of Smo^{Fu} in the dorsal compartment leads to an increase in Cos2 phosphorylation, which was mostly visible on S931 (Fig. 2c-d). In this context, the endogenous expression pattern of Cos2 was not modified with respect to the ventral control (Sup Fig. 2b). Given that Cos2 phosphorylation of S572 and S931 depends on Fu activity (Suppl. Fig. 1d; Ranieri et al., 2012), this suggests that the last 59 aa of the C-terminal tail of Smo are sufficient to act as a Fu kinase-activating peptide. Interestingly, both *in vivo* and *in vitro*, Smo Δ Fu is unable to activate Fu to a high level, in terms of S931 phosphorylation (Fig. 2h-i and Suppl. Fig. 2d) but does not significantly modify the pattern of phosphorylation of Ser572 or the endogenous level of Cos2 (Fig. 1g, Suppl. Fig. 2a). This suggests that truncated Smo, lacking the last 59 aa, is unable to activate Fu to a high level, but can be rescued upon co-expression with Smo^{Fu} (Fig. 2j). Note that both Smo Δ Fu and SmoAAA behave as dominant negative variants in both anterior cells and in posterior cells, which are constitutively activated for Hh signaling due to the absence of Ptc expression (Fig. 2f and 2h).

Considered together, these data suggest that the last 52 aa of Smo are able to interact with Fu, which stimulates its kinase activity and promotes signal transduction at the highest level, both in terms of signaling components and target gene expression.

The potency of the Fu-activating peptide depends on endogenous Smo

Over the course of our study, we noticed that Smo^{Fu} did not induce signaling distal to the A/P border in the most anterior cells (Fig.1e). In these cells, the endogenous Smo protein is not stabilized (Fig. 3a') suggesting that the activity of Smo^{Fu} depends on the presence of endogenous Smo. To confirm this hypothesis, endogenous Smo in the dorsal compartment was depleted by RNAi and the activity of Smo^{Fu} was tested in this new background. The dsRNA sequence targeted against *smo* was located at the 5' end of the *smo* transcript, a sequence which is not present in the Smo^{Fu} transgene, and did not affect its expression (Fig. 3a-a' and b-b'). In the *smo*-depleted cells, Ptc expression was inhibited and Ci155 was not stabilized (Fig. 3a-a'''). In this background, Smo^{Fu} was no longer able to activate the Hh signaling protein, suggesting that the Fu kinase-activating peptide depends on the presence of endogenous Smo to be active (Fig. 3b''-b'''). Similarly, we found that in the absence of *gprk2*, Smo^{Fu} was not able to activate Hh signaling (Fig. 3c-f). In the *gprk2* mutant, the Hh signal was translated to a lower level and characterized by reduced stabilization and

activation of Smo (Suppl. Fig. 3a), with limited Fu kinase activity, which allowed the phosphorylation of Cos2 on serine 572, but not on serine 931 (Suppl. Fig. 3b-c). In this mutant, the Ci gradient was modified, with the Ci155 domain abructing the P cells, likely due to the absence of Ci-Act (Suppl. Fig. 3a-c). This absence is explained by the loss of expression of *en* and *ptc* genes (Fig. 3c-d; Suppl. Fig. 3b-c). In contrast, the genes that are induced in low levels of Hh, such as *dpp*, were still activated (data not shown). Interestingly, the *gprk2* phenotype could be rescued by reintroducing the expression of a wild-type form of Gprk2 (Fig. 3g), but not by the kinase dead version of Gprk2KD (Suppl. Fig 3d-d"). In the rescued animal, Smo^{Fu} is able to promote high Hh signaling (compare Fig. 3h with Suppl. Fig3 e-e").

These results reveal that the effect of the Fu-activating peptide requires the presence of Smo, and the kinase activity of Gprk2. This strongly suggests that Gprk2-dependent activation of Smo is a prerequisite for the direct activation of Fu.

Association of Smo and Gprk2 with the Fu kinase

In order to analyze the association of Smo with Fu in drosophila S2R+ cells, we have used the multicolor BiFC technique (Shyu et al., 2008). Two non-fluorescent fragments of a cleaved fluorescent protein (YFP) were separately fused to the Smo and Fu proteins. Fusion of the two YFP moieties was designed at the C-terminal (C-term) end of the wild-type Smo and at the N-terminal (N-term) of the wild-type Fu protein. Additional epitope sequences (Myc or HA) were also inserted in order to localize these proteins in the cells by immunofluorescence (Fig. 4). This technique enables quantification of the interaction between Smo-N-YFP and C-YFP-Fu in the cells. An interaction between the two proteins should bring the two non-fluorescent fragments into close proximity, thereby reconstituting an intact fluorescent YFP (Fig. 4a-d). After transfection and differential treatment with Hh, we found a significant increase in Smo-Fu association upon treatment with Hh, which was further enhanced upon co-transfection with PKA and Gprk2 (see quantification in Fig. 4i). Also, this treatment lead to a strong accumulation of the YFP signal at the plasma membrane, where Smo is stabilized (Fig. 4d). Interestingly, using the same assay with Gprk2-N-YFP and C-YFP-Fu, a significant interaction between the two proteins was also observed (Fig. 4e-f), even in cells treated with dsRNA against *smo* and *cos2* (Suppl. Fig. 4a-c). This interaction was also confirmed by immunoprecipitation (Suppl. Fig 4f). Upon Hh treatment and in the presence of a Smo-CFP protein, we observed an increase in Gprk2 and Fu at the plasma membrane (compare Fig. 4g to 4h). This localization was also strongly stabilized in presence of a myristoyled Smo^{Fu} peptide localized at the plasma membrane (compare Suppl. Fig. 4d with 4e). In order to confirm the proximity of the three Smo, Gprk2 and Fu proteins, we performed FRET experiments between the Smo-CFP donor protein and the Gprk2/Fu reconstituted YFP acceptor complex. Under the same transfection conditions as those carried out in Figure 4g-h, a FRET signal, which increased in the presence of Hh, was detected in these cells indicating the proximity of these three proteins in a large complex (Fig. 4k).

Our data strongly suggest that Hh signaling promotes Smo and Fu association, and that Fu forms a stable complex with Gprk2.

Constitutive association of Gprk2 in the Hh signaling complex

To further analyze the association of Smo and Gprk2 within the HSC *in vivo*, we expressed a protein chimera (Kinco) in which the Cos2 motor domain has been replaced by a motor domain of a classical kinesin (Zhang et al., 2005). This tool allows the *in vivo* visualization of endogenous proteins associated with Cos2 by increasing their concentration at the basal side of the polarized cells where Kinco is mobilized. Upon expression in the dorsal domain of the wing disc, Kinco promotes basal punctate accumulation of Smo, Gprk2 (Fig. 5a), Fu and Ci proteins (Suppl. Fig. 5a-b). We also noted that in the most anterior cells, far from Hh source, Gprk2 is present in punctate structures, whereas Smo is absent, suggesting that Gprk2 is able to associate with the HSC complex independently of Smo (Fig. 5a2'-2''). To confirm this hypothesis we analyzed the punctate structures that were produced when Kinco was co-expressed with a dsRNA against *smo*, in the presence of endogenous Gprk2. Interestingly, in the absence of Smo, Gprk2 co-localization with Kinco was still observed (Fig. 5b-b2'').

The number and the intensity of Gprk2/Kinco punctate structures did not vary throughout the anterior cells. To further confirm this, immunoprecipitation of the endogenous HSC from S2R+ protein lysate was performed. As previously described, Gprk2 was present in Smo immunoprecipitates (IPs) in the presence of Hh (Fig. 5c), but also in the Fu and Cos2 IPs in the absence of Hh, whereas the level of Smo was extremely low (Fig. 5c). To determine which member of the HSC was interacting with Gprk2, S2R + cells were treated with dsRNA against *smo*, *fu* or *cos2*, and protein lysates were treated for Cos2 IP. As with the wing disc, Gprk2 associated with the HSC in the absence of Smo but not in the absence of Fu. Considered together, our data strongly suggest that endogenous Gprk2 is constitutively associated with the endogenous Fu kinase within the HSC, and that this association is independent of Smo and Hh signaling.

***In vivo* reconstitution of the Smo-Fu interaction**

To confirm the interaction of Smo with Fu *in vivo*, we conducted BiFC in wing discs. Both C-YFP-Fu-WT and Smo-N-YFP constructs were expressed uniformly throughout the dorsal compartment (Suppl. Fig. 6a). Expression of either Smo-N-YFP or C-YFP-Fu-WT alone did not induce YFP reconstitution at a significant level (data not shown). As expected, the co-expression of Smo-N-YFP and C-YFP-Fu-WT in P cells revealed a constant BiFC signal confirming the close Smo-Cterm/Fu-Nterm association in Hh-activated cells (Fig. 6a and graph). Interestingly, expression of the two constructs in the anterior compartment revealed a strong modulation of the BiFC signal. In the first row of A cells, the BiFC signal between Smo and Fu was very low, suggesting a decrease or change in the association between the proteins in A cells that were activated by Hh at a high level. This domain correlates with an elevated level of Ptc (Fig. 6a) and Cos2 phosphorylation on S931 (Suppl. Fig. 6b). We also

observed that in anterior A cells, the BiFC signal initially increased but ultimately decreased gradually in more distal A cells. A similar BiFC profile was observed with a C-YFP-Fu-EE construct expressing a constitutive active Fu variant, but was strongly modified upon expression of a kinase dead variant of Fu, C-YFP-Fu-KD (Fig. 6b-c).

What could be the cause of the BiFC decrease? Firstly, we did not observe a decrease in the two YFP Smo and Fu fusion proteins in this domain (Suppl. Fig. 6a). Secondly, it is possible that in cells with a high level of Hh, the full association of Smo with Fu was decreased. To test this, we compared the amount of Smo-N-YFP which was precipitated with C-YFP-Fu-WT in either the absence or presence of Hh (Suppl. Fig. 6d) and found the amount of co-immunoprecipitated protein was not significantly different under the two conditions. Thirdly, it is important to note that both A cells at the A/P border and P cells display a high level of Hh signaling. However, Ptc is absent in P cells but highly expressed in A cells. We thus hypothesized that the strong decrease in the Smo-Cterm/Fu-Nterm association might be due to the increase in Ptc levels in A cells. To confirm this, we analyzed the consequences of expressing dsRNA against *ptc* or *ci* in the dorsal side of the disc, which leads to the strong decrease of Ptc protein. We also analyzed *gprk2* mutant discs, which are characterized by the loss of Ptc upregulation at the A/P border (Suppl. Fig. 3c). In all three of these combinations, the decrease in the BiFC signal that was previously described at the A/P border was no longer observed, but the BiFC signal gradually decreased farther from the Hh source. In parallel, we analyzed the BiFC signal from Smo-N-YFP association with C-YFP-Fu in cultured S2R+ cells in which we had increased the level of Ptc (Suppl. Fig. 6c). In these cells, the BiFC signal was also significantly reduced.

These data revealed a complex pattern of Smo association to Fu which is regulated by differential levels of Hh signaling. The overall Smo-Cterm/Fu-Nterm association in P cells is higher than in A cells, but at high levels of Hh signaling in A cells, this association is strongly reduced, likely due to the presence of elevated Ptc.

Conformation changes activate Fu and induce phosphorylation of Cos2 at different sites.

To further analyze the impact of Hh signaling on the Fu protein, we chose to analyze the modulation of the association of Fu with one of its substrate, Cos2. It has been previously shown that the last 57 aa of Fu-Reg binds to Cos2 protein, and that the overall association of Fu to Cos2 is not modulated by Hh signaling (Robbins et al., 1997; Ruel et al. 2007). Since the initial identification of the Fu kinase (Préat et al., 1990), the activation mechanism for this protein is yet to be described. Intriguingly, although Fu is constitutively associated with Cos2, it does not phosphorylate it. Nevertheless, since Hh triggers Fu-dependent Cos2 phosphorylation within the HSC, this suggests that a transient association between the catalytic domain of Fu and its target is modulated by Hh signaling and should be observable. We chose to separate the Fu protein into two parts, one corresponding to the Fu-Cat domain (from residues 1 to 302) encompassing all conserved residues present in the catalytic domain of the kinase protein family. The second part included the Fu-Reg domain (from

residues 303 to 805), and corresponded to a protein region of low molecular conservation and where different components of the HSC associate directly (Fig. 7a; Aikin et al. 2008). The expression of the separated domains of Fu in cultured cells revealed that Fu-Reg associates with Fu-Cat (Fig. 7b). We found that two domains in Fu-Reg associate with Fu-Cat: from aa 303 to 422 and from 422 to 586 (Suppl. Fig. 7a-c and data not shown). Interestingly, this association likely brings Fu-Cat close to Cos2. In its absence, phosphorylation of Cos2 is strongly diminished (Fig. 7c and Suppl. Fig. 7b).

The role of the Fu-Reg association with Fu-Cat is not known. In 2004, Ascano and Robbins proposed that, in the absence of Hh, an intracellular association of both Fu N-term and C-term domains inhibits Fu-Cat activity whereas, upon Hh activation, the two domains dissociate, releasing the inhibition on the catalytic site. We thus tested the hypothesis that the binding of Smo to Fu-Reg could release Fu auto-inhibition by inducing a dissociation of Fu-Reg from Fu-Cat. In order to test this hypothesis, we first performed co-immunoprecipitation of Fu-Reg and Smo^{cyto}, and found that Smo did indeed bind Fu-Reg. Nevertheless, immunoprecipitation of Fu-Reg with Fu-Cat in presence of Smo did not show significant defects in the association of Fu-Reg to Fu-Cat (Suppl. Fig. 7d). Furthermore, since we have already shown that the expression of the last 52 aa of Smo promotes Fu activity (Fig. 1-2), we investigated whether this association was regulated by Hh signaling. Interestingly, we found that, in the absence of Smo and Hh, Smo^{Fu} associates with Fu in a limited manner, but that this association is greatly increased in the presence of Smo and Hh (Fig. 7d). This indicates that, at high levels of Hh signaling, the accessibility and interaction of the most terminal end of Smo with the regulatory domain of the Fu kinase is increased.

To further analyze the modulation of Fu conformation upon Hh signaling, we decided to focus on the regulation of Fu binding to Cos2. To analyze the possible changes to Fu within the HSC, we decided to focus on the association of Fu-Cat with Cos2. For this, we analyzed the behavior of two constructs with YFP moieties fused to the N-terminal (N-term) end of Fu-WT and to the C-terminal (C-term) end of Cos2 (scheme in Suppl. Fig. 7e). After transfection, the BiFC analysis revealed a significant increase in the YFP signal between N-YFP-Fu-WT and Cos2-C-YFP upon treatment with Hh, suggesting that signal activation leads to a conformational change in the Fu-Cos2 complex. We found a similar result when expressing a N-YFP-Fu-Cat construct with Cos2-C-YFP (Fig. 7e). We also found an incremental change in the BiFC signal with this two constructs in presence of a functional Gprk2. We confirmed that, under these conditions, the HSC is reconstituted and increases phosphorylation of S572 and S931 on Cos2 (Fig. 7f). Note that in this assay, the Fu-Reg construct is also expressed in order to provide an interaction between Cos2 to Fu, because the absence of Fu-Reg leads to a significant decrease of the BiFC signal between Fu-Cat and Cos2 (Suppl. Fig. 7f).

Our data suggest that activation of Hh signaling through PKA, Gprk2 and Smo activation triggers a conformational change of the, Fu protein which increases the proximity of Fu-Cat and its substrate Cos2, in order to promote full phosphorylation of Cos2.

Discussion

Here we present new data concerning the differential activation of the Fu kinase induced by Smo and by the Gprk2 kinase. We demonstrate that GprK2 is constitutively associated with the HSC (Fig. 5), and that Smo-dependent activation of GprK2, at high levels of Hh signaling, takes place within the Fu/Cos2 complex. We also show that the last 52 residues of the Smo C-term domain interact directly with the Fu regulatory domain, activating both Fu-dependent phosphorylation on Cos2 (Fig. 2c-d) and target gene expression at high levels (Fig. 1e). Moreover, we show that the Hh signal, via Gprk2 kinase activity, induces conformational changes in Fu which promote the association of the Fu catalytic domain with the C-term domain of Cos2, which leads to the phosphorylation of S931 (Figure 7e-f). We propose that two activation states of Fu can be induced by the differential activation of Hh signaling. In this model, differential magnitudes of Hh signaling induce structural changes in Smo, Gprk2, and Fu within the same complex (Fig. 7g). Hh-dependent Smo stabilization promotes Smo association with Fu-Reg. Consequently, this binding induces a conformational change in Fu (FuAct1) increasing the proximity of Fu-Cat with Cos2 and promoting Cos2 phosphorylation on Ser572 (Fig. 7e-f). At a high level of Hh signaling, the conformational change to the Smo C-term domain is reinforced by Gprk2-dependent phosphorylation and leads to a direct interaction of the Smo C-term with Fu-Reg. This interaction enhances Fu activity (FuAct2) and Fu-Cat proximity to Cos2, promoting phosphorylation of Ser931.

Several publications have demonstrated that a differential magnitude of Hh signal is translated by successive phosphorylation of the Smo C-term, involving several kinases including PKA, Ckl α , CkII, PKC, Fu, Gish and Gprk2 (Zhang et al., 2004; Jia et al., 2004; Jia et al., 2010; Jiang et al., 2014; Li et al., 2016; Chen et al., 2010; Sanial et al; 2017). Phosphorylation of the Smo C-term promotes a change to an open conformation. This switch is essential for the cell surface accumulation of Smo and activation of the downstream HSC. How does the Fu kinase interpret the different Smo states? Here we present new *in vitro* and *in vivo* evidence for the direct regulation of Fu by the Smo tail. Because the last 52 amino acids of Smo interact directly with the Fu regulatory domain (Malpel et al., 2007) (Suppl. Fig. 1b), promote Fu kinase activity (Fig.2c) and increase cell responses to the Hh signal (Fig.1e), we believe that this association is important for the regulation of Fu catalytic activity. Thus, the activation of GprK2, induced by high levels of Hh, leads to a change in the conformation of Smo which allows its most terminal end to interact with the Fu regulatory domain (Fig. 7d), to increase its catalytic activity and to promote its proximity to Cos2. Moreover, we observed a gradient in the strength of the Smo C-term and Fu-N-term association in wing imaginal discs (Fig. 6a). This gradient is visible in the domain under Hh influence, and its intensity is dependent on Gprk2 (Fig. 6f). We propose here that Gprk2 promotes association of Smo to Fu and Fu to Cos2 (Fig. 4d and 7e), leading to the final change in the phosphorylation status of Cos2 (Suppl. Fig. 3c and Fig 7f).

Ascano and colleagues (Ascano et al., 2004) presented a model in which Fu-Reg associates with Fu-Cat, blocking the catalytic activity of Fu in the absence of the Hh signal. They also proposed that, upon Hh activation, the two domains dissociate and release the inhibition of Fu-Reg on Fu catalytic function. In this model, the binding of Smo to the regulatory domain of Fu would trigger the release of the Fu catalytic domain. Our data are not in favor of this hypothesis. Indeed, we show that the interaction between the both Fu domains is constitutive in induced and non-induced cells (Fig.7b and Suppl. Fig. 7d data not shown). We also showed that this association is necessary to bring Fu targets such as Cos2 into the proximity of Fu-Cat in order to be phosphorylated (Fig.7e-f) and that Smo does not compete with the catalytic domain for binding to the regulatory domain (Suppl. Fig.7d). Our results suggest that one of the functions of the regulatory domain is to bring the different substrates of Fu into the vicinity of the catalytic domain. Indeed, the regulatory domain interacts with several targets including Sufu, Smo and Cos2 (Monier et al., 1998; Malpel et al., 2007; Robbins et al., 1997). This strongly suggests that the regulatory domain behaves as a platform in order for the substrates to be phosphorylated, and that one of its functions is to bring the substrates closer to the catalytic domain.

From this study, we propose a new model describing the mechanism by which Hh allows the differential activation of the Fu kinase, through its action on Smo and Gprk2. We have been able to demonstrate that the different activation states of the Fu kinase, are caused by changes in protein interaction and phosphorylation within the HSC, depending on the magnitude of Hh signaling. The combined effect of protein interaction and phosphorylation is essential to induce conformational changes in Fu in order to gradually release the catalytic site of the kinase, and thus allow the differential phosphorylation of Cos2. These different conformational changes appear to be important for the interpretation of the Hh morphogene gradient in the epithelial field.

In conclusion, we propose a new model in which, depending on the magnitude of Hh signaling, Smo and Gprk2 induce protein conformational changes within the HSC, which is a crucial step for the translation of the Hh extracellular gradient into differential gene responses.

Figure legends

Figure 1: The last 52 amino acids of Smo activate the Hh pathway *in vivo*

The upper right panel (b), schematic representation of the Smo WT protein and the Smo deletion mutants. (a) Wild-type wing discs stained for Ci155 (red, a, a'), Ptc (green, a, a' and En (grey, a, a'''). The A/P borders are delimited by dashed lines. (c-e) Wing discs expressing Smo^{Cyto}-Myc (c), Smo^{ΔSAID}-Myc (d) or Smo^{Fu}-Myc (e) driven by apterous-Gal4 (ap-Gal4) were immunostained for Myc (yellow, c, d, e), Ci155 (red, c', d', e'), Ptc (green, c'', d'', e''), En (grey, c''', d''', e'''). The A/P and D/V borders are indicated by dashed lines. Related quantification graphs (n=5 discs) of Ptc (c''', d''', e''') stainings in the anterior compartment are shown on the right. (f-h) Wing discs expressing Smo-WT (f), SmoΔFu (g) or SmoΔFu with Smo^{Fu} (h) driven by ap-Gal4 and stained for Ptc (green, f, g, h). Note that the co-expression of Smo^{Fu} with SmoΔFu gives the same phenotype as the expression of Smo-WT.

Figure 2: The last 52 amino acids of Smo promotes Fu kinase activity *in vivo*

The upper right panel represents the distribution of Ci isoforms and pSer572/pSer931 Cos2 in wing imaginal disc. (a-b) Wild-type wing discs stained for phospho-Ser931 of Cos2 (pS931, green, a, a'), phospho-Ser572 of Cos2 (pS572, green, b, b'), Ptc (blue, a) and Ci155 (red, b). (c-d) Wing discs expressing Smo^{Fu}-Myc in dorsal compartment using an ap-Gal4 driver and immunostained for pS931 (green, c, c''), pS572 (green, d, d'), Ptc (blue, c) and Ci (red, d). Quantification graph of the variation of Fu activity by following the levels of Cos2 phosphorylation on serine 931 (c'''). (e-f) Wing discs expressing Smo-WT (e), inactive Smo AAA (f) or SmoΔFu (g-h) in the dorsal compartment were immunostained for Ci155 (red, e, f, g), pS931 (green, e, e'', f, f', h, h'), Ptc (green, g), Smo (blue, e, f, h) and Cos2 (grey, g, g'). (i) Clones expressing SmoΔFu visualized for RFP (red, i) were stained for Smo (blue, i') and pS931 (green, i''). (j) Wing discs expressing SmoΔFu with Smo^{Fu} driven by ap-Gal4 and stained for pS931 (green, j). (k) Relative amount of pS931 staining of SmoΔFu and Smo^{Fu}Myc + SmoΔFu in both compartments (n=8 discs). Note that the co-expression of SmoΔFu with Smo^{Fu} gives the same phenotype as the expression of Smo-WT. The A/P and D/V borders are defined by dashed lines.

Figure 3: The effect of the last 52 amino acids of Smo requires the presence of endogenous Smo and Gprk2

(a-b) Wing discs expressing dsRNA against Smo without (a) or with Smo^{Fu}-Myc (b) by using an ap-Gal4 driver and immunostained for Ci155 (red, a, a'', b''), Ptc (grey, a, a''', b''') and Smo (green, a, a', b') and Myc (blue, b). (c-f) Wing discs expressing dsRNA against Gprk2 without (c-d) or with Smo^{Fu}-Myc (e-f) driven by ap-Gal4 were stained for Ci155 (red, c, d, e, f), En (yellow, c', e'), Ptc (green, d', f'), Gprk2 (green, e) and Myc (blue, f). (g-h) Wing discs from Gprk2 knock-out (KO) mutant expressing Gprk2-WT alone (g) or with Smo^{Fu}-Myc (h) under ap-gal4 driver were stained for Ci155 (red, g, h) and En (yellow, g', h'). The A/P and D/V borders are indicated by dashed lines. (i) Quantification of En intensity in Gprk2KO mutant discs (green) in which Gprk2-WT has been expressed in the dorsal compartment (red) (n=4 discs). (j) Quantification of En intensity in Gprk2KO mutant discs expressing Gprk2-WT (red) or Gprk2-WT and Smo^{Fu} (green) (n=4 discs).

Figure 4: The association of Smo with Fu is enhanced in presence of Hh

(a-h) S2R+ cells with or without Hh treatment were transfected with Smo-N-YFP-Myc or Gprk2-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT. Schematic representations of YFP reconstituted activity are represented on the left, while the experimental conditions and structure of the protein complex are indicated on the right of each panel. Transfected cells were stained for Myc (red in a'-h', a'''-d''') and HA (green, a''-h'', a'''-d'''). Smo-CFP was transfected and its expression followed with CFP fluorescence (e'''-h'''). From a to h, YFP signals were detected in yellow. (i-j) Quantification of interactions between Smo/Fu and Gprk2/Fu are presented respectively in the graphs i and j (for all BiFC quantification, YFP signals were analyzed in 150 to

200 cells). n=5 independent experiments, mean \pm s.d; ***p<0,001; * p<0,05. (k) Relative FRET signal for Gprk2/Fu YFP BiFC interaction with Smo-CFP in absence or presence of Hh (n=3, mean \pm s.d; **p<0,01)

Figure 5: Gprk2 is constitutively associated with the Fu/Cos2 complex

(a-b) Wing discs expressing HA-Kinco in the presence of dsRNA against Smo (b) or not (a) driven with *ap*-Gal4, were immunostained for HA (red, a, a'', b, b''), and endogenous Smo (yellow, a', b') and Gprk2 proteins (green, a'', a''', b'', b'''). On the right of each panel, a large magnification of two different squares, one close to A/P border (a1, b1) and one square from far away in anterior compartment (a2, b2), are shown. Kinco, Smo and Gprk2 were respectively analyzed in red (a1', a2', b1', b2'), yellow (a1'', a2'', b1'', b2'') and green (a1''', a2''', b1''', b2'''). The D/V border is defined by dashed lines. (c) Extracts from S2R+ cells treated or not with Hh were subjected to immunoprecipitation with Smo, Fu or Cos2 antibodies, and the immunoprecipitates were analyzed by Western blotting for the presence of the endogenous Smo, Cos2 and Gprk2 proteins. (d) S2R+ cells treated or not with Hh were transfected with the indicated dsRNA, and cell lysates were immunoprecipitated with Cos2 antibody. Immunoprecipitates were analyzed for the presence of the endogenous Smo, Cos2 and Gprk2 proteins.

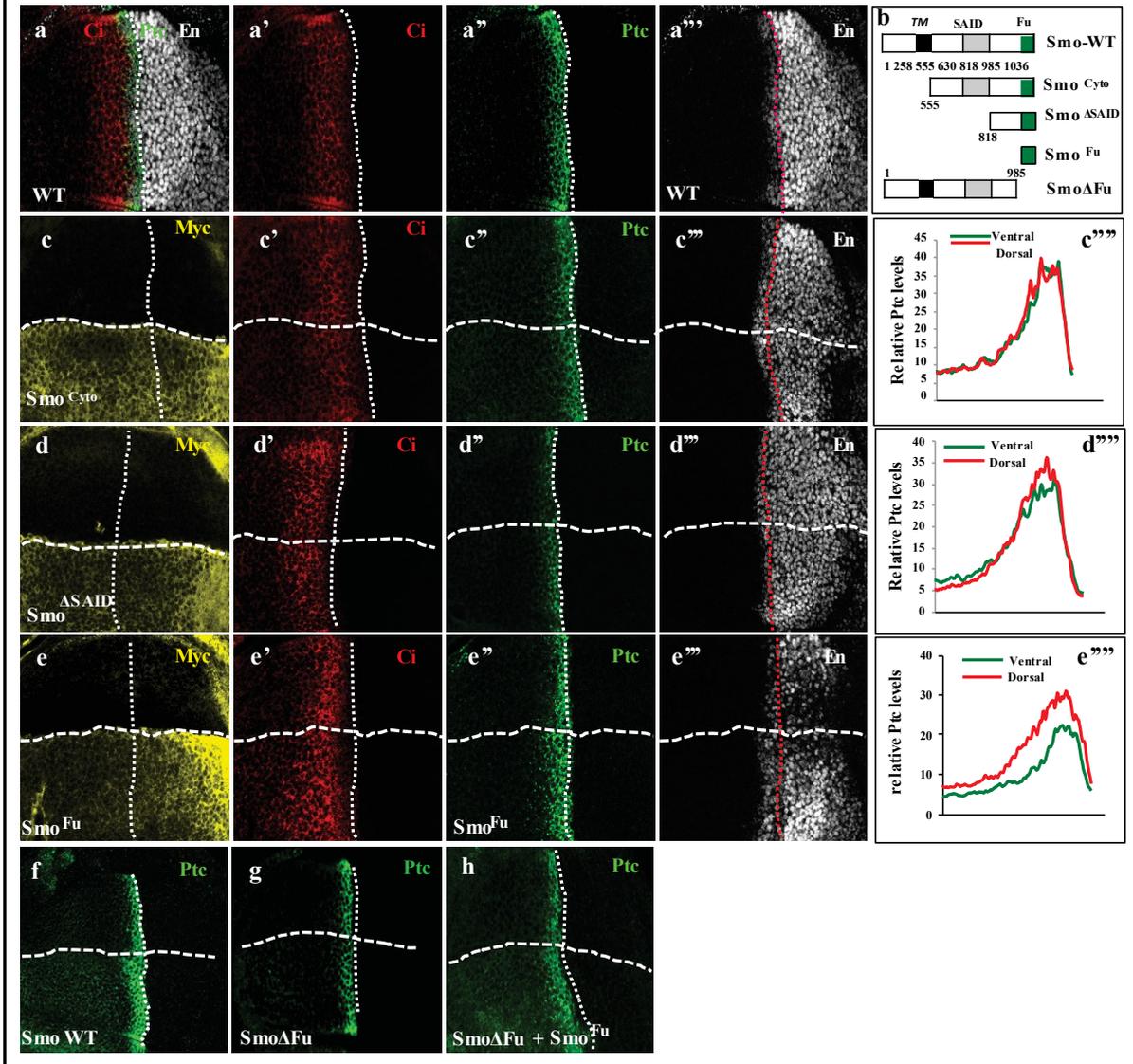
Figure 6: Hh signaling modifies Smo association with Fu

(a-c) Wing imaginal discs co-expressing Smo-WT-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT (a) or HA-C-YFP-Fu-KD (b) or HA-C-YFP-Fu-EE (c) in the dorsal compartment using the *ap*-Gal4 driver were stained for Ptc (red, a, b, c) and Ci155 (green, a', b', c'). YFP signals were detected in yellow for a'', b'', c'' and quantified in a''', b''', c''' (n=5 discs). (d-f) Smo-WT-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT are co-expressed in wing discs driven by *ap*-Gal4 with dsRNA against *ptc* (d) or *ci* (e) or in wing discs from Gprk2KO mutant (f). Ptc, Ci, Fu and Smo were visualized respectively in red (Ptc: d, e), green (Ci: d', e'), red (Fu: f) and green (Smo: f'). YFP signals were detected in yellow for d'', e'', f'' and measured in d''', e''', f''' (n=4 discs). The A/P and D/V borders are indicated by dashed lines.

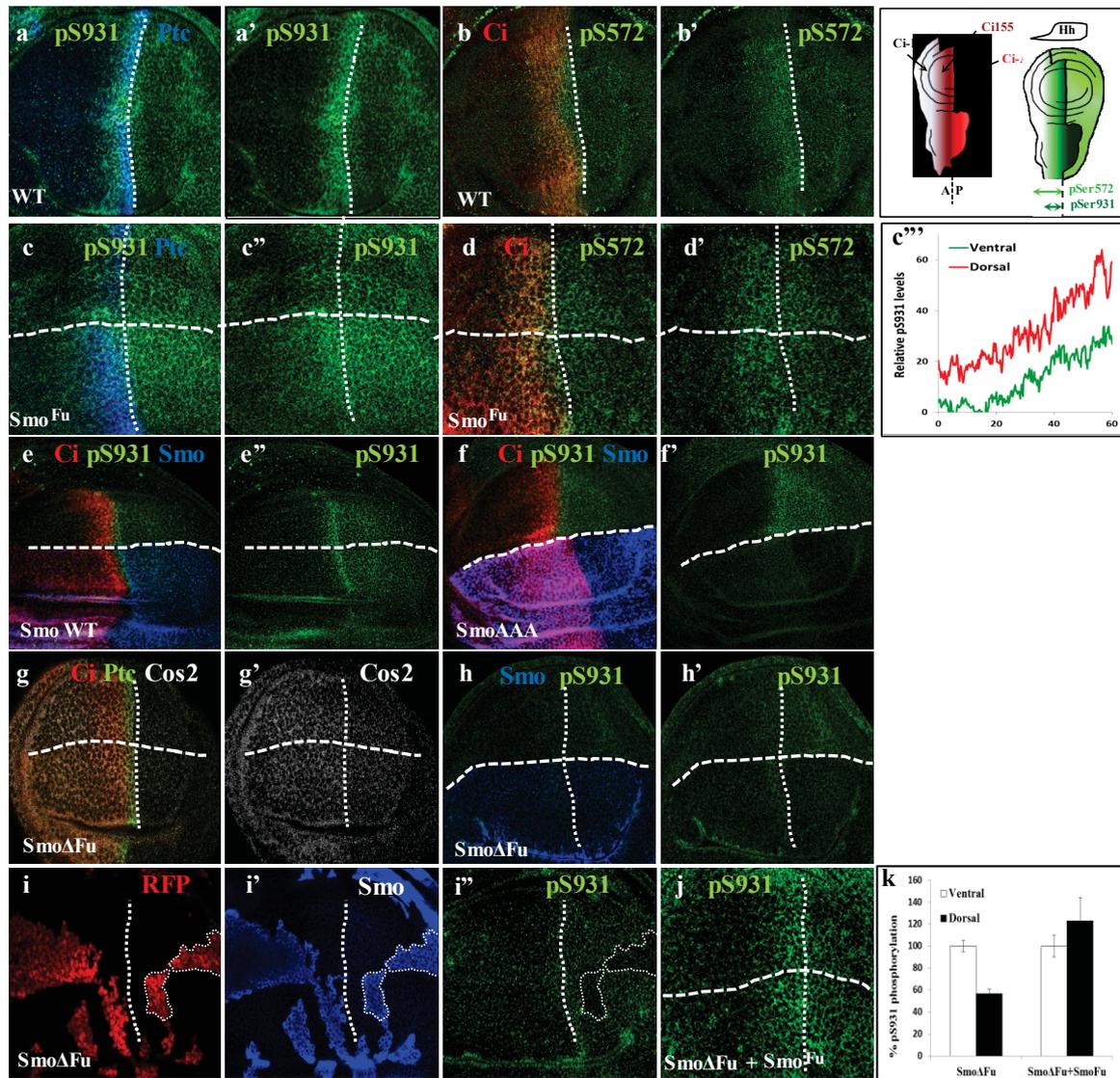
Figure 7: Change in Fu conformation induces differential Cos2 phosphorylation

(a) Schematic representation of the Fu-WT and the Fu deletion mutants. (b) S2 R+ cells were transfected with indicated constructs (described in a). Fu-Cat immunoprecipitates analyzed for the presence of Fu-Reg. (c) Extracts of S2R+ treated with okadaic acid (OA) and transfected with the indicated constructs were analyzed by Western blot for the phosphorylation of Cos2. (d) S2 R+ cells were transfected with indicated constructs. The lysates were immunoprecipitated for Fu-WT, and analyzed for the presence of Smo-WT and Smo^{Fu}. (e) Schematic representation of Fu and Cos2 constructs used for the BiFC experiments. S2R+ cells were transfected with N-YFP-Fu-Cat and Cos2-C-YFP in presence of Fu-Reg and different variants of active (WT) or inactive (KD) Gprk2. To reconstitute the HSC complex, PKA and Smo are also transfected with Hh. The graph represents the BiFC analysis between the Fu-Cat and Cos2 in different transfection conditions as indicated (n=5, mean \pm s.d; ***p<0,001). (f) Western blot analysis of cell lysates described in (e). (g) Scheme recapitulating the Fu conformation changes in the Fu/Cos2 complex. In the absence of Hh, both Fu and Gprk2 are inactive. In the presence of Hh, Smo is stabilized and associates with the regulatory domain of Fu. Consequently, this binding promotes a Fu conformational change increasing the proximity of the Fu catalytic domain with Cos2 and promoting Cos2 phosphorylation on Ser572. At high levels of Hh signaling, the conformational changes of Smo C-terminal domains are reinforced by Gprk2-dependent phosphorylation and lead to a direct interaction of the C-terminal end of Smo with the Fu regulatory domain. This interaction enhances Fu activity and its proximity to Cos2, promoting phosphorylation of Ser931.

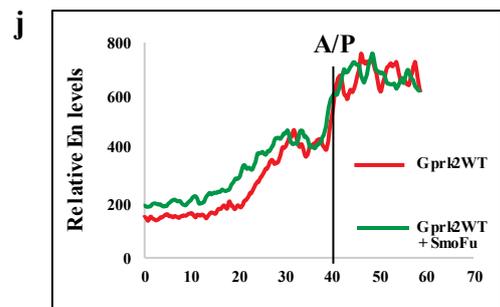
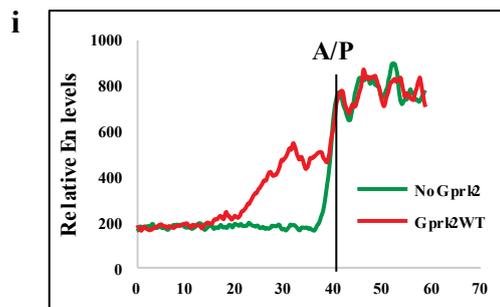
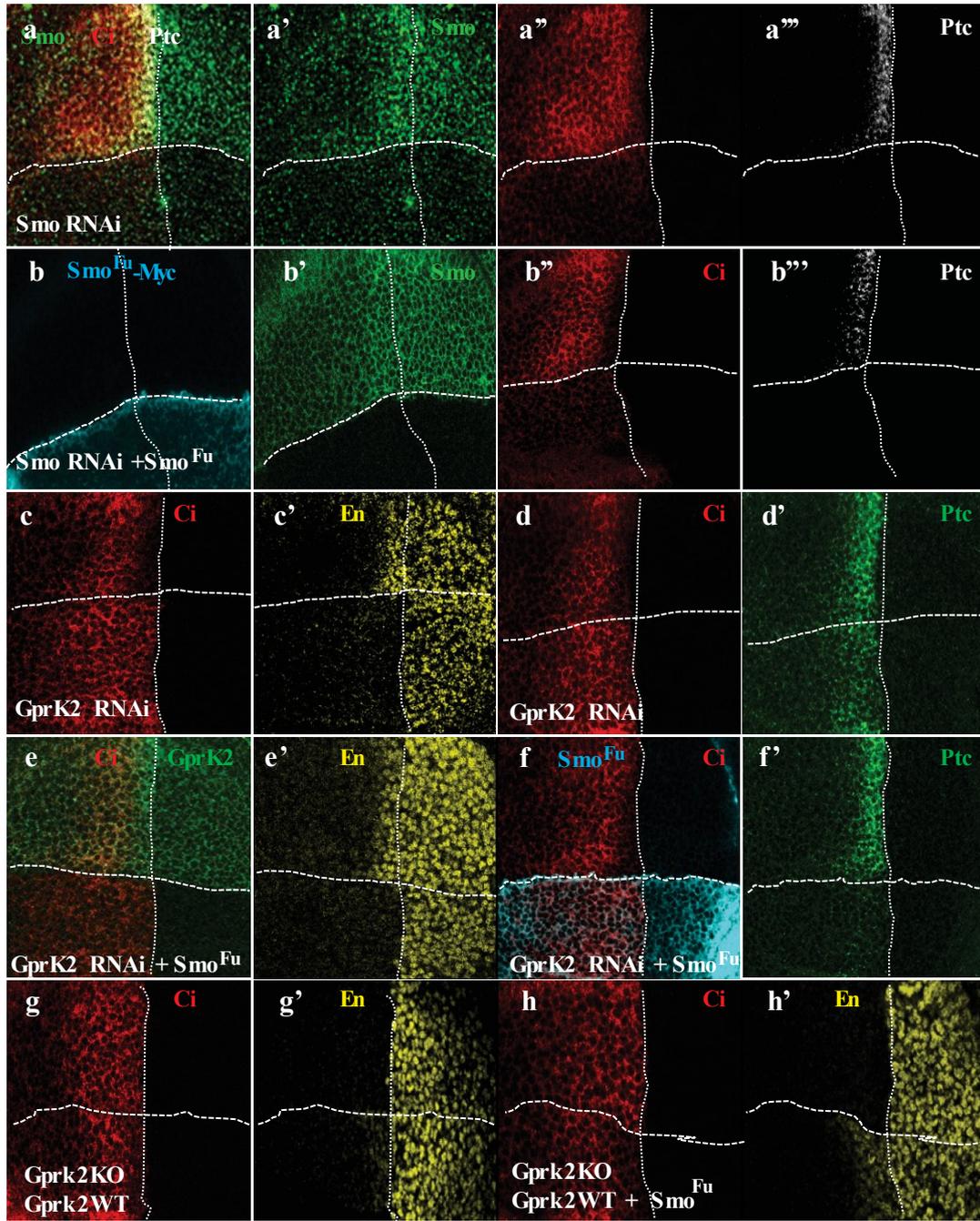
Giordano et al., Figure 1



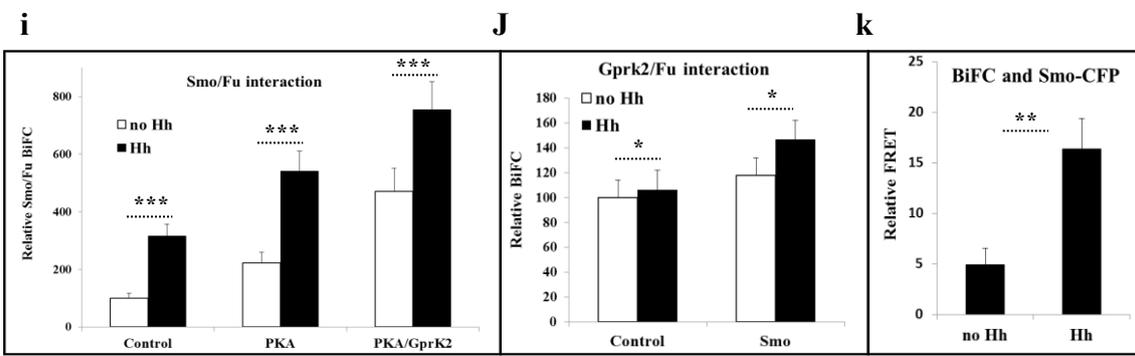
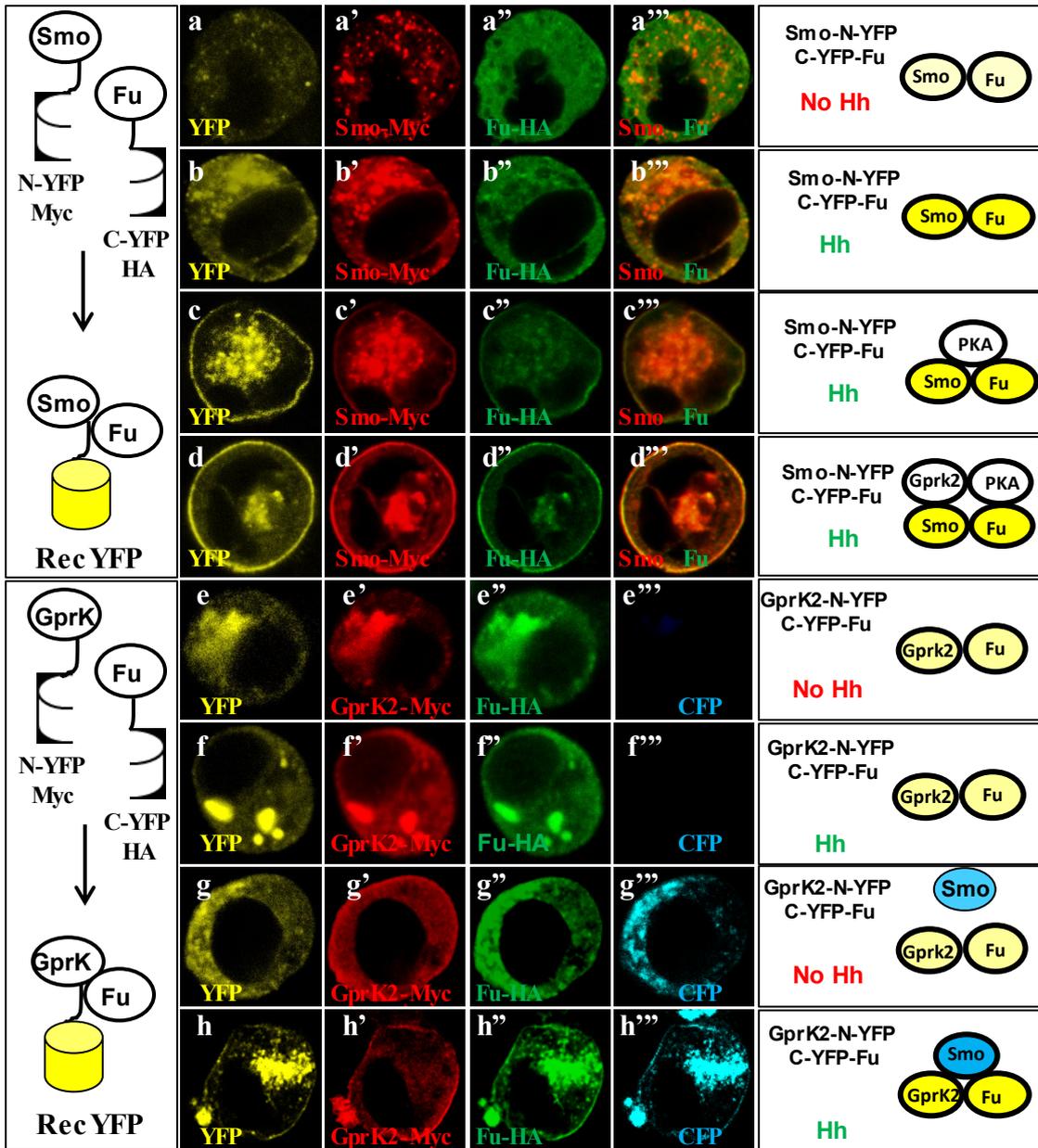
Giordano et al., Figure 2



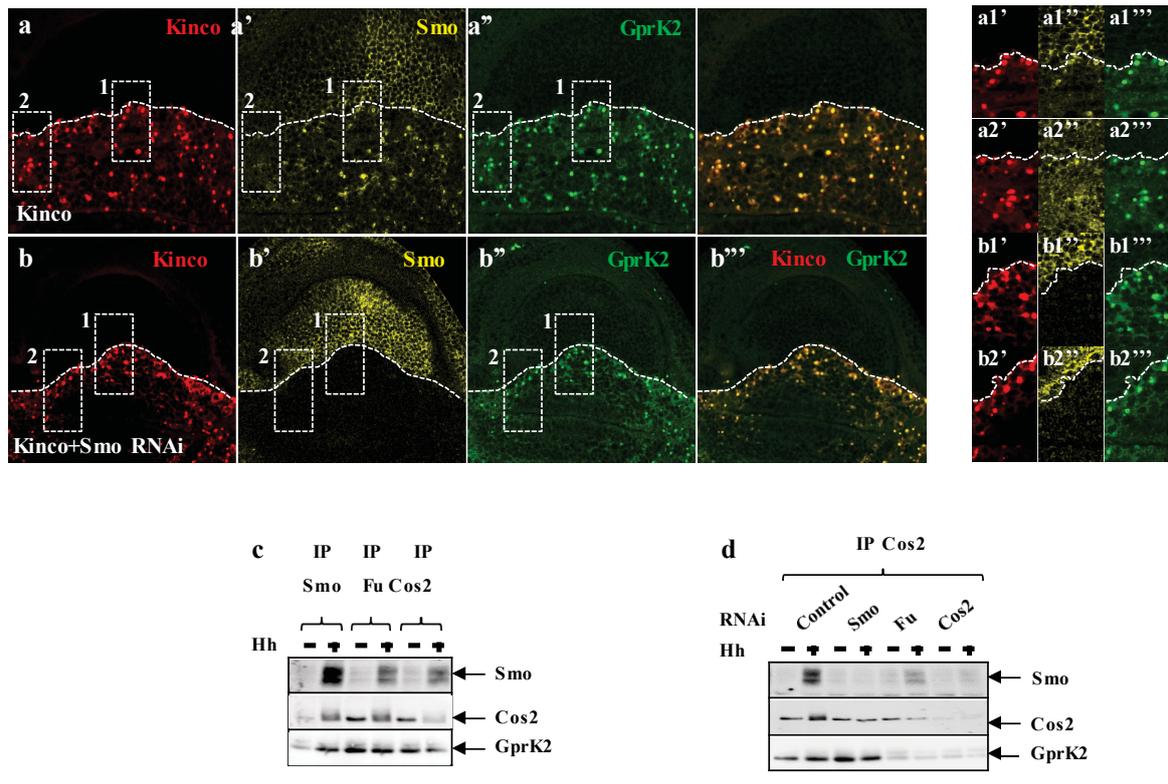
Giordano et al., Figure 3



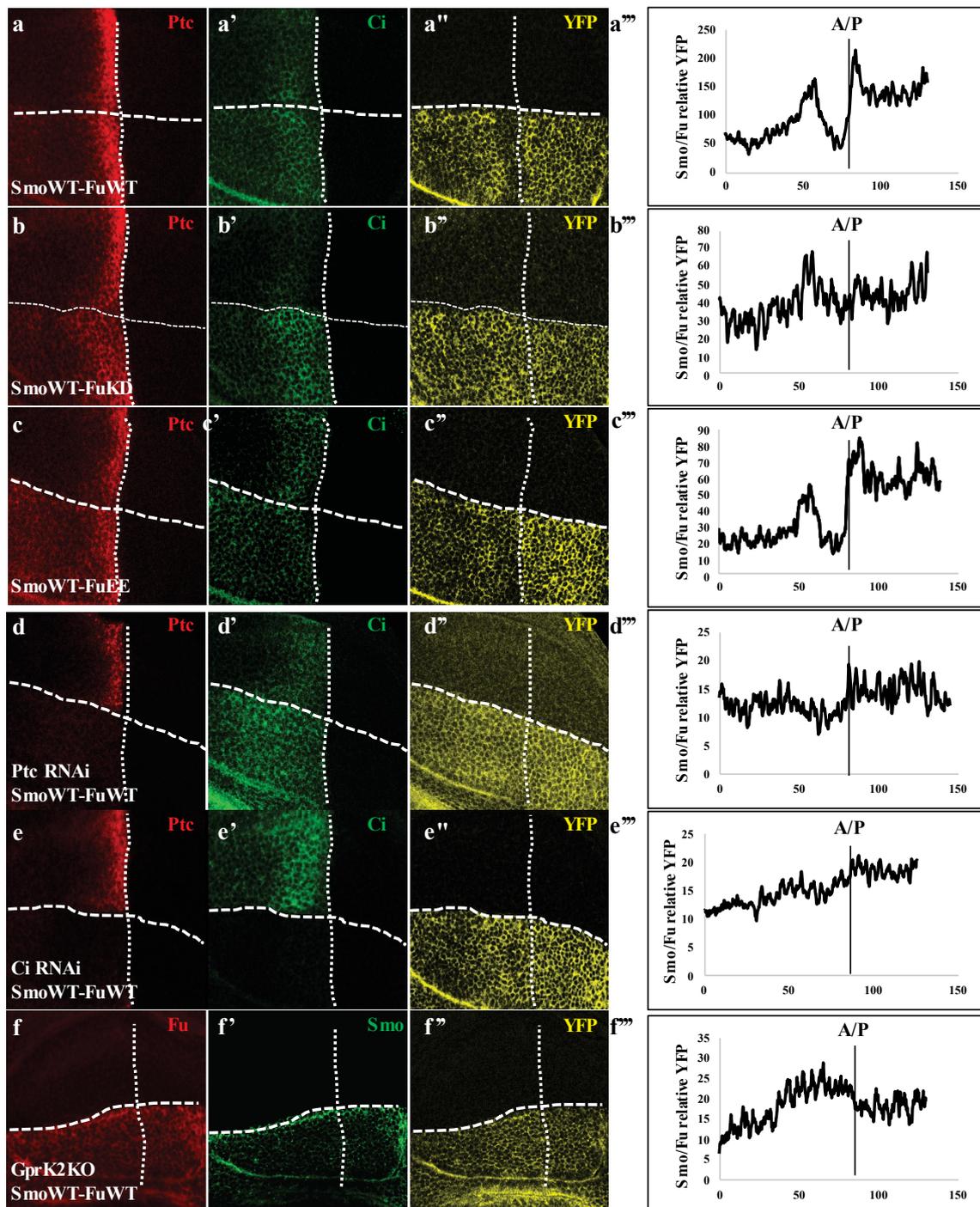
Giordano et al., Figure 4



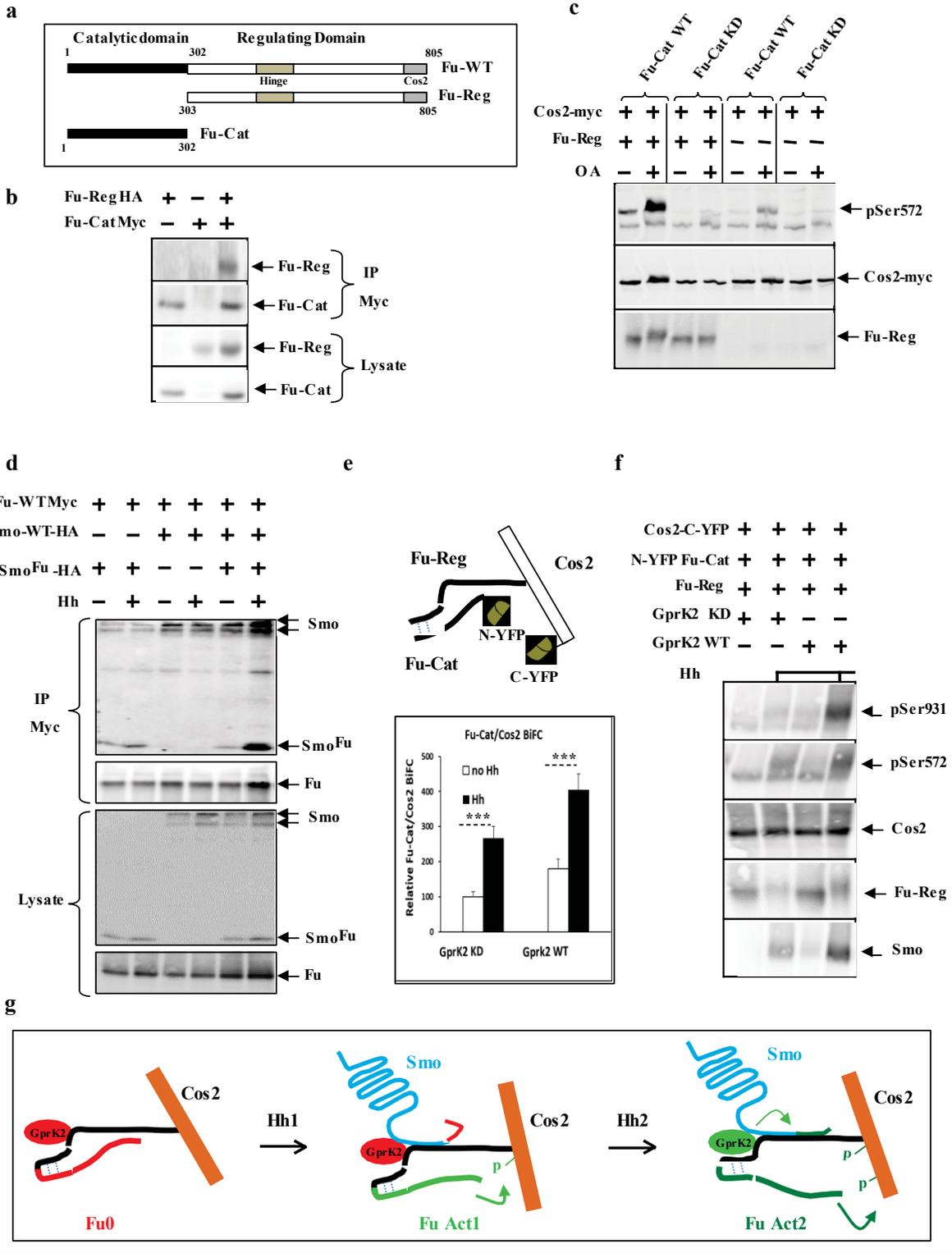
Giordano et al., Figure 5



Giordano et al., Figure 6



Giordano et al., Figure 7



Supplementary figure legends

Suppl. Figure 1: The last 52 amino acids of Smo activate the Hh pathway

(a) Schematic representation of the Smo WT protein and the Smo deletion mutants. (b) S2R+ cells were transfected with Fu-WT-HA and variants of Smo. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with HA-antibody, and the presence of Smo was analyzed by Western blotting. (c) A wing disc expressing Smo^{Fu}-Myc driven by *rotund*-Gal4 (*rngal4*) was stained for Ci155 (red, c), Ptc (green, c') and En (grey, c''). Representative examples of adult wings from controls (c''') or animals expressing Smo^{Fu} using *rn*-Gal4 driver (c''') with quantification of the V3-V4 intervein space on the right panel. (d) Wing discs expressing a myristoylated version of Fu, Myr-Smo^{Fu}-Myc, using *ap*-Gal4 driver were immunostained for Myc (yellow, d, d'), Ci155 (red, d, d''), Ptc (green, d, d'''). Dashed lines delimit the A/P and D/V borders.

Suppl. Figure 2: The last 52 amino acids of Smo activate the Hh pathway

(a-b) Wing discs expressing Smo Δ Fu (a) or Smo^{Fu} (b), were stained for Cos2 (red, a, a', b'), pSer572 (green, a), and Myc (blue, b). (c) S2R+ cells were transfected with indicated constructs and lysates were analyzed by Western blotting for the presence of pS572, pS931, Cos2 and Fu. (d) S2R+ cells were transfected with indicated constructs, and lysates were analyzed by Western blotting for the presence of pS572, pS931, Fu and Cos2. Graph represents the quantification of Fu activity based on the levels of Cos2 phosphorylation.

Suppl. Figure 3: The effect of the last 59 amino acids of Smo requires the activity of the Gprk2 kinase

(a-c) Wing discs from Gprk2KO mutant were immunostained for Ci155 (red, a, a''', b, b''', c, c'''), phospho-Smo (pSmo) against the serine at position 687 (PKA phospho site), (green, a', a'''), pS572 (green, b', b'''), pS931 (c', c'''), Smo (blue, a'', a'''), En (blue, b'', b''') and Ptc (blue, c'', c'''). (d-e) Wing discs from the Gprk2KO mutant expressing Gprk2-KD alone (d) or with Smo^{Fu}-Myc (e) by using *ap*-gal4 driver were stained for Ci155 (red, d, e), Gprk2 (yellow, d', e') and En (grey, d'', e''). Dashed lines delimit the A/P and D/V borders.

Suppl. Figure 4: The association of Gprk2 with Fu is independent of Cos2 or Smo

(a-e) Gprk2-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT were transfected in S2R+ cells. Schematic representations of reconstitution of YFP activity are indicated on the left, while the experimental conditions and structure of the protein complex are presented on the right of each panel. Transfected cells were stained for Myc (Gprk2: red in a', b'; Smo^{Fu}: blue in d', d''; Myr-Smo^{Fu}: blue in e', e'' and HA: green in a'', b''). The absence of Smo has been confirmed by using an antibody against Smo in c'. YFP signals are represented in yellow for a-e and c''-e''. (f) S2R+ cells were transfected with plasmids expressing Fu-WT-Myc and Gprk2-HA. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with an antibody against HA and the presence of Fu was determined by Western blotting using the Myc antibody.

Suppl. Figure 5: Kinco expression reveals a protein complex composed of Smo, Fu, Cos2 and Ci

(a-b) Wing discs expressing HA-Kinco in the presence of dsRNA against Smo (b) or not (a) driven with *ap*-Gal4, were immunostained for HA (red, a, a''', b, b'''), and endogenous Smo (yellow, a'), Ci (yellow, b') and Fu proteins (green, a'', a''', b'', b'''). On the right of each panel, a large magnification of two different squares, one close to A/P bordure (a1, b1) and one square from far away in anterior compartment (a2, b2), are presented. Kinco and Fu were respectively visualized in red (a1', a2', b1', b2') and green (a1''',

a2''', b1''', b2'''). Smo was stained in yellow (a1'', a2'') and Ci was detected in yellow (b1'', b2''). The D/V border is delimited by dashed lines.

Suppl. Figure 6: The association of Smo with Fu is modulated by Ptc

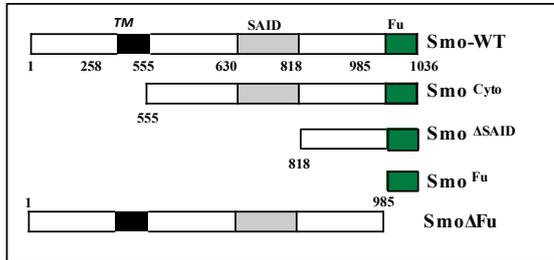
(a-b) Wing imaginal discs co-expressing Smo-WT-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT in the dorsal compartment by using ap-Gal4 driver were stained for Smo (green, a, blue, b Fu (purple, a'), pS931 (grey b' b''). YFP signal was detected in yellow for a'', b'', b'''. (c) Wing imaginal discs for the gprk2 mutant, co-expressing Smo-WT-N-YFP-Myc and HA-C-YFP-Fu-WT in the dorsal compartment were stained for Smo (blue, c), pSer931 (grey c', c''') and YFP (yellow, c'', c'''). Dashed lines delimit the A/P and D/V borders. (d) Quantification of Smo/Fu BiFC in S2R+ cells treated with Hh and over-expressing Ptc (n=3, mean +/- s.d; ***p<0,001). (e) Constructs expressing HA-C-YFP-Fu-WT, Smo-WT-N-YFP-Myc and Ptc were transfected in S2R+ treated or not with Hh. Cell lysates were immunoprecipitated with an antibody against HA, and the presence of Smo was detected with a Myc antibody by Western Blot. The comparison between lanes 2 and 4 shows a similar level of Smo associated with Fu.

Suppl. Figure 7: The catalytic domain of Fu forms a stable complex with its regulatory domain

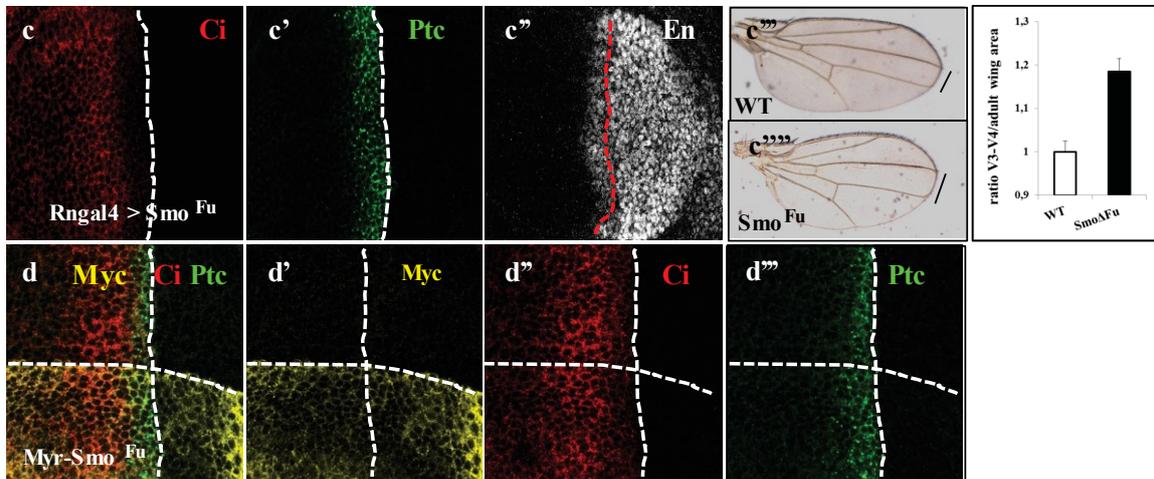
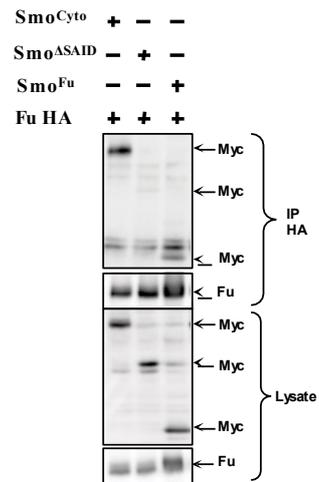
(a) Schematic representation of Fu-WT and Fu variants with various deletions of its regulatory domain. (b) Cells were transfected with indicated constructs (described in a) in presence of Fu-Cat and Cos2, and the extracts were analyzed for Cos2 phosphorylation. (c-d) After transfection with the indicated constructs, the Fu-Reg P6 (c) or Fu-Reg P1 (d) immunoprecipitates were analyzed for the presence of Fu-Cat (c) or Fu-Cat and Smo^{Cyto} (d). (e) Schematic representation of Fu-WT and Cos2-WT constructs used for the BiFC experiments. S2R+ cells were transfected with N-YFP-Fu-WT and Cos2-C-YFP. The graph represents the BiFC analysis between the Fu-WT and Cos2-WT upon Hh treatment as indicated. (f) S2R+ cells transfected with N-YFP-Fu-Cat and Cos2-C-YFP in absence of Fu-Reg. The graph represents the BiFC analysis between Fu-Cat and Cos2 in presence of transfected Smo, Gprk2 and PKA.

Giordano et al., Suppl. Figure 1

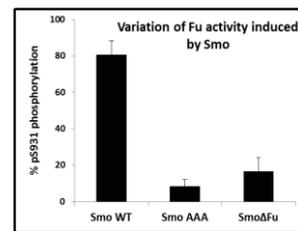
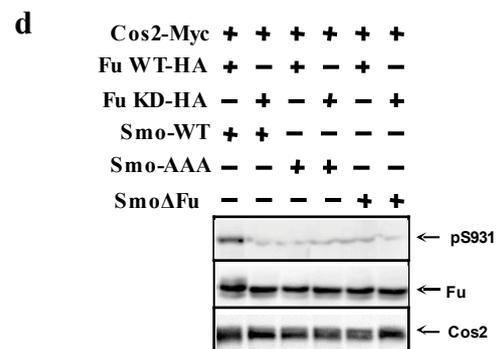
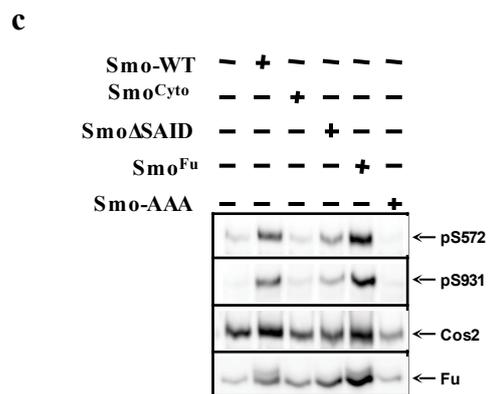
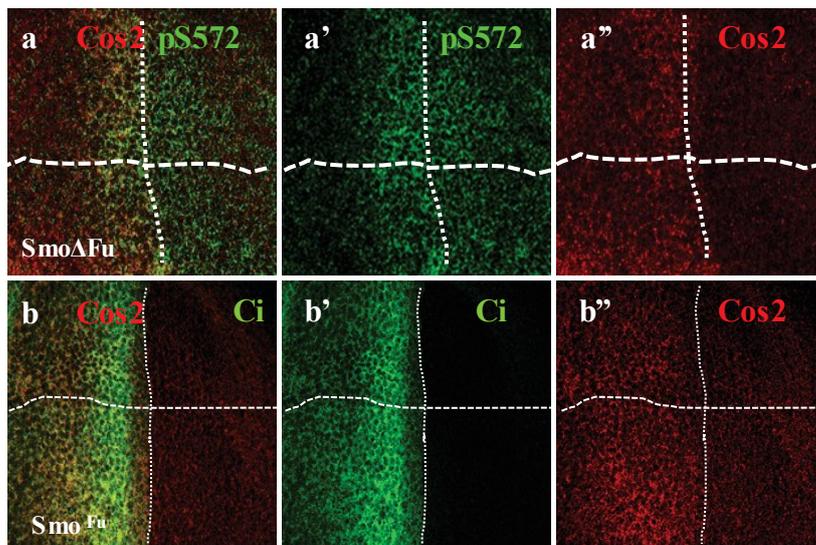
a



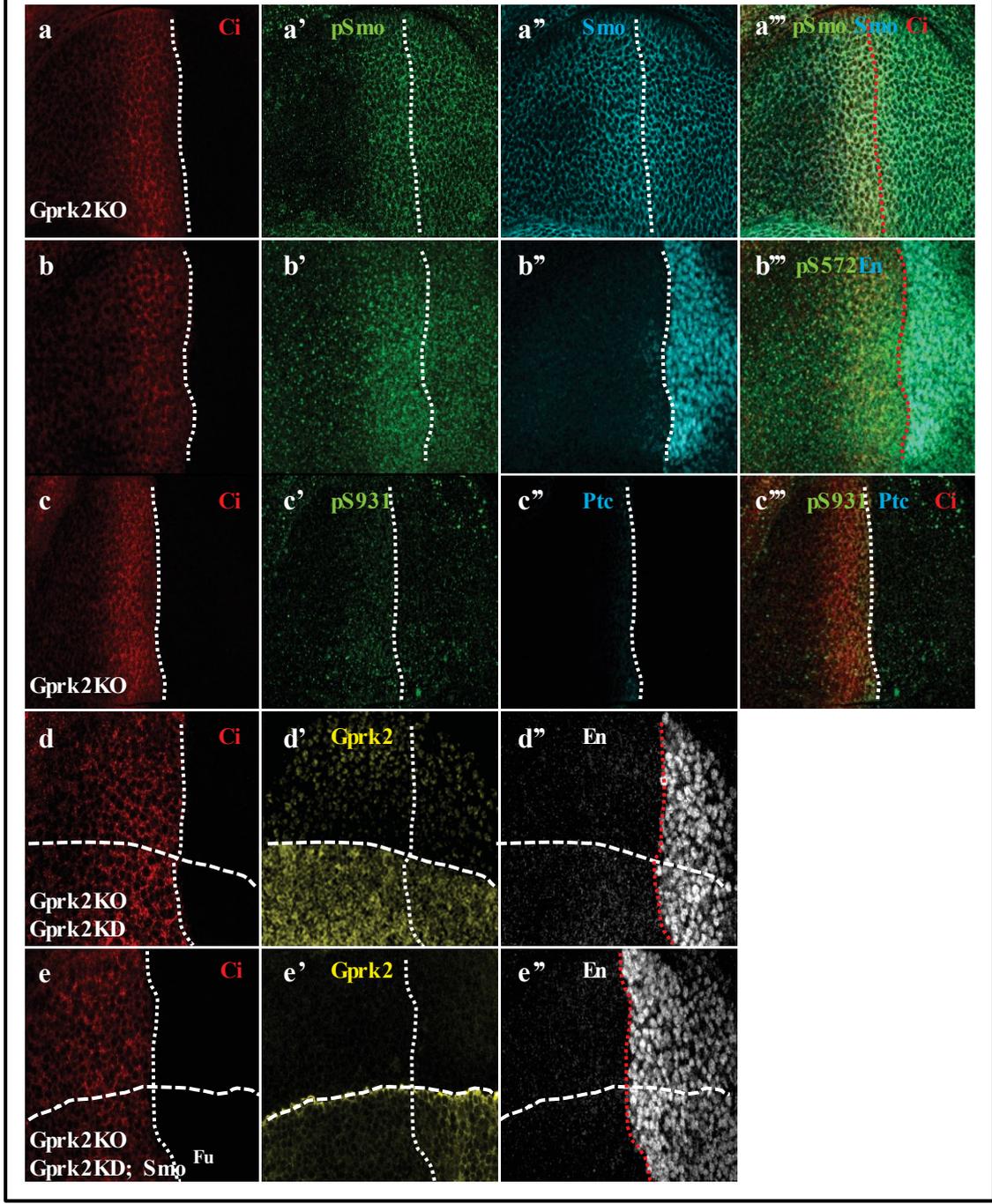
b



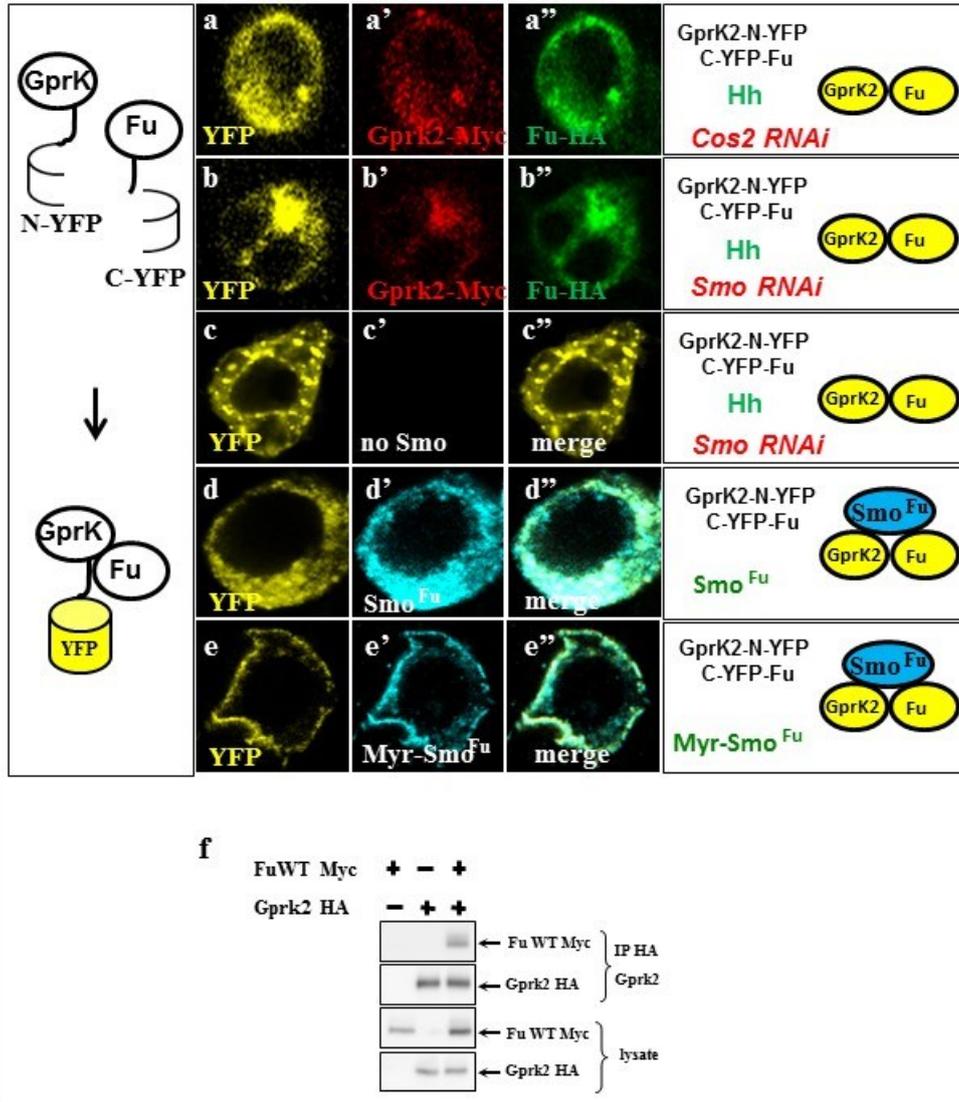
Giordano et al., Suppl. Figure 2



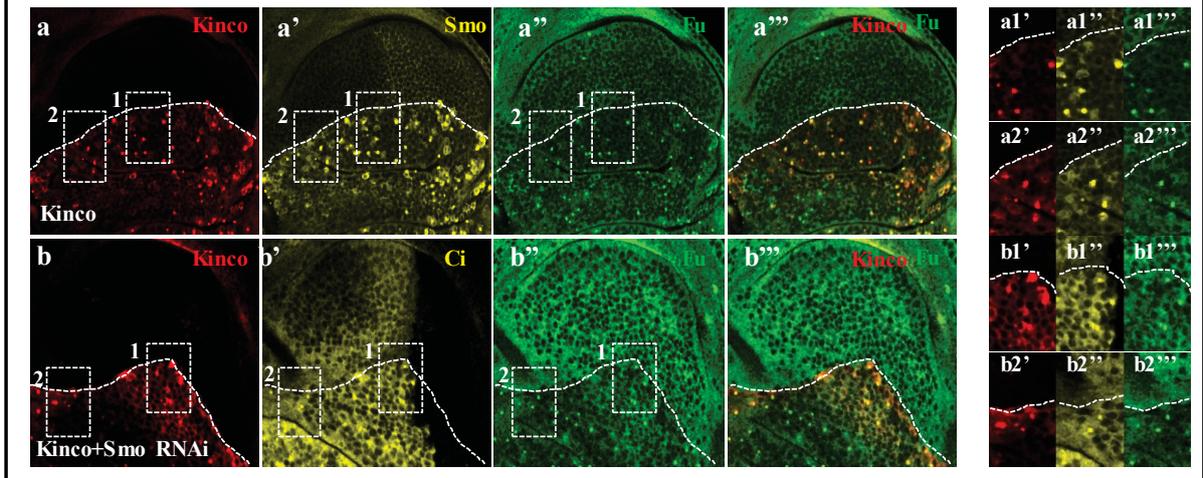
Giordano et al., Suppl. Figure 3



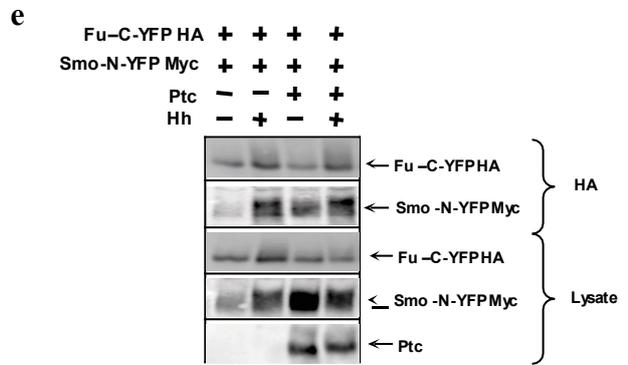
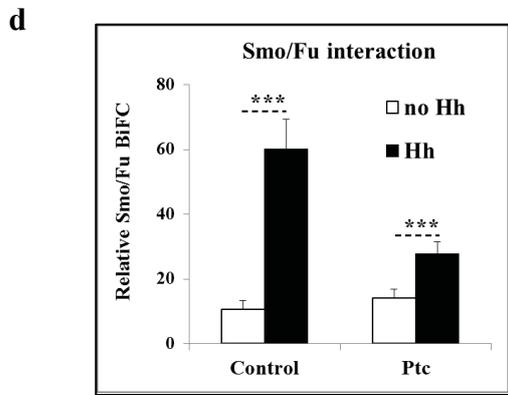
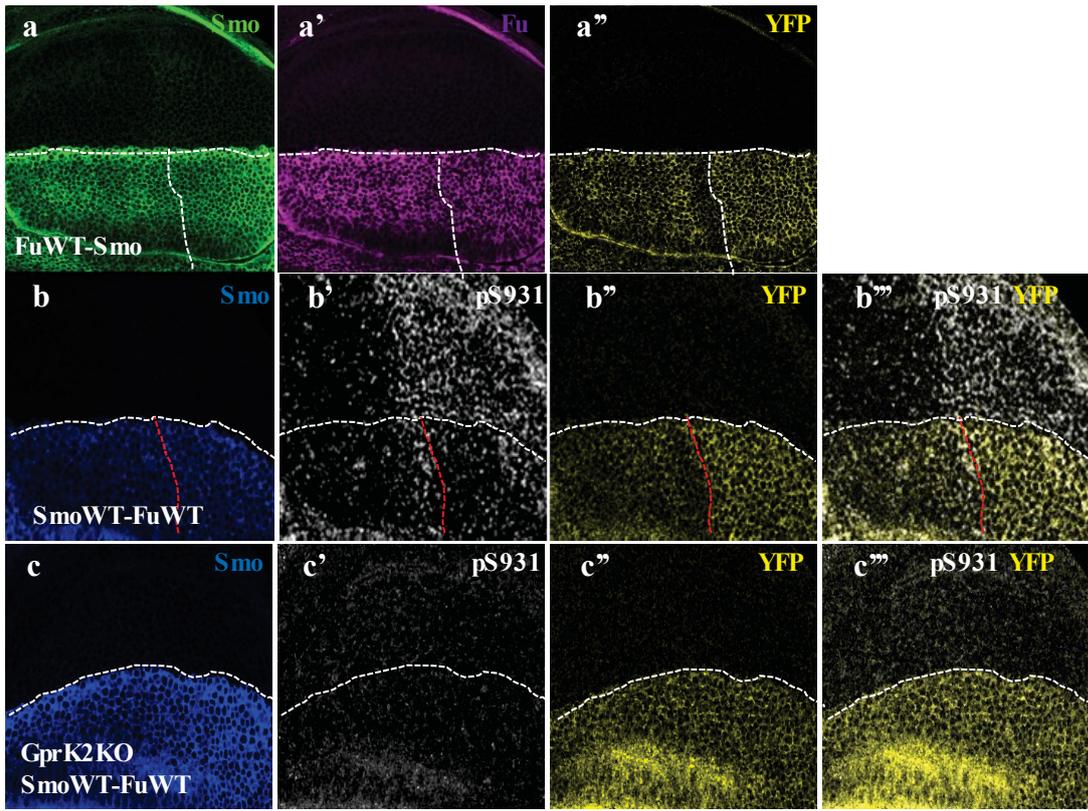
Giordano et al., Suppl. Figure 4



Giordano et al., Suppl. Figure 5



Giordano et al., Suppl. Figure 6



Material and Methods

Fly stocks

Transgenic flies were as follows: UAS-Smo-N-YFP, UAS-C-YFP-Fu-KD; UAS-C-YFP-Fu-WT; UAS-C-YFP-Fu-EE; UAS-Kinco-HA (Zhang et al. 2005), UAS-Smo Δ Fu (Malpel et al. 2007), UAS-Smo^{Fu}, UAS-Smo^{Cyto}, UAS-Smo^{SAID-Fu}, *gprk2*KO (Cheng et al. 2010). UAS transgenics for expression of YFP fusion protein or for Smo deletion variants were obtained by germline transformation using the phi31-intergrase into the landing site 68E1 (chromosome 3L) or 58A3 (chromosome 2R) (BestGene). The UAS-Smo dsRNA, UAS-Gprk2 dsRNA lines were obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC). The *w1118*, *apterous-Gal4* (*apt-Gal4*), *rotund-Gal4* (*rn-Gal4*), UAS-Dicer2 lines were provided by the Bloomington Drosophila Stock Center. Clones were generated as described (Ruel et al. 2003). The Fu-KD is an inactive version of the Fu kinase with a substitution of Gly13 by Val in the ATP-binding site (Raisin et al., 2012). The Fu-EE construct expresses a constitutively activated Fu kinase (Zhou and Kalderon, 2011).

Immunostaining and microscopy

Primary antibodies were used at the following dilutions: mouse monoclonal anti-Smo 1:200 (20C6, DSHB), rabbit polyclonal anti-Cos2 1:500 (Ruel et al. 2003), monoclonal 2A1 rat anti-Ci155 1:10 (gift from R. Holmgren), rabbit polyclonal anti-Fu 1:200 (Ruel et al. 2003), rabbit polyclonal anti-Smo 1:200 (Ruel et al. 2003), rabbit polyclonal anti-Cos2 1:500 (Ruel et al. 2003), mouse monoclonal anti-Ptc 1:200 (5E10, DSHB), mouse monoclonal anti-En 1:400 (4D9, DSHB), rabbit polyclonal anti-En 1:1000 (Santa Cruz) rat monoclonal anti-HA 1:1,000 (Roche), mouse monoclonal anti-HA 1:25 (home-made), rabbit polyclonal anti-Myc 1:100 (Santa-cruz), anti-pSer572-Cos2 1:400 (Ranieri et al. 2012), anti-pSer931-Cos2 1:250 (Ranieri et al. 2012) and guinea pig monoclonal anti-gprk2 1:1000 (Cheng et al. 2010). Secondary antibodies coupled with fluorescent Alexa 405, 488, 568 and 647 (Molecular Probes) were used at a dilution of 1:400. Images were captured with a Leica TCS SP5 confocal microscope and analyzed with Image J software. Plots were analyzed as described by Raisin et al. 2010.

Cell culture, transfections and cDNA constructs

Drosophila Schneider line-2R+ (S2R+) cells, were maintained as described in (Ruel et al. 2007). To construct the different mutant forms of Smo (Smo Δ SAID, SmoFu and SmoCyto), cDNA fragments with Smo coding sequences at amino-acid position 555-1036 (SmoCyto), 818-1036 (Smo Δ SAID) and 985-1036 (SmoFu) were amplified by PCR and cloned using Gateway technology (Invitrogen) in pUAST-Myc in frame with the Myc epitope. For expression in S2R+ cells, Smo, Fu, GprK2 and Cos2 coding regions were inserted into the pUAST-BiFC vectors that have been described by Gohl et al. 2010. The following constructs were described in Ranieri et al. 2014: Smo-WT-Myc, Smo-AAA-Myc, Fu-WT-HA, Fu-KD-HA, Fu-WT-Myc and Cos2-Myc. For various "tag" constructs, PKA, Fu, Cos2, Gprk2 and Smo were

amplified by PCR and cloned by Gateway technology (Invitrogen) in different pUAST vectors from Carnegie Institution for Science.

The sequences of the dsDNAs used are described at <http://www.flyrnai.org/> and RNAi was produced in vitro from PCR products, using T7 polymerase. RNAi transfection into S2R+ cells was performed as previously described (Ruel et al. 2007).

For transient gene expression, the corresponding UAS constructs were co-transfected with an actin5C-Gal4 (Act-Gal4) construct in S2 R+ cells. Transfections were carried out using Lipofectamine LTX (Invitrogen). For a total of 2 µg DNA, 50 ng to 0.2 µg DNA for each expression vector, with 1 µg of Act-Gal4 was used in a typical transfection using 10 µl of Lipofectamine. Immunofluorescence, Immunoprecipitation and western blot analysis

Immunofluorescence (IF), Immunoprecipitation (IP) and Western blot (WB) analyses

For IP and WB analyses, cells were lysed 2 days after transfection in lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl and 1% Triton) in the presence of phosphatase inhibitors (50 mM sodium fluoride and 10 mM sodium orthovanadate) and protease inhibitors. Various HA or Myc constructs were precipitated with a mouse anti-HA or anti-Myc antibody as described previously (Ranieri et al. 2012) and immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE. WBs were performed with antibodies against Smo, Gprk2, Fu, Cos2, Ptc, HA and Myc as described by Ranieri et al. 2012. The pSer572-Cos2 and anti-pSer93-Cos2 were used at 1:250 for WB.

IF: transfected S2 R+ cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and incubated with primary antibody for 16 hours at room temperature, followed by secondary antibody staining. To quantify fluorescence complementation, cells were transfected with plasmids encoding the two fusion proteins, together with a control plasmid (RFP). The relative ratio of YFP and RFP fluorescence gave a measure of the relative efficiency of the complex formation. For all BiFC quantification experiments between 150 and 200 cells were analyzed (Ranieri et al. 2012).

Acknowledgements

We thank all “fly” members of the IBV Institute and Laurence Staccini-Lavenant for various helps. C.G. held a PhD fellowship from MRT and ARC. This work was supported by a grant from Ligue National and Contre le Cancer “Equipe labellisée 2016” to P.P.T. This work was supported by the French Government (National Research Agency, ANR).

Author contributions

All authors contributed to the experimental design and data interpretation. C.G. and L.R. performed the experiments. P.T. and L.R. planned the project and wrote the paper.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- Aikin, R. A., Ayers, K. L., and Thérond, P. P. (2008). The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Reports* 9, 330–336.
- Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of Hh target gene in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the Gli family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes and Development* 10, 2003–2013.
- Apionishev, S., Katanayeva, N. M., Marks, S. A., Kalderon, D., & Tomlinson, A. (2005). *Drosophila* Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nature Cell Biology*, 7(1), 86–92.
- Ascano, M., and Robbins, D. J. (2004). An intramolecular association between two domains of the protein kinase Fused is necessary for Hedgehog signaling. *Molecular and Cellular Biology* 24, 10397–10405.
- Athar, M., Li, C., Kim, A. L., Spiegelman, V. S., and Bickers, D. R. (2014). Sonic Hedgehog Signaling in Basal Cell Nevus Syndrome. *Cancer Res.* 74, 4967–4975.
- Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F.A., Laget, M.P., Schwartz, C., and Kornberg, T.B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89, 1043-1053.
- Briscoe, J., and Thérond, P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 418–431.
- Chen, C.H., von Kessler, D.P., Park, W., Wang, B., Ma, Y., and Beachy, P.A. (1999). Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* 98, 305-316.
- Chen, Y., Li, S., Tong, C., Zhao, Y., Wang, B., Liu, Y., and Jiang, J. (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 and Development* 24, 2054–2067.
- Cheng, S., Maier, D., Neubueser, D., and Hipfner, D.R. (2010). Regulation of Smoothed by

Drosophila G-protein-coupled receptor kinases. *Dev Biol.* 337, 99-109.

Claret, S., Sanial M., and Plessis, A. (2007). Evidence for a novel feedback loop in the Hedgehog pathway involving Smoothened and Fused. *Curr. Biol.* 17,1326-1333.

Fan, J., Liu, Y., and Jia, J. (2012). Hh-induced Smoothened conformational switch is mediated by differential phosphorylation at its C-terminal tail in a dose- and position-dependent manner. *Developmental Biology* 366, 172–184.

Gohl, C., Banovic, D., Grevelhörster, A., and Bogdan, S. (2010). WAVE forms hetero- and homo-oligomeric complexes at integrin junctions in *Drosophila* visualized by bimolecular fluorescence complementation. *Journal of Biological Chemistry* 285, 40171–40179.

Hooper, J.E., and Scott, M.P. (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.

Ingham, P. W. (2016). *Drosophila* segment polarity mutants and the rediscovery of the Hedgehog pathway genes. *Current Topics in Developmental Biology* 116, 477-488.

Jia, H., Liu, Y., Xia, R., Tong, C., Yue, T., Jiang, J., and Jia, J. (2010). Casein kinase 2 promotes Hedgehog signaling by regulating both smoothened and Cubitus interruptus. *Journal of Biological Chemistry* 285, 37218–37226.

Jia, J. (2012). Phosphorylation regulation of Hedgehog signaling. *Vitamins and Hormones* 88, 253-272.

Jia, J., Tong, C., and Jiang, J. (2003). Smoothened transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes and Development* 17, 2709–2720.

Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., and Jiang, J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432, 1045–1050.

Jia, J., Zhang, L., Zhang, Q., Tong, C., Wang, B., Hou, F., and Jiang, J. (2005). Phosphorylation by double-time/CKIepsilon and CKIalpha targets cubitus interruptus for Slimb/beta-TRCP-mediated proteolytic processing. *Developmental Cell* 9, 819–830.

Jiang, K., Liu, Y., Fan, J., Epperly, G., Gao, T., Jiang, J., and Jia, J. (2014). Hedgehog-regulated atypical PKC promotes phosphorylation and activation of Smoothened and Cubitus interruptus in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 4842–4850.

Li, S., Chen, Y., Shi, Q., Yue, T., Wang, B., and Jiang, J. (2012). Hedgehog-regulated ubiquitination controls smoothened trafficking and cell surface expression in *Drosophila*. *PLoS Biology* 10, 1–15.

Li, S., Li, S., Han, Y., Tong, C., Wang, B., Chen, Y., and Jiang, J. (2016). Regulation of Smoothened phosphorylation and high-Level Hedgehog signaling activity by a plasma membrane associated kinase. *PLoS Biology* 14, 1–24.

Li, S., Ma, G., Wang, B., and Jiang, J. (2014). Hedgehog induces formation of PKA-Smoothened complexes to promote Smoothened phosphorylation and pathway activation. *Sci Signal* 23, 1079–1084.

Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R.K., von Kessler, D.P., Taipale, J., Weis-Garcia, F., Gong, R., Wang, B., and Beachy P.A. (2003). Hedgehog signal transduction via Smoothened association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Mol. Cell* 12, 1261-1274.

- Malpel, S., Claret, S., Sanial, M., Brigui, A., Piolot, T., Daviet, L., and Plessis, A. (2007). The last 59 amino acids of Smoothened cytoplasmic tail directly bind the protein kinase Fused and negatively regulate the Hedgehog pathway. *Developmental Biology* 303, 121–133.
- Méthot, N., and Basler, K. (1999). Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Cell* 96, 819–831.
- Monnier, V., Dussillol, F., Alves, G., Lamour-Isnard, C., and Plessis, A. (1998). Suppressor of fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Current Biology* 8, 583–586.
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J.R., Ingham P.W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the Drosophila segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508–513.
- Nybakken, K. E., Turck, C. W., Robbins, D. J., and Michael Bishop, J. (2002). Hedgehog-stimulated phosphorylation of the kinesin-related protein Costal2 is mediated by the serine/threonine kinase Fused. *Journal of Biological Chemistry* 277, 24638–24647.
- Ogden, S. K., Ascano, Jr., M., Stegman, M. A., Suber, L. M., Hooper, J. E., and Robbins, D. J. (2003). Identification of a Functional Interaction between the Transmembrane Protein Smoothened and the Kinesin-Related Protein Costal2. *Current Biology* 11, 1998–2003.
- Préat, T., Théron, P., Lamour-Isnard, C., Limbourg-bouchon, B., Tricoire, H., Erk, I., ... Busson, D. (1990). A putative serine/Threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of Drosophila. *Nature*, 374, 87-89.
- Price, M.A., and Kalderon, D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* 108, 823-835.
- Raisin, S., Ruel, L., Ranieri, N., Staccini-Lavenant, L., and Théron, P.P. (2010). Dynamic phosphorylation of the kinesin Costal-2 *in vivo* reveals requirement of Fused kinase activity for all levels of hedgehog signalling. *Developmental Biology* 344, 119–128.
- Ranieri, N., Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., and Théron, P.P. (2012). Distinct phosphorylations on kinesin Costal-2 mediate differential Hedgehog signaling strength. *Developmental Cell* 22, 279–294.
- Ranieri, N., Théron, P.P., and Ruel, L. (2014). Switch of PKA substrates from Cubitus interruptus to Smoothened in the Hedgehog signalosome complex. *Nature Communications* 5, 5034.
- Robbins, D.J., Fei, D.L., and Riobo N.A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 5, re6.
- Robbins, D.J., Nybakken, K.E., Kobayashi, R., Sisson, J.C., Bishop, J.M., and Théron, P.P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein Costal2. *Cell* 90, 225–234.
- Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., Truchi, A., Staccini-Lavenant, L., Cervantes, A., and Théron, P.P. (2007). Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothened-Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development* 134, 3677–3689.
- Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L., and Théron, P.P. (2003). Stability and association of Smoothened, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog.

Nature Cell Biology 5, 907–913.

Sanial, M., Bécam, I., Hofmann, L., Behague, J., Argüelles, C., Gourhand, V., Bruzzone, L., Holmgren, R.A., and Plessis, A. (2017). Dose-dependent transduction of Hedgehog relies on phosphorylation-based feedback between the G-protein-coupled receptor Smoothened and the kinase Fused. *Development* 144,1841-1850.

Scales, S. J., and de Sauvage, F.J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 303–312.

Shyu, Y.J., and Hu, C.D. (2008). Fluorescence complementation: an emerging tool for biological research. *Trends in Biotechnology* 26, 622–630.

Sisson, J.C., Ho, K.S., Suyama, K., and Scott, M.P. (1997). Costal2, a novel kinesin related protein in the Hedgehog signaling pathway. *Cell* 90, 235–245.

Smelkinson, M.G., and Kalderon, D. (2006). Processing of the Drosophila Hedgehog signaling effector Ci-155 to the repressor Ci-75 is mediated by direct binding to the SCF component Slimb. *Current Biology* 16, 110–116.

Smelkinson, M.G., Zhou, Q., and Kalderon, D. (2007). Regulation of Ci-SCFSlimb binding, Ci proteolysis, and Hedgehog pathway activity by Ci phosphorylation. *Developmental Cell* 13, 481–495.

Tian, L., Holmgren, R.A., and Matouschek, A. (2005). A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB. *Nat Struct Mol Biol.* 12, 1045-53.

Wang, G., Amanai, K., Wang, B., and Jiang J. (2000). Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus. *Genes Dev.* 14, 2893-2905.

Wang, Q.T., and Holmgren R.A. (1999). The subcellular localization and activity of Drosophila cubitus interruptus are regulated at multiple levels. *Development* 126, 5097-5106.

Whittington, T., Jolma, A., and Taipale, J. (2011). Beyond the Balance of Activator and Repressor. *Science Signaling* 4, pe29.

Xia, R., Jia, H., Fan, J., Liu, Y., and Jia, J. (2012). USP8 promotes smoothened signaling by preventing its ubiquitination and changing its subcellular localization. *PLoS Biology* 10, 1–16.

Zhang, C., Williams, E.H., Guo, Y., Lum, L., and Beachy, P.A. (2004). Extensive phosphorylation of Smoothened in Hedgehog pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17900–17907.

Zhang, W., Zhao, Y., Tong, C., Wang, G., Wang, B., Jia, J., and Jiang, J. (2005). Hedgehog-regulated Costal2-kinase complexes control phosphorylation and proteolytic processing of Cubitus interruptus. *Developmental Cell* 8, 267–278.

Zhao, Y., Tong, C., and Jiang, J. (2007). Hedgehog regulates Smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* 450, 252–258.

Zhou, Q., Apionishev, S., and Kalderon, D. (2006). The contributions of protein kinase A and smoothened phosphorylation to hedgehog signal transduction in Drosophila melanogaster. *Genetics* 173, 2049-2062.

Zhou, Q., and Kalderon, D. (2011). Hedgehog activates Fused through phosphorylation to elicit a full spectrum of pathway responses. *Developmental Cell* 20, 802–814.

Chapitre 2 : Le rôle des protéines Fu, PKA et Smo dans la formation d'un complexe répresseur ou un complexe activateur

Ce projet a été réalisé avec Sonia Coni (ancienne chercheuse post-doctorante du laboratoire).

Introduction

En absence d'Hh, et au sein du complexe répresseur, les protéines Fu et Cos2 agissent comme une plateforme en rapprochant la kinase, PKA, de son substrat, Ci (Ranieri et al., 2014). La phosphorylation de Ci par la PKA (Chen et al., 1998) permet la dégradation partielle de Ci, aboutissant à la formation du Ci-Rep (Jian and Struhl, 1998). En présence d'Hh, les variations de l'intensité du signal sont traduites par une activation différentielle de Smo. Les formes plus ou moins actives de Smo sont la résultante de phosphorylations dans sa partie C-terminale (Zhang et al., 2004) qui entraînent des changements de conformation et la dimérisation de cette région (Zhao et al., 2007 ; Chen et al., 2010). L'état d'activation de Smo est alors transmis au complexe de transduction par son interaction avec Fu, dont le niveau d'activation est corrélé avec celui de Smo (Sanial et al. 2017). Les phosphorylations différentielles de Cos2, sur la sérine 572 pour de faibles doses d'Hh et la sérine 931 pour de fortes concentrations d'Hh, sont un moyen de suivre, d'une part, le niveau d'activation de la kinase Fu et d'autre part, de visualiser deux complexes activateurs dépendant des niveaux d'Hh (Ranieri et al., 2012).

Dans le mécanisme de transduction, le complexe cytoplasmique, composé essentiellement des mêmes protéines durant la signalisation Hh, joue un rôle fondamental en permettant soit la formation du Ci-Rep, en absence d'Hh, soit la formation d'un Ci-155 ou d'un Ci-Act en présence d'Hh. Des changements de conformation au sein de ce complexe définissent le rôle répresseur ou activateur de ce dernier. De ce fait, dans ce complexe, toutes les protéines peuvent avoir une dualité de fonction en agissant comme des régulateurs négatifs du signal en absence d'Hh ou positifs en présence d'Hh. Par exemple, en absence d'Hh, Cos2 est essentiel à la formation du Ci-Rep en rapprochant Ci des kinases PKA, CK1 et GSK3 (Zhang et al. 2004). En présence d'Hh, Cos2 agit positivement en interagissant avec Smo (Ruel et al., 2003 ; Lum et al., 2003), apportant ainsi le complexe de transduction à la membrane plasmique, où a lieu son activation maximale. La PKA est également nécessaire à la formation du Ci-Rep, mais aussi un rôle primordial dans le mécanisme d'activation de Smo, régulateur positif de la voie Hh. En effet, même si le passage d'un complexe répresseur à un activateur reste à être élucidé, il est admis que la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo (Ranieri et al., 2014) est la première étape dans cette transition.

Au laboratoire, nous avons émis l'hypothèse que l'entrée de Smo dans le complexe cytoplasmique est probablement responsable de changements de conformation dont la fonction prioritaire est d'activer la kinase Fu et de transmettre cette activation à Ci. Ainsi, à

l'instar des autres protéines du complexe, Fu a une fonction négative, en apportant la PKA vers Ci (Ranieri et al., 2014) et aurait un rôle positif, que je vais tenter de démontrer dans le chapitre suivant, en permettant la formation du Ci-Act. La compréhension du mécanisme par lequel le signal Hh permet le développement du complexe activateur à partir du complexe répresseur s'avère essentiel, et ceci a été le but de mon projet que je vais maintenant décrire.

Résumé

Afin d'étudier comment s'effectue la transition d'un complexe répresseur à un complexe activateur, j'ai d'abord focalisé mon attention sur le rôle de la protéine Fu dans le mécanisme d'activation de la voie. Par des analyses *in vitro* et *in vivo*, nous avons pu montrer que l'activation de la kinase Fu en présence d'Hh est nécessaire à la phosphorylation de Ci et à l'activation des gènes cibles. Grâce à l'utilisation de la technique de BiFC, nous avons ensuite visualisé une action opposée d'Hh sur les interactions PKA/Ci et Fu/Ci. En effet, la présence d'Hh entraîne la réduction de l'interaction entre la PKA et Ci, localisée en C-terminal de Ci, au profit de l'interaction entre la PKA et Smo, et ceci indépendamment de l'activité kinase de Fu. Nous avons révélé un nouveau domaine de liaison de Fu sur Ci, situé dans l'extrémité N-terminal de Ci. L'analyse en BiFC indique que le signal Hh induit une augmentation de l'interaction entre Fu et Ci dans ce domaine. En effet, le découpage de la protéine Ci en deux fragments, appelé N et C terminaux, nous a permis de montrer qu'Hh induit une relocalisation du complexe de transduction, par l'intermédiaire de Fu, de la partie C-terminale à la partie N-terminale de Ci, où se trouvent des sites putatifs de phosphorylation de Fu sur Ci que nous avons identifiés.

L'ensemble de nos résultats suggère un modèle dans lequel les protéines Fu/PKA/Smo ont un rôle majeur dans la transition entre un complexe répresseur et un complexe activateur. Nous émettons l'hypothèse que les multiples changements de conformations qui se déroulent au sein du complexe en présence d'Hh, visent à rapprocher la kinase Fu de son substrat Ci. La conséquence finale de cette association est la formation du Ci-act, probablement par phosphorylation directe de Ci par Fu, et l'activation des gènes cibles de la voie Hh.

Matériels et Méthodes

Génétiques

Mouches transgéniques : UAS-HA-C-YFP-Fu-KD, UAS-HA-C-YFP--Fu-WT, UAS-HA-C-YFP-Fu-EE, UAS-Myc-N-YFP-Ci-WT, UAS-Smo-Myc-N-YFP, UAS-ARNi-Smo (centre stock de Vienne). La Fu-KD est une version inactive de l'activité kinase de Fu où la valine en position 23 a été substituée par une glycine dans le site de liaison à l'ATP (don d'Ingham). La Fu-EE est une forme constitutivement activée de Fu dans laquelle les thréonines situées en positions 151 et 154 ont été remplacées par de l'acide aspartique (Zhou et Kalderon, 2011).

Immunofluorescence et Microscopie

Les anticorps primaires ont été utilisés avec les dilutions suivantes : anti-HA souris 1/25^{ème} (maison), anti-Myc lapin 1/100^{ème} (Santa Cruz), anti-Flag souris 1/400^{ème} (M2, Sigma), anti-Flag lapin 1/200^{ème} (Thermo Fisher Scientific), anti-V5 souris 1/400^{ème} (invitrogen), anti-V5 lapin 1/200^{ème} (Sigma), anti-Ci Rat 1/10^{ème} (2A1), anti-Ptc souris 1/200^{ème} (5E10, DSHB), anti-En lapin 1/1000^{ème} (invitrogen), anti-En souris 1/400^{ème} (4D9, DSHB), anti-Smo lapin 1/200^{ème} (20C6, DSHB), anti-p-572-Cos2 1/400^{ème} (Ruel et al., 2007). La même dilution a été appliquée pour les anticorps secondaires 1/400^{ème} : anti-lapin Alexa647/568/488/405, anti-rat Alexa 647/568/488/405, anti-souris Alexa 647/568/488/405. L'acquisition des images s'est faite par microscopie confocale avec le Leica TCS SP5, et leurs analyses ont été traitées en utilisant le logiciel Image J. La quantification des niveaux de la YFP, ainsi que de l'expression des gènes cibles *in vivo*, ont été réalisées comme dans le papier de Raison et al., 2010. *In vitro*, les taux de CFP ou YFP ont été normalisés avec de la RFP, et la quantification a été menée comme décrit dans le papier de Ranieri et al., 2014.

Culture cellulaire, transfection et plasmides

Les lignées cellulaires Schneider 2 de drosophile (S2R+), de S2R+ exprimant Hh, de Cl-8, issues du disque imaginal de l'aile et Cl8 exprimant Hh ont été cultivées suivant le protocole de Ruel et al., 2007. Les protéines Fu, Cos2, Ci, PKA et Smo fusionnées avec différents tags (Flag, HA, Myc, GFP, CFP) ou avec les fragments utilisés pour la BiFC, ont été obtenues en clonant leurs ADN complémentaires via le système Gateway (invitrogen) dans des vecteurs d'expressions contenant les séquences UAS. Une description détaillée de l'utilisation de la technique de BiFC a été réalisée dans le papier de Ranieri et al., 2014. De manière générale, l'expression transitoire des protéines fusionnées à des tags « classiques » ou permettant de faire de la BiFC, est permise par la co-expression des vecteurs UAS avec un vecteur exprimant de l'actin5C-Gal4. Les transfections sont réalisées avec de la lipofectamine LTX selon les recommandations des fabricants.

Expression d'ARNi en cellules

L'ARN double brin a été généré *in vitro* à partir des produits de PCR avec la T7 polymérase. La production de l'ARNi ainsi que son expression dans les cellules en culture de *Drosophila* a été décrites dans la papier de Ruel et al., 2007.

Immunoprécipitation et Western Blot

Pour les expériences d'immunoprécipitations, un vecteur d'actin-Gal4 est co-transfecté avec les vecteurs UAS désirés. Après 3 jours d'expression, les cellules sont lysées avec du tampon triton 1% (25mMTris-pH8, 150mM NaCl et 1% Triton) auquel des inhibiteurs de phosphatases et de protéases sont ajoutés. Les extraits cellulaires sont dosés, puis les protéines d'intérêts sont immunoprécipitées grâce aux tags qu'elles contiennent (HA ou Myc) comme décrit par Ranieri et al. 2012. Les complexes immunoprécipités sont ensuite visualisés en Western Blot.

Pour l'analyse par Western Blot, les cellules transfectées ou non transfectées sont lysées dans un tampon RIPA (50mMTris-pH8, 150mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS et 0,1% d'acide deoxycholique), en présence d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases. Les westerns blots ont été réalisés en suivant le protocole de Ruel et al., 2007. Les anticorps anti- α Tub mouse 1/1000 (Sigma) et anti-GMAP lapin 1/200^{ème} (fabriqué au laboratoire) ont été utilisés comme contrôle de charge.

Activité luciférase

Pour mesurer l'activité rapportrice du Ptc luciférase, les Cl8 sont traitées ou non avec Hh et transfectées avec 1 μ g de *ptc*-luciférase, 10ng de pAct Renilla (normalisateur de la transfection), et des quantités variables de Ci-WT ou mutants comme indiquées dans l'expérience. Chaque condition est réalisée en quatre exemplaires, et le protocole utilisé pour mesurer les activités luciférase et rénilla est indiqué dans le kit de Proméga.

Résultats

L'activité kinase de Fused est nécessaire à l'activation de Ci et des gènes cibles

Etant donné la perte d'expression des gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh dans des mutants *fu* dépourvus d'activité kinase, nous avons décidé d'étudier l'influence de l'activité kinase de Fu sur l'activation de Ci *in vitro* et des gènes cibles de la voie Hh *in vivo*. J'ai d'abord transfecté les différentes isoformes de Fu avec Ci dans des cellules S2R+ et analysé l'état de phosphorylation de Ci (Fig. 37a). Une forme constitutivement activée (Fu-EE) conduit à un retard de migration sur gel de Ci, révélateur d'une modification post-traductionnelle qui est probablement une phosphorylation, comme on peut le voir dans la Fig. 37c. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'absence de cette phosphorylation en présence d'une forme inactive de Fu (Fu-KD ; Fig. 37a, b, c, d). De plus, des traitements à l'acide okadaïque, inhibiteur de phosphatase, augmentent le retard de migration de Ci, suggérant que l'effet de Fu sur Ci passe *via* des phosphorylations. Il est à noter que l'activation de la kinase Fu peut être suivie par son autophosphorylation puisqu'une Fu-EE est sous deux états phosphorylés différents, visibles par deux bandes sur les différents western blot de la Fig. 37.

Pour aller plus loin, nous avons regardé l'effet d'Hh sur la phosphorylation de Ci par Fu. Il a été montré que sous l'effet d'Hh, la kinase Fu est phosphorylée (Thérond et al. 1996), et cette phosphorylation est responsable de son activation, visible par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de Ci (Fukomoto et al. 2001). L'analyse de Ci dans des cellules qui expriment une forme sauvage de Fu, traitées ou non pour Hh, indique que l'activation de Fu est nécessaire à la phosphorylation de Ci, puisque Ci est phosphorylé par Fu uniquement en présence d'Hh (Fig. 37c : puit 4 comparé au puit 2). Sachant que la présence d'Hh induit la stabilisation et l'activation de Smo à la membrane plasmique, nous avons ensuite regardé l'effet de Smo sur la phosphorylation de Ci. De manière intéressante, la phosphorylation de Ci par une Fu sauvage semble être réduite lorsque les cellules expriment une forme de Smo non phosphorylable et donc non activée (Smo-AAA ; Fig. 37d : puit 4), comparées à des cellules qui expriment une forme sauvage de Smo (Smo-WT ; Fig. 37d : puit 1). Ceci laisse à penser que l'activation de Fu par Hh passe par Smo, ce qui est en accord avec les publications de Zhou et Kalderon, 2011 et Sanial et al., 2017. Pour confirmer définitivement l'impact de Smo sur l'activation de Ci par phosphorylation due à la kinase Fu, nous avons envisagé de reconstituer le complexe Smo/Fu/Cos/Ci dans un système hétérologue, le système d'expression Baculovirus.

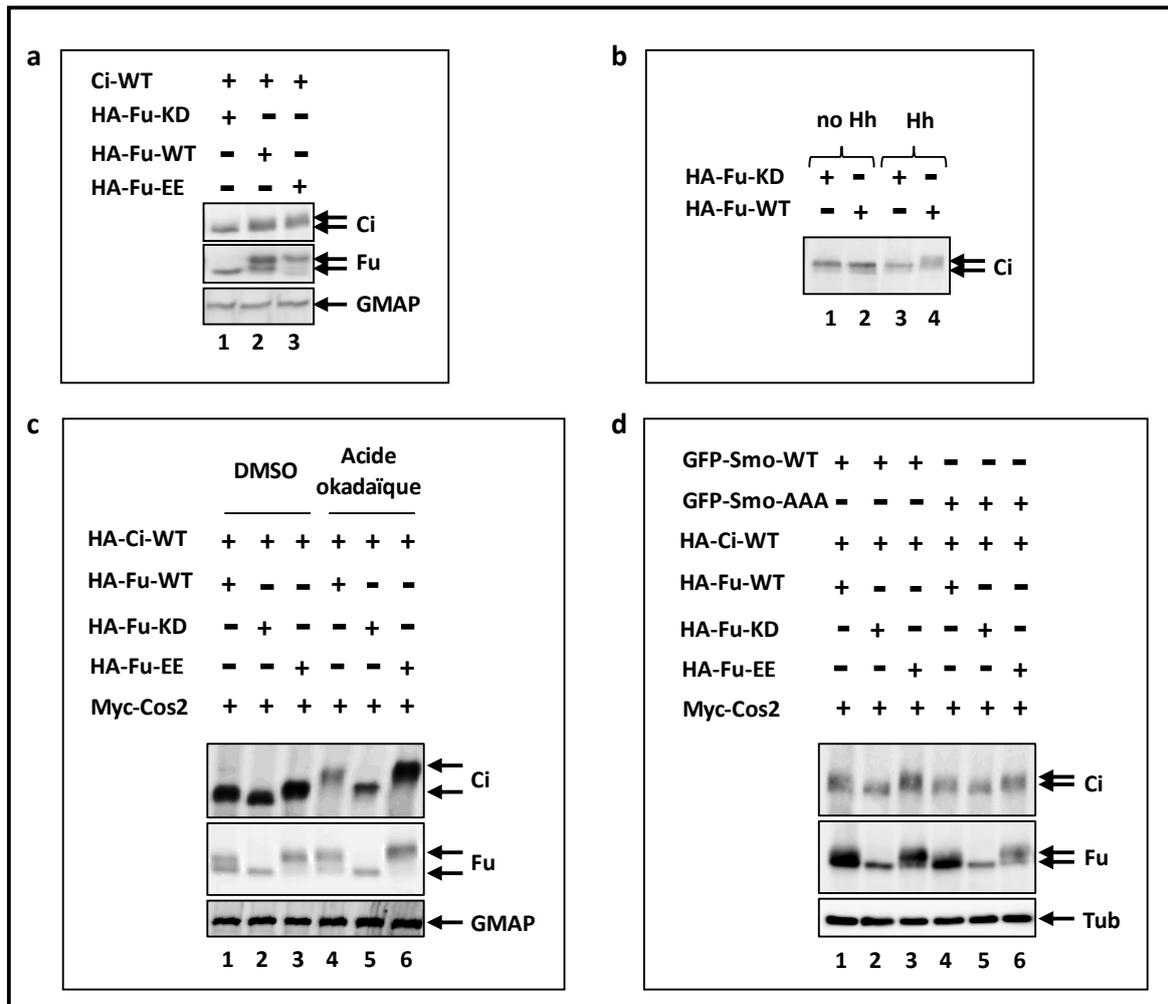


Fig. 37 : L'activité kinase de Fused est nécessaire à l'activation de Ci par phosphorylation

a) La phosphorylation de Ci est dépendante de l'activité kinase de Fused. Les cellules S2R+ sont transfectées avec les constructions indiquées. Les niveaux de phosphorylations de Ci et Fu sont détectés en Western Blot par un changement de mobilité électrophorétique. GMAP sert de contrôle de dépôt.

b) Fu phosphoryle Ci en présence d'Hh. Les cellules sont transfectées avec une forme inactive (Fu-KD) ou sauvage de Fu (Fu-WT) et traitées ou non avec Hh.

c) Confirmation que Fu entraîne une modification post-traductionnelle de Ci de type phosphorylation. Les différentes formes de Fu, ainsi que Cos2 sont exprimées dans des cellules de drosophile traitées avec soit du DMSO, servant de contrôle, ou avec de l'acide okadaïque, inhibiteurs de phosphatase. La phosphorylation de Ci est analysée par Western Blot et GMAP est utilisé comme contrôle de charge.

d) Smo induit la phosphorylation de Ci. Une forme mutante de Smo (GFP-Smo-AAA) ou sauvage de Smo (GFP-Smo-Wt) a été exprimée dans les cellules S2R+ avec les différentes formes de Fu et Cos2. L'effet de Smo sur la phosphorylation de Ci a été évalué par Western Blot et la tubuline sert de contrôle de dépôt.

L'ensemble de ces expériences *in vitro* indique que le signal Hh induit l'activation de la kinase Fu qui phosphoryle Ci. Nous avons ensuite décidé de continuer l'étude de l'activité kinase de Fu sur l'activation de Ci en analysant l'expression des gènes cibles de la voie Hh *in vivo* dans le disque imaginal de l'aile, modèle du laboratoire.

L'expression de Fu-EE est responsable de la stabilisation de Ci-FL (Fig. 38a'), conduisant à une augmentation et extension de Ptc (Fig. 38a''), et En (Fig. 38b'), loin dans l'antérieur là où normalement la voie Hh n'est pas activée, indiquant que Fu-EE entraîne une activation renforcée de la voie. Ceci est confirmé par le marquage de la forme phosphorylée de Cos2 sur le résidu 572 qui montre une stabilisation plus loin dans l'antérieur, révélatrice de la présence d'un complexe Fu/Cos2/Ci plus actif (Ranieri et al. 2012).

Comme contrôle, la forme activatrice de Ci (Fig. 38d), l'extension de Ptc (Fig. 38d'), ainsi que la phosphorylation de la sérine 572 de Cos2 (Fig. 38e'), sont perdues dans des conditions où Fu-KD est exprimée, révélant que l'effet observé précédemment est bien dû à l'activité kinase de Fu.

L'expression de Fu-EE dans un contexte mutant pour Smo, révèle un phénotype particulièrement intéressant. En effet, l'expression des gènes cibles de la voie *en* (Fig. 38h') et *ptc* est réduite (Fig. 38g''), ce qui ressemble au phénotype observé lors de l'expression d'une Fu-KD (Fig. 38d'). En revanche, l'état de phosphorylation de la sérine 572 de Cos2 est identique à celui visualisé quand une Fu-EE seule est exprimée, puisque le marquage du p572Cos2 montre une stabilisation de cette forme phosphorylée de Cos2 (Fig. 38i' comparée à Fig. 38c'). Ceci indique que lorsque qu'une forme constitutivement activée de Fu est exprimée en absence de Smo, le complexe Fu/Cos2 se retrouve donc dans un état actif mais n'est pas capable d'induire l'expression des gènes cibles de la voie. C'est l'observation de l'expression de Ci qui permet en partie de donner une explication. En effet, dans un mutant pour *smo*, seule la forme répressive de Ci est présente (Fig. 38g'). Cette observation peut être interprétée par le fait que la PKA est constamment liée à Ci, formant constitutivement du répresseur, puisqu'elle ne peut pas être relocalisée à la membrane plasmique étant donné l'absence de Smo. Pour confirmer cette idée, il faudrait analyser des disques d'ailes, exprimant Fu-EE dans des conditions où Smo et PKA sont absents. Normalement, on s'attend à une activation ectopique de la voie Hh, puisque le Ci-Rep ne peut plus être formé, et Fu est constamment activée.

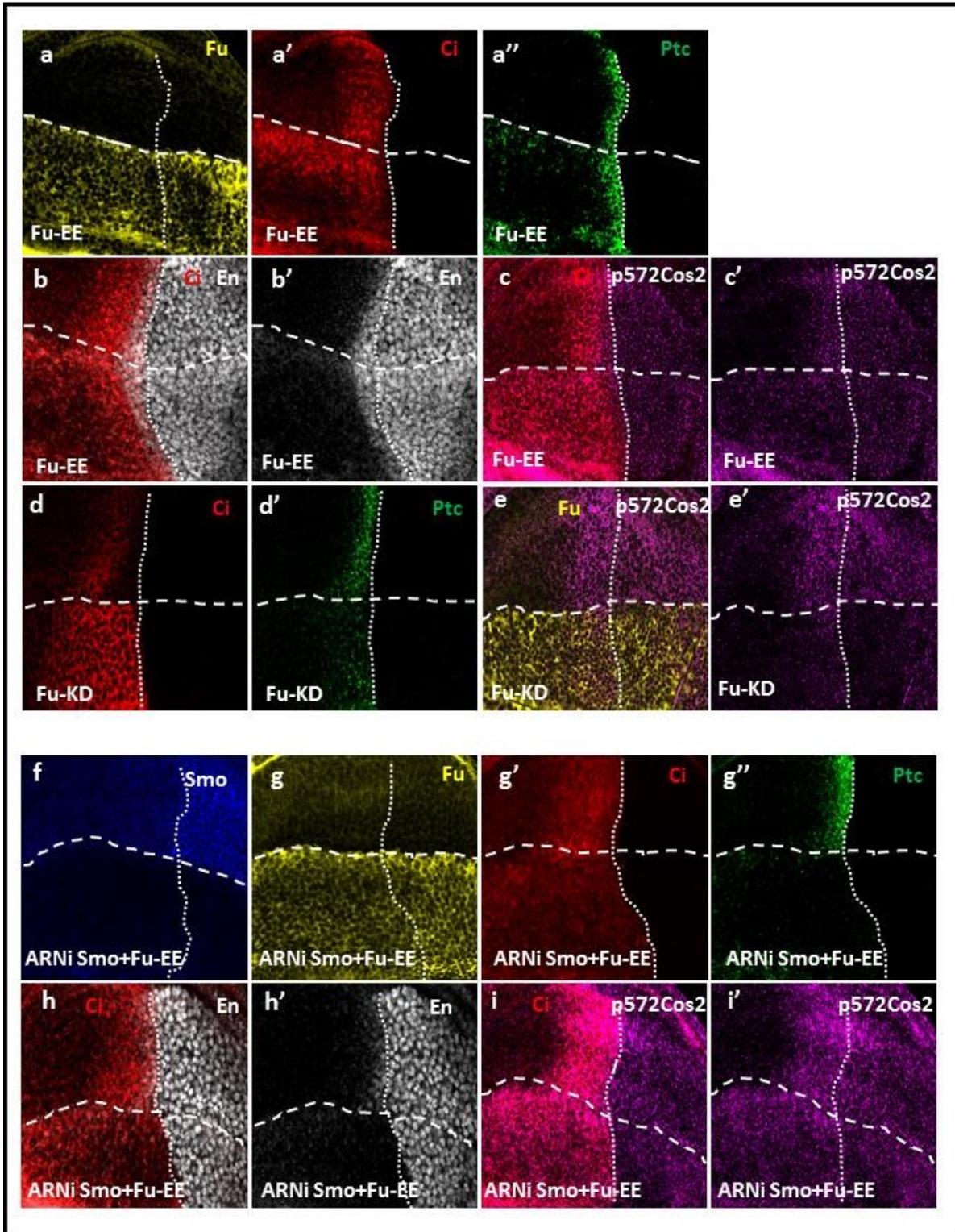


Fig. 38 : L'activité kinase de Fu est nécessaire à l'activation de Ci et des gènes cibles
a-c) L'expression de Fu-EE, forme constitutivement activée de Fu, induit l'activation de Ci et de ses gènes cibles. Les disques imaginaux d'aile, exprimant Fu-EE dans leur région dorsale grâce à l'utilisation du driver *Apterous*, sont immunomarqués avec des anticorps dirigés contre Fu (a), Ci (a'), Ptc (a''), En (b') et p572Cos2 (c'). Les panneaux b et c représentent la superposition des marquages En et Ci (b) ainsi que Ci et p572Cos2 en (c).

d) L'expression d'une forme dépourvue d'activité kinase de Fu, Fu-KD, abolit la formation du Ci-Act et l'activation des gènes cibles. Fu-KD est exprimée dans la région dorsale du disque imaginal d'aile de drosophile avec le driver *Apterous* et les protéines Ci (d), Ptc (d') et p572Cos2 (e') sont visualisées avec des anticorps qui leur sont spécifiques. En e, les marquages de Fu et p572Cos2 ont été superposés.

f-i) La présence de Smo est nécessaire à l'activation de Ci et des gènes cibles par Fu. L'expression de Smo a été abolie par l'utilisation d'un Smo *ARNi* qui a été co-exprimé avec Fu-EE dans la partie dorsale du disque. Les anticorps dirigés contre Smo (f), Fu (g), Ci (g'), Ptc (g''), En (h') et p572Cos2 (i') ont été utilisés pour visualiser ces différentes protéines. Les panneaux h et i représentent la superposition des marquages En et Ci (h) ainsi que Ci et p572Cos2 en (i).

Quoiqu'il en soit, l'ensemble des résultats de ces figures indique que le signal Hh induit de façon séquentielle deux évènements :

1) La stabilisation de Smo permet le déplacement de la PKA de Ci, bloquant ainsi la formation du Ci-Répresseur.

2) L'activation de la kinase Fu induit l'activation de Ci, probablement par phosphorylation, aboutissant ainsi à l'expression des gènes cibles activés pour de hauts niveaux d'Hh. De façon logique, nous avons ensuite voulu identifier les sites de phosphorylation de la kinase Fu sur Ci.

L'identification de sites putatifs de la kinase Fu sur Ci

En 2002, Nybakken et al., ont identifié deux sites de phosphorylation de Fu sur la protéine Cos2 comme indiqué dans la figure. 39a. Ainsi ils ont pu montrer que Fu phosphoryle Cos2 sur deux résidus différents : les sérines 572 et 931, pour lesquelles nous avons généré des anticorps et étudié la fonction sur la transduction du signal dans le papier de Ranieri et al. 2012. A partir de ces sites mutés et confirmés par spectrométrie de masse, nous avons recherché et établi une séquence consensus pour la kinase Fu. Il apparaît une séquence commune avec un acide aspartique en position +2 par rapport à la sérine phosphorylée. Nous nous sommes basés sur ce motif pour rechercher une telle séquence sur la protéine Ci et avons trouvé au moins 5 sites : Ci154, Ci184, Ci190, Ci225 et Ci1029. De façon inattendue, 4 sites sont localisés dans la même région correspondant à la région d'interaction avec la protéine Sufu à l'extrémité N-Terminale. La cinquième sérine, Ci1029, ne semble pas associée à un domaine particulier de Ci.

L'analyse de la région Sufu de Ci montre qu'elle contient énormément de sérines dans sa partie N-terminale, en particulier entre les acides aminés 150 et 342 (Fig. 39b). De ce fait, nous avons d'abord fait une délétion de cette région (D1) et regardé l'impact de cette mutation sur la phosphorylation de Fu sur Ci (Fig. 39c). Lorsque ce mutant (D1) est exprimé, la différence de migration électrophorétique de Ci entre une Fu-KD et une Fu-EE est moins importante par rapport à celle observée avec l'expression d'un Ci-WT. Ceci suggère que des sites putatifs de la kinase Fu pourraient se trouver entre les acides aminés 150 et 342 de Ci. Cependant, la phosphorylation de ce mutant n'est pas totalement abolie, suggérant que Fu peut également agir ailleurs sur Ci, et des analyses plus poussées devront être faites.

Afin de valider que les sites putatifs de Fu sont bien localisés dans le domaine D1, nous avons remplacé les sérines 154, 184, 190 et 225 par des alanines et comparer l'état de phosphorylation de ces mutants à celui de Ci-WT en présence de différentes formes de Fu (Fig. 39d). En présence d'une Fu-EE, les mutants Ci154A (Fig. 39 : puit 5), ainsi que le double mutant Ci184-190 (Fig. 39 : puit 6) affichent une phosphorylation réduite comparé au CiWT (Fig. 39 : puit 3) alors que le mutant Ci225 est encore phosphorylé (Fig. 39 : puit 4). Ceci indique que les sites 154, 184 et 190 pourraient être des cibles de la kinase Fu alors que la sérine 225 ne semble pas subir, en apparence, de phosphorylation.

Pour étudier la pertinence de ces sites dans la signalisation Hh, nous avons regardé l'impact de leurs mutations sur l'activité transcriptionnelle de Ci en mesurant l'activité promotrice du gène *ptc* (Ptc luciférase) qui est un gène cible de la voie Hh (Fig. 39e). Dans des conditions où 25ng des différentes formes de Ci sont transfectées, l'activité rapportrice de Ptc est réduite en présence d'Hh pour les deux mutants, Ci154A et Ci184A-190A en comparaison avec la forme sauvage, indiquant que ces sites ont certainement un rôle sur l'activation de Ci. L'étude de ces mutants nous a permis d'identifier des sites putatifs de phosphorylation de Fu sur Ci.

Néanmoins des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer l'importance de ces sites sur l'activation de Ci. Notamment, une analyse par spectrométrie de masse, suivie par la mutagénèse puis la génération d'anticorps spécifiques des sites trouvés, serait un moyen définitif pour prouver que Ci est un substrat direct de la kinase Fu, et d'étudier, par la suite, sa fonction *in vivo*. Comme nous pouvons le voir dans la figure 39b, en plus de Fu, SuFu et Hib peuvent se lier à Ci. De manière intéressante, ces deux protéines interagissent avec Ci dans le domaine où se situent les sérines que nous avons identifiées comme pouvant être phosphorylées par Fu. Ceci laisse à penser un rôle de ces phosphorylations dans les fonctions de SuFu et Hib sur Ci, et cet aspect sera abordé dans la discussion.

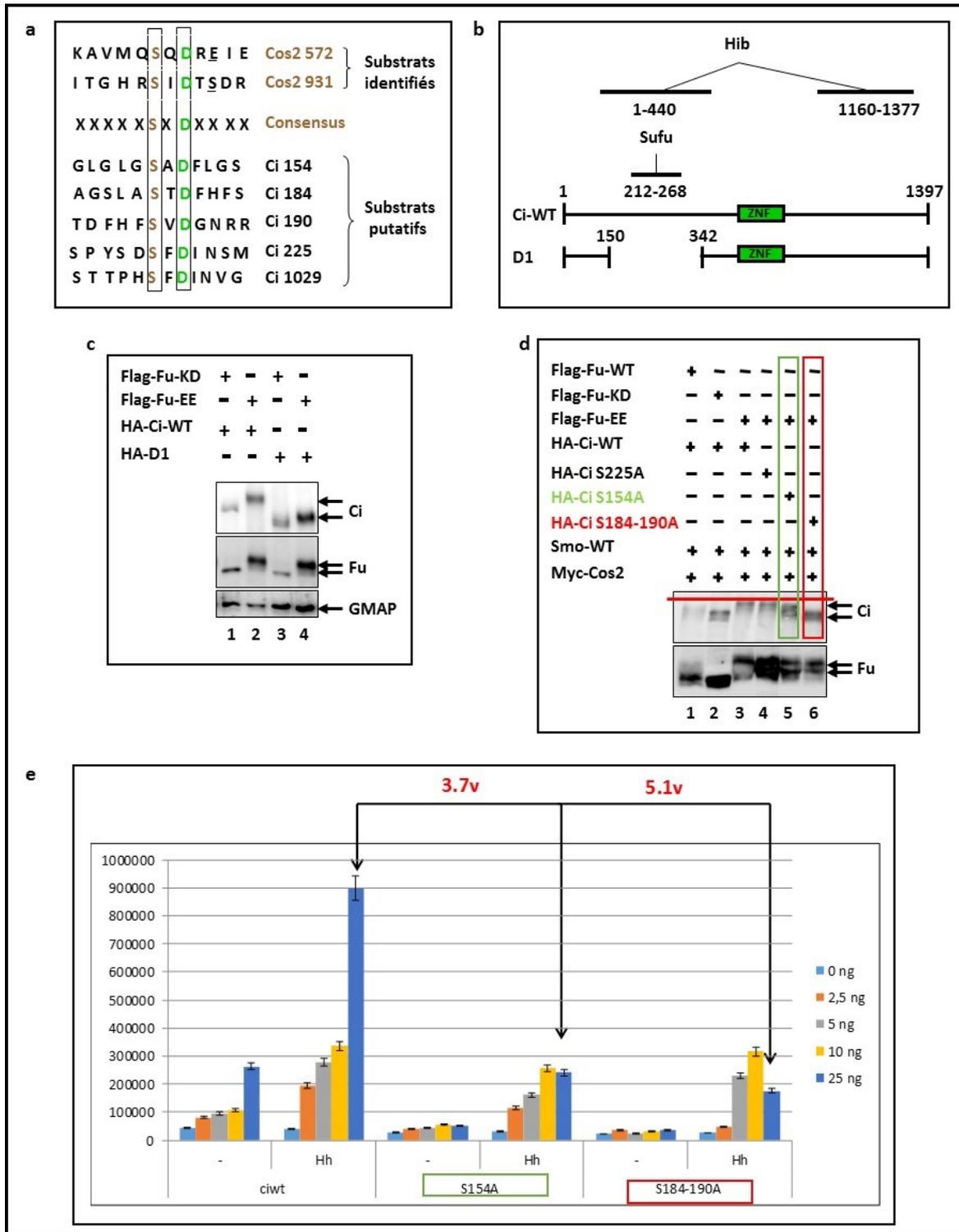


Fig. 39 : L'identification des sites putatifs de phosphorylation de Fu sur Ci

a) Identification de sites putatifs de phosphorylation de Ci sur Fu. Alignement de la séquence consensus de phosphorylation de la kinase Fu avec ses substrats identifiés (Cos2 572 et Cos2 931) et ses substrats putatifs (Ci 154, Ci 184, Ci 190, Ci 225 et Ci 1029).

b) Représentation schématique de la délétion D1 située entre les acides aminés en position 150 et 342 de Ci. La position des différents domaines de fixation à SuFu et Hib est indiquée sur ce schéma.

c) Fu phosphoryle Ci dans un domaine D1 allant des acides aminés 150 au 342. Les cellules S2R+ sont transfectées avec la forme mutante D1 de Ci décrite en (a) ou Ci-WT ainsi que Fu-KD ou Fu-EE. Les phosphorylations de Ci et Fu sont analysées par Western Blot. GMAP sert de contrôle de dépôt.

d) Les acides aminés 154, 184 et 190 de Ci semblent être des substrats potentiels de la kinase Fu. Différentes formes mutantes de Ci pour les résidus identifiés en (c) ont été exprimées avec les constructions indiquées sur la figure. Un Western Blot a été réalisé pour évaluer les niveaux de phosphorylation de Ci. Dans cet essai, l'activité de Fu est clairement visible par l'auto-phosphorylation de cette kinase.

e) Les sérines en position 154,184 et 190 ont un rôle dans l'activité transcriptionnelle de Ci. Mesure de l'activité du gène rapporteur Ptc luciférase des différents mutants de Ci. Les cellules ont été transfectées avec des quantités croissantes de Ci en absence ou présence d'Hh comme indiqué sur la figure.

Pour poursuivre dans l'idée que Fu peut phosphoryler Ci, nous avons étudié la régulation et la proximité entre Fu et Ci au sein du complexe de transduction.

Fu et Ci interagissent, cette association est favorisée par le signal Hh

Dans le but d'identifier une interaction entre Fu et Ci, nous avons utilisé la technique de Complémentation par Fluorescence Bimoléculaire (BiFC) qui permet de visualiser et de quantifier des interactions ou changements de conformation au sein d'un complexe protéique. Cette approche est basée sur la reconstitution de deux fragments de protéines fluorescentes (YFP : « Yellow Fluorescent Protein » ou CFP : « Cyan Fluorescent Protein »), fusionnées à des protéines qui interagissent. Différentes combinaisons des protéines recombinantes BiFC-YFP ont été exprimées en cellules et analysées par microscopie confocale. Comme contrôle négatif, nous avons transfecté uniquement Ci (Fig. 40b) ou Fu (Fig. 40c), et nous n'avons observé aucun signal YFP reconstitué, validant la spécificité de l'essai. Quand Fu et Ci sont co-exprimés, la reconstitution de l'activité recombinante entre Fu et Ci révèle l'existence d'une interaction directe entre ces deux protéines (Fig. 40d). L'ajout de Cos2, entraîne une augmentation significative du signal YFP (Fig. 40e et Fig. 40g), suggérant que Cos2 favorise le rapprochement de Fu et Ci, ce qui n'est pas étonnant puisque Cos2 est capable d'interagir avec ces deux protéines (Monnier et al., 2002 ; Wang et Jiang, 2004 ; Ruel et al., 2007). Dans ces conditions, nous avons étudié l'influence de la protéine Smo et du signal Hh sur cette interaction, et nous avons montré que Smo entraîne une augmentation significative de l'activité recombinante YFP (Fig. 40f et Fig. 40g), révélant un rapprochement de Fu et Ci en présence de Smo. Un tel rapprochement est également observé en présence d'Hh.

Pour confirmer cette interaction, une expérience de co-immunoprécipitation a été réalisée dans laquelle la protéine Fu a été immunoprécipitée, et l'effet de Cos2 sur l'interaction entre Fu et Ci a été étudié (Fig. 40h). En présence de Cos2, Ci est révélé dans les immunoprécipitats Fu, confirmant l'existence d'un complexe Fu/Ci/Cos2 (Fig. 40h : puit 5). Ce résultat est prévisible, puisque Fu interagit avec Cos2 qui est capable de s'associer à Ci. La protéine Ci est également observée dans les cellules où Cos2 n'a pas été transfecté (Fig.

40h : puit 2), mais la présence de Cos2 endogène empêche de conclure que Fu et Ci interagissent directement. Dans des cellules où Cos2 est absent grâce à l'ajout d'un *ARNi* dirigé contre Cos2, Fu est capable de faire tomber Ci (Fig. 40h : puit 8), indiquant qu'il existe une interaction directe entre Fu et Ci. Il est à noter que l'interaction entre Fu et Ci dans le puit 8 est plus difficile à détecter car en absence de Cos2, Fu est diminuée (Ruel et al., 2003).

Cette figure montre que Fu et Ci s'associent de manière directe dans le complexe Fu/Cos/Ci, et que la présence d'Hh favorise cette interaction. L'ensemble de données de ces deux premières figures suggère que Fu et Ci interagissent directement et que cette interaction favoriserait la phosphorylation de Ci.

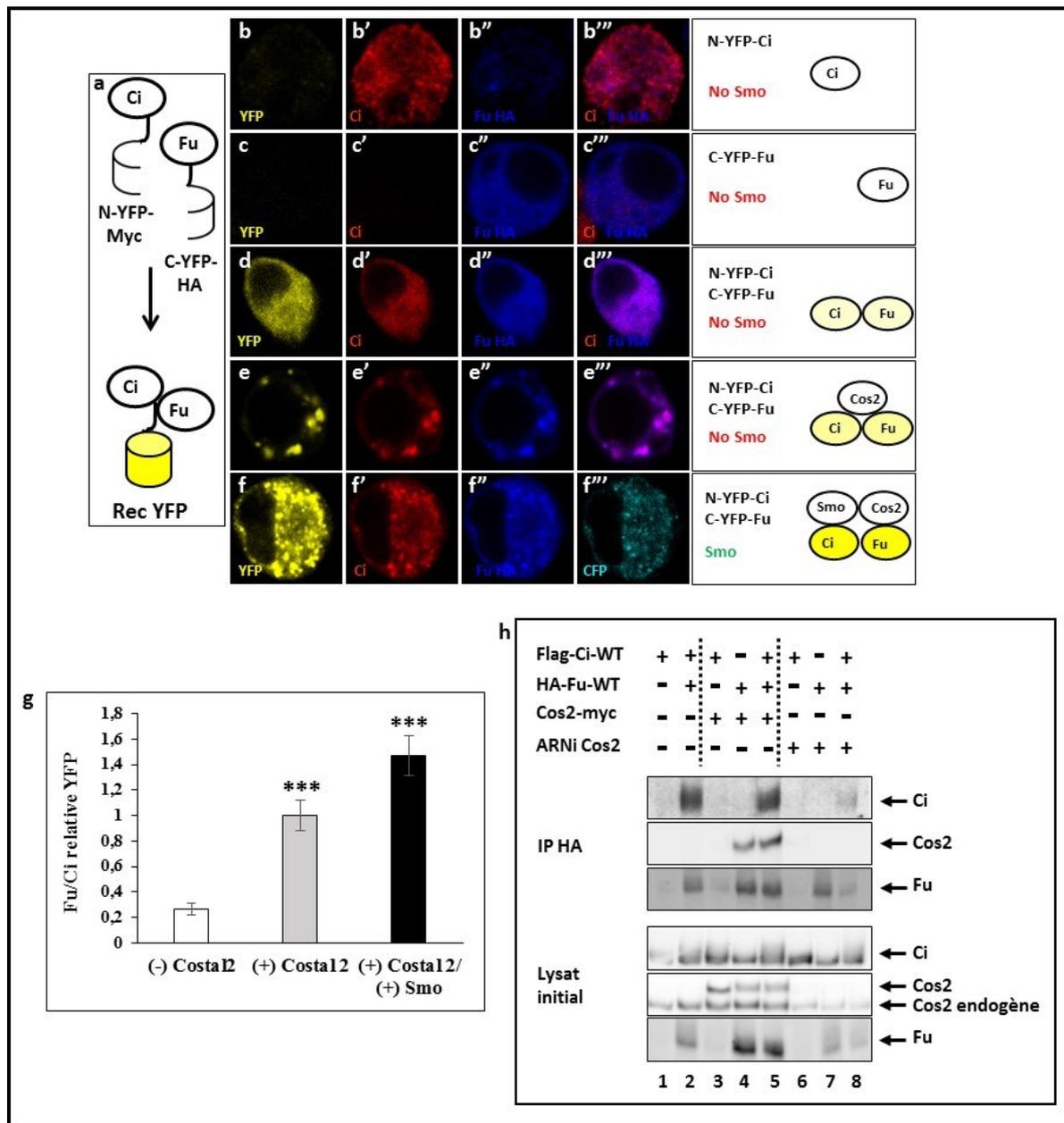


Fig. 40 : Fu et Ci interagissent et la présence d'Hh/Smo favorise cette interaction

a) Représentation schématique de la reconstitution du signal YFP entre N-YFP-Myc-Ci- et Fu-C-YFP-HA.

b-f) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre Fu et Ci en absence ou présence de Smo et Cos2. Les cellules S2R+ sont transfectées avec Ci-N-YFP-Myc seule (b), Fu-WT-C-YFP-HA seule (c) ou avec Ci-N-YFP-Myc et Fu-WT-C-YFP-HA (d-f). Quand les cellules expriment Ci-N-YFP-Myc et Fu-WT-C-YFP-HA, différentes conditions ont été analysées : en absence (d) ou en présence de Costal2 (e-f) et en présence de Smo (f). Les complexes formés par les protéines transfectées sont indiqués en haut à droite de chaque panneau. Les cellules transfectées avec Ci-Myc sont détectées en rouge (b'-b''', d'-d''', e'-e''' et f') et avec Fu-WT-HA sont marquées en bleu foncé (c''-c''', d''-d''', e''-e''' et f'''). Smo est détecté en bleu clair via un tag CFP (f'''). Le signal YFP est reconstitué et visualisé en jaune (b, c, d, e, et f). Les figures b''', c''', d''' et e''', représentent la superposition des marquages Ci-Myc et Fu-HA.

g) Quantifications du signal YFP pour les différentes conditions de transfection. Les barres représentent la moyenne +/- de l'erreur standard de 3 expériences indépendantes. Pour les histogrammes: ***: p<0,001.

h) Fu interagit directement avec Ci. Les cellules S2R+ sont transfectées avec Flag-Ci-WT et HA-Fu-WT, en absence ou présence de Cos2-Myc ou avec un ARNi contre Cos2. L'immunoprécipitation est réalisée avec un anticorps anti-HA, puis analysée en Western Blot avec un anticorps anti-Ci pour détecter la présence de Ci associée à Fu. Les protéines Ci, Fu et Cos2 sont également visualisées dans le lysat initial.

Cependant, en absence d'Hh, Ci est également capable d'interagir avec la PKA au sein du complexe Fu/Cos2/Ci (Zhang et al., 2005 ; Ranieri et al., 2014). Dans leur étude, Ranieri et al., 2014 ont conclu que le complexe Fu/Cos2 agit comme une plateforme afin de faciliter le rapprochement entre la kinase PKA et son substrat Ci, mais le rôle individuel de Fu, ainsi que l'importance de son activité kinase dans cette interaction restent à être élucidés, puisque les auteurs ont utilisé une forme sauvage de Fu dans leurs expériences.

L'interaction entre la PKA et Ci est maximale dans le complexe répresseur

Tout d'abord, nous avons analysé le rôle de la kinase Fu dans le complexe répresseur. Ce complexe se caractérise par l'interaction entre la PKA et Ci, étape essentielle pour phosphoryler et former Ci-Rep. Afin d'étudier l'importance de la kinase Fu sur l'interaction entre PKA et Ci, nous avons d'abord réalisé un contrôle négatif en transfectant soit la PKA (Fig. 41b) soit Ci (Fig. 41c) et aucun signal YFP n'a été détecté. Comme je l'ai dit plus haut, une fonction « répressive » a été attribuée à Fu, de par son action en tant que protéine d'échafaudage (Ranieri et al., 2014). Il est probable que l'expression d'une forme inactive de Fu, qui est l'état physiologique dans lequel se trouve Fu en absence d'Hh, n'affecte pas l'association entre la PKA et Ci.

En effet, une activité recombinante de YFP est détectée quand Ci et PKA dans un complexe Fu-KD/Cos2 dans les cellules, indiquant une interaction entre la PKA et Ci dans un complexe où l'activité de Fu est inactive (Fig. 41d). En absence du complexe Fu-KD/Cos2, aucun signal YFP n'est observé (Fig. 41e), confirmant les résultats de Ranieri et al., 2014,

selon lesquels le complexe Fu/Cos2 est nécessaire à l'interaction entre la PKA et Ci. En présence de Cos2 seule, PKA et Ci interagissent faiblement, visible par un signal YFP peu intense (Fig. 41f), signal qui est significativement augmenté en présence d'une Fu-KD seule (Fig. 41g et Fig. 41h). Ceci suggère qu'au sein du complexe Fu/Cos2, Fu a un rôle plus important que Cos2 dans l'interaction entre la PKA et Ci, ce qui avait été remarqué par Ranieri et al., 2014. En effet, les auteurs ont montré que la PKA est toujours associée à Fu en absence de Cos2, alors qu'en absence Fu, la PKA n'est pas capable d'interagir avec Cos2, indiquant que c'est probablement Fu et non Cos2 qui agit pour rapprocher la PKA de Ci.

Le résultat de cette expérience permet de conclure qu'en absence d'Hh, l'interaction entre la PKA et Ci est maximale dans un complexe Fu/Cos2 où Fu est inactif.

e'-e''' ; f'-f''' et g'-g''') alors que la PKA-HA est immunomarkuée en vert (b''-b''' ; d''-d''' ; e''-e''', f''-f''' et g''-g'''). Le signal YFP reconstitué est indiqué en jaune (b, c, d, e, f, g). Les figures b''', c''', d''', e''', f''' et g''' représentent la superposition des marquages Ci-Myc et PKA-HA.

h) Quantification du signal YFP dans les différentes conditions de transfection. Les barres représentent la moyenne +/- de l'erreur standard de 2 expériences indépendantes.

De manière intéressante, Ranieri et al., 2014 ont vu que l'association entre la PKA et Ci, à l'instar de l'interaction entre Fu et Ci, est régulée par Hh. En effet, les auteurs ont démontré qu'Hh, et plus particulièrement Smo, entraîne la dissociation de l'interaction entre la PKA et Ci. Ceci est dû à une simple question d'affinité, puisqu'en présence d'une quantité identique de Smo et de Ci, la PKA s'associe préférentiellement avec Smo. Dans leur étude, les expérimentateurs n'ont pas analysé l'influence de l'activité kinase de Fu sur la régulation de l'interaction entre la PKA et Ci par Smo. Nous avons donc décidé de compléter ces expériences en analysant l'effet de Smo sur l'interaction entre la PKA et Ci en présence des différentes formes plus ou moins actives de Fu.

L'interaction entre la PKA et Ci est indépendante de l'état d'activation de la kinase Fu, mais dépend de la présence de Smo

Pour mesurer l'importance de l'activité kinase de Fu sur la régulation de l'interaction entre la PKA et Ci, nous avons transfecté les différentes formes de Fu ainsi que Cos2, en absence ou présence de Smo, pour permettre la formation du complexe Fu/Cos2 dans lequel l'association entre la PKA et Ci est maximale (Fig. 41). En absence de Smo, quel que soit l'état d'activation de la kinase Fu, un signal YFP d'intensité similaire est détecté (Fig. 42h, barres blanches), indiquant que l'interaction entre la PKA et Ci est identique dans un complexe inactivé (Fu-KD ; Fig. 42b) ou dans un complexe constitutivement activé par la kinase Fu (Fu-EE ; Fig. 42d). La présence de Smo réduit ce signal dans les complexes indépendamment de l'état d'activation de la kinase Fu (Fig. 42e, f, g et h, barres noires).

Cette expérience montre que l'activité kinase de Fu n'est pas un facteur qui entre en jeu dans l'action de Smo sur la dissociation de l'interaction entre la PKA et Ci. Ce résultat est en accord avec la littérature puisque dans le mécanisme d'activation, la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo précède l'activation de la kinase Fu (Ranieri et al., 2014 ; Li et al., 2014 ; Shi et al., 2011 ; Sanial et al., 2017).

Les résultats de ces deux figures indiquent, qu'en absence d'Hh, la PKA interagit avec Ci dans un complexe Fu/Cos2 dans lequel la kinase Fu n'est pas activée, et que l'effet de Smo sur cette interaction est indépendant de l'état d'activation de Fu.

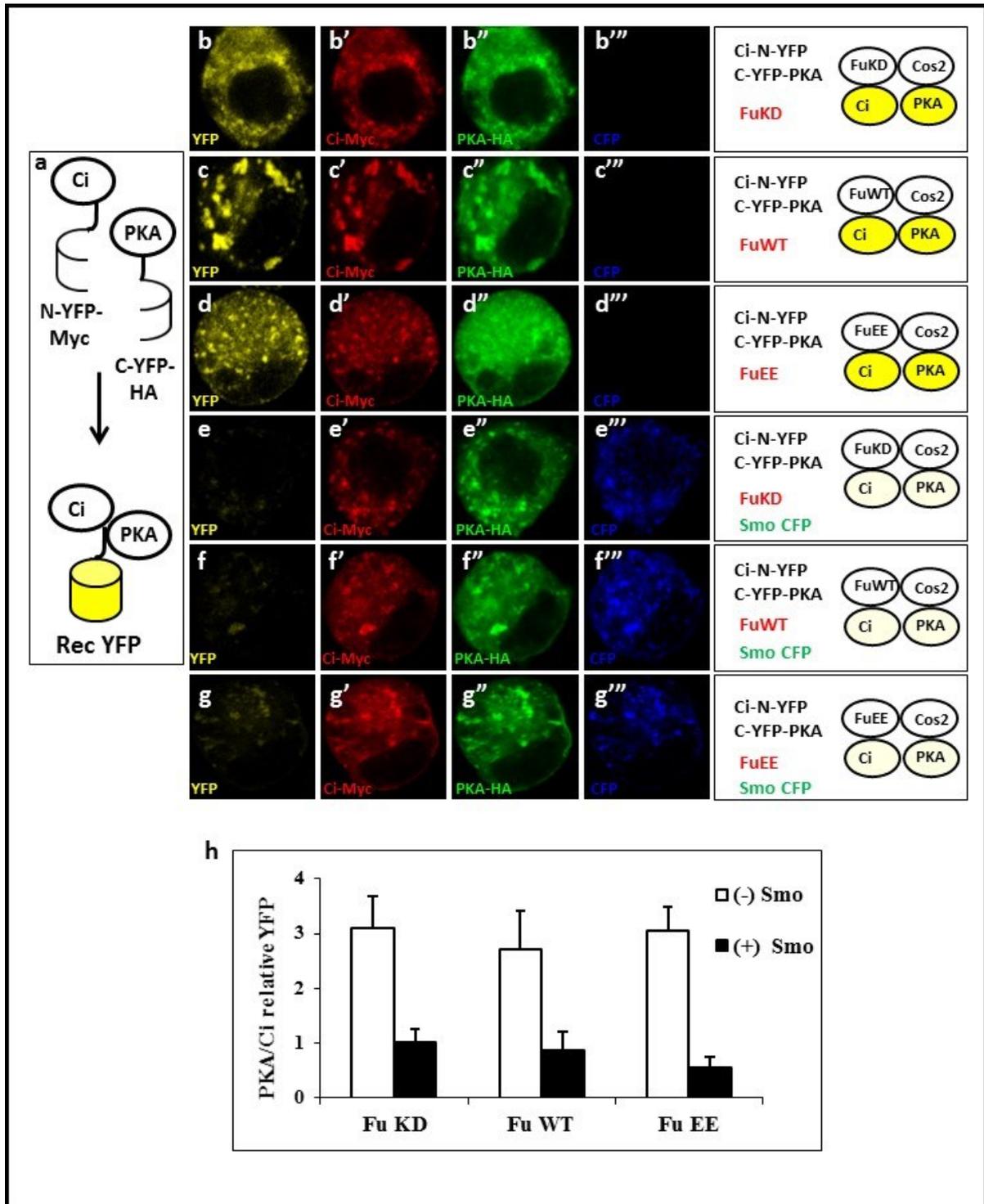


Fig. 42 : L'interaction entre la PKA et Ci, ainsi que sa régulation par Smo, est indépendante de l'activité kinase de Fu

a) Représentation schématique de la reconstitution du signal YFP entre Ci-N-YFP-Myc et PKA-C-YFP-HA.

b-g) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre PKA et Ci en absence ou présence de Smo et avec différentes formes de Fu. Les cellules S2R+ sont transfectées avec Ci-N-YFP-Myc et PKA-C-YFP-HA, avec différentes formes de Fu (Fu-KD, Fu-WT et Fu-EE), avec Costal2 (b-g), en absence (b-d) ou en présence de Smo-CFP (e-g). Les différents complexes transfectés dans les cellules sont

indiqués en haut à droite de chaque panneau. Ci-Myc est détectée en rouge (b'-b''', c'-c''', d'-d'''; e'-e''', f'-f''', et g'-g''') et la PKA-HA est visualisée en vert (b''-b''', c''-c''', d''-d'''; e''-e''', f''-f''', et g''-g'''). Le signal YFP est reconstitué et détecté en jaune (b, c, d, e, f, g) alors que Smo est visualisé par le signal CFP (e-g).

h) Quantifications du signal YFP pour les différentes conditions de transfection. Les barres représentent la moyenne +/- de l'erreur standard de 3 expériences indépendantes.

De manière intéressante, d'après nos résultats, Hh exerce une action opposée sur les interactions PKA/Ci et Fu/Ci, ainsi que PKA/Smo. En effet, d'une part Hh réduit l'interaction entre la PKA et Ci au profit de l'association entre la PKA et Smo, et d'une autre part, Hh augmente l'interaction entre Fu et Ci. L'ensemble de nos résultats révèle d'importants changements de conformation au sein du complexe de transduction, et nous avons décidé d'approfondir les mécanismes impliqués par une approche *in vivo*.

L'étude des interactions PKA/Ci, Fu/Ci et PKA/Smo *in vivo*

Pour étudier l'impact d'Hh sur les interactions entre les protéines du complexe de transduction, nous avons généré des mouches transgéniques exprimant Fu, PKA, Ci et Smo fusionnées avec des fragments de YFP afin de mener des expériences de BiFC dans le disque imaginal de l'aile. Tout d'abord, nous avons analysé la régulation du complexe Smo/Fu/Ci.

Le signal YFP, généré par l'interaction entre Fu et Ci, est plus intense dans le compartiment postérieur, là où la voie Hh est constamment activée, que dans le compartiment antérieur (Fig. 43a'', a'''), suggérant que l'association entre Fu et Ci est augmentée quand la voie Hh est activée. Dans l'antérieur, un signal YFP est détecté, et sur un nombre limité de disques, un gradient faible d'interaction entre Fu et Ci est observé à l'A/P. Pour confirmer cet effet, nous avons également exprimé la protéine Smo, qui agit comme un amplificateur du signal. Ainsi, l'expression de Smo permet de visualiser clairement, dans un grand nombre de disques, un gradient d'interaction entre Fu et Ci proche la frontière antéro-postérieure (A/P), zone où sont exprimés les gènes cibles activés pour de hauts niveaux d'Hh (Fig. 43b'', b'''), renforçant ainsi l'idée que Fu et Ci interagissent préférentiellement dans des cellules où le signal Hh est présent.

Ensuite, nous avons analysé, dans les mêmes conditions, la régulation du complexe PKA/Ci, révélateur du complexe répresseur. L'expression des formes PKA et Ci fusionnées avec des fragments de YFP ne permet qu'un faible signal YFP (Fig. 43c''), qui est augmenté en présence de Cos2 (Fig. 43d''). Ceci est en accord avec les expériences *in vitro*, dans lesquelles nous avons vu que l'interaction entre PKA et Ci a lieu dans un complexe Fu/Cos2 (Fig. 41). Dans ces conditions, nous pouvons également remarquer que le signal YFP est plus fort dans le compartiment antérieur du disque que dans le compartiment postérieur (Fig. 43d'') et que l'addition de Smo augmente cet effet (Fig. 43e'', e'''). Ainsi *in vivo*, l'absence d'induction de Smo dans le compartiment antérieur favorise l'interaction entre la PKA et Ci, alors que dans le compartiment postérieur, où Smo est fortement exprimé, l'interaction entre la PKA et Ci est réduite. Comme contrôle, nous avons également vérifié que la PKA est bien relocalisée vers Smo en présence d'Hh. L'analyse en BiFC du couple Smo/PKA montre

une complémentarité d'interaction, révélant ainsi la présence d'un complexe PKA/Smo dans le postérieur alors que le complexe PKA/Ci est absent de ce compartiment (Fig. 43.f'' comparée à Fig. 43e''). Cette complémentarité existe également dans l'antérieur. En effet, proche de l'A/P, là où les cellules reçoivent de grande quantité d'Hh, un gradient PKA/Smo est clairement visible alors que l'interaction PKA/Ci est absente en présence de Smo. Cette expérience démontre des changements de conformation qui ont lieu au sein du complexe de transduction.

Les résultats obtenus dans les disques imaginaux de l'aile sont en accord avec les résultats *in vitro*. Ainsi, Hh agit de façon complémentaire en entraînant la dissociation de l'interaction PKA/Ci par l'intermédiaire de Smo, qui favorise en parallèle ou de façon séquentielle, l'interaction entre Fu et Ci.

Cependant, en ce qui concerne l'interaction entre Fu et Ci, un point important mérite d'être commenté. Dans les cellules de drosophile, nous avons montré que Fu et Ci s'associent de façon constitutive (Fig. 40), et que cette association est potentialisée en présence de Smo. Mais dans le disque, il n'y a clairement pas d'interaction entre Fu et Ci loin dans l'antérieur, zone où la protéine Hh ne diffuse pas et ne stabilise pas Smo. Il existe différentes manières d'interpréter un résultat obtenu avec la technique de BiFC. Cette approche révèle des interactions entre protéines mais aussi des changements de conformations entre des protéines. Ainsi l'analyse des signaux YFP permet de visualiser des rapprochements ou bien des éloignements entre des protéines situées dans un même complexe. Sachant cela, la position de la YFP dans la partie N-terminale ou C-terminale d'une protéine s'avère essentielle pour mieux comprendre et interpréter une donnée de BiFC. En effet, dans la figure 39, nous avons vu que Fu phosphoryle probablement Ci dans son domaine N-terminal en présence d'Hh, mais nous savons également qu'en absence d'Hh, Fu est nécessaire pour la formation du Ci-Rep en apportant la kinase PKA à son substrat Ci (Fig. 41 et Ranieri et al., 2014). Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces deux activités opposées de Fu pourraient être permises par une localisation différentielle de Fu sur Ci en fonction du signal Hh. Dans notre expérience *in vivo*, la séquence de la YFP est placée dans la partie N-terminale de Ci, révélant donc une interaction entre Fu et Ci qui serait plutôt caractéristique de la présence d'Hh. Ainsi, comme le montre le schéma de la Fig. 43g, dans le compartiment postérieur et dans la zone proche de l'A/P, où les cellules reçoivent le signal Hh, la détection du signal YFP dans la Fig. 43b'' pourrait s'expliquer par une interaction de Fu dans le domaine N-terminal de Ci. En revanche, loin dans l'antérieur, zone où les cellules ne perçoivent pas d'Hh, l'absence de signal YFP (Fig. 43b''), serait révélatrice d'un éloignement de Fu de la région N-terminale de Ci, laissant penser que Fu irait agir dans un autre domaine de Ci, notamment en C-terminal avec la PKA.

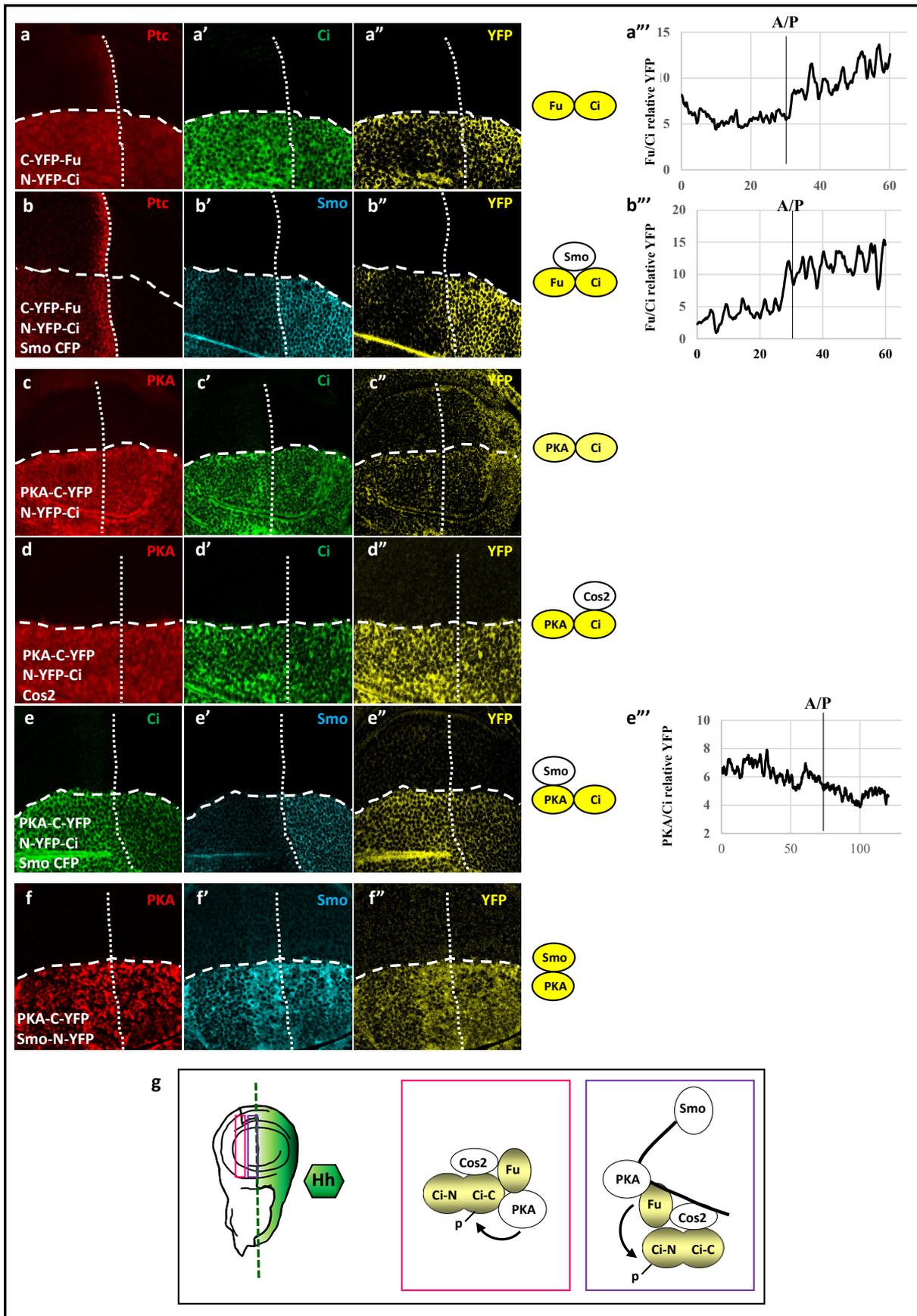


Fig. 43 : L'étude des interactions PKA/Ci, Fu/Ci et PKA/Smo *in vivo*

a-b) L'interaction entre Fu et Ci est augmentée en présence d'Hh. Les protéines N-YFP-Myc-Ci et C-YFP-HA-Fu sont exprimées dans la région dorsale des disques imaginaux d'aile sans Smo-CFP (a) ou avec Smo-CFP (b). Les différents complexes transfectés dans les cellules sont indiqués en haut à droite de chaque panneau. Ptc est détectée en rouge (a et b), Ci en vert (a') et Smo CFP en bleu (b'). Le signal YFP est reconstitué, visualisé en jaune (a'' et b'') et quantifié (a''' ; n=4 disques et b''' ; n=5 disques).

c-e) L'interaction entre PKA et Ci est caractéristique de l'absence d'Hh. Les protéines N-YFP-Myc-Ci et PKA-C-YFP-HA sont exprimées dans la région dorsale des disques imaginaux d'aile (c) avec Cos2 (d) ou avec Smo CFP (e). Les différents complexes transfectés dans les cellules sont indiqués en haut à droite de chaque panneau. La PKA est détectée en rouge par son tag HA (c et d), Ci en vert (c', d' et e) et Smo CFP en bleu (e'). Le signal YFP est reconstitué, détecté en jaune (c'', d'' et e'') et quantifié en présence de Smo (e''' ; n=5 disques).

f) L'interaction entre PKA et Smo est favorisée en présence d'Hh. Les protéines Smo-N-YFP-Myc-et PKA-C-YFP-HA sont exprimées dans la région dorsale des disques imaginaux d'aile. A droite est représenté le complexe transfecté dans les cellules. Les disques sont immunomarqués avec des anticorps dirigés contre les protéines HA, pour la PKA, en rouge (f) et Smo en bleu (f'). Le signal YFP est reconstitué et détecté en jaune (f'').

g) Représentation schématique du modèle pour expliquer l'interaction différentielle entre Fu et Ci en fonction du signal Hh dans le disque imaginal de l'aile.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous sommes retournés à *l'in vitro* pour analyser plus en détail l'interaction entre Fu et Ci, grâce à l'utilisation de fragments de Ci.

La relocalisation de la protéine Fu du domaine C-terminal de Ci au domaine N-terminal de Ci

Pour étudier l'effet d'Hh sur l'interaction entre Fu et Ci, nous avons coupé Ci, au niveau du clivage qui conduit à la formation du Ci-Rep, en deux fragments, les fragments Ci-N (domaine N-terminal de Ci entre les acides aminés 1 à 650) et Ci-C (domaine C-terminal de Ci entre les acides aminés 600-1397). Sur chacun des fragments de Ci, nous avons rajouté une séquence N-CFP afin de visualiser une complémentarité en signal CFP avec une protéine Fu possédant une séquence complémentaire de C-CFP (Fig. 44-1a). Nous avons regardé en cellules comment Fu interagit avec ces deux fragments en fonction du signal Hh. Lorsque le domaine C-terminal de Ci est exprimé avec Fu, un signal CFP est visible indiquant une interaction entre cette région de Ci et Fu (Fig. 44-1b). La présence d'Hh diminue l'intensité de la CFP, indiquant que le signal Hh réduit l'interaction entre le domaine C-terminal de Ci et Fu (Fig. 44-1b, d et e). A l'inverse l'interaction entre le domaine N-terminal de Ci et Fu est faible en absence d'Hh (Fig. 44-1f), alors que la présence d'Hh augmente et favorise cette interaction (Fig. 44-1g, h et i).

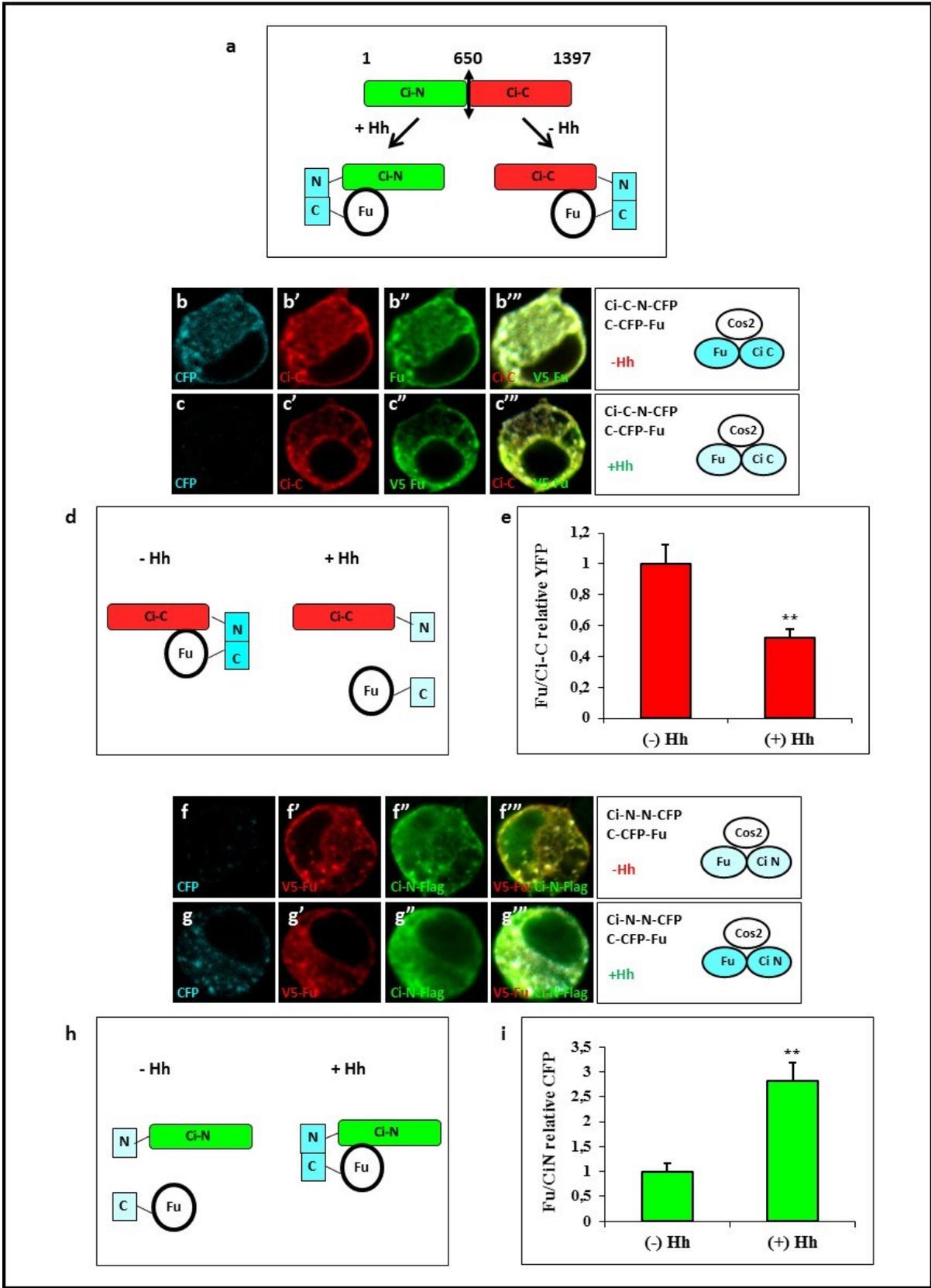


Fig. 44-1 : La relocalisation de la protéine Fu du domaine C-terminal de Ci au domaine N-terminal de Ci

a) Représentation schématique de Ci WT (1-1397aa) avec le site de clivage en position 650 correspondant à la formation du Ci-Rep. La protéine Ci est découpée en 2 fragments Ci-N (en vert) et Ci-C (en rouge). Chacun des fragments est fusionné avec une séquence N-CFP et transfecté avec Fu présentant une séquence complémentaire C-CFP. L'analyse en BIFC en signal CFP nous permettra d'analyser l'impact de Hh sur un déplacement de Fu du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci.

b-c) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre Fu et la partie C-terminale de Ci en absence ou présence d'Hh avec Cos2. Les cellules S2R+ sont transfectées avec Ci-C-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5, sans (b) ou avec Hh (c). Les différents complexes transfectés dans les cellules sont indiqués en haut à droite de chaque panneau. Ci-C-Flag est détectée en rouge avec l'anticorps Ci (b'-b''' et c'-c'''), et Fu-C-CFP-V5 est détectée avec l'anticorps V5 en vert (b''-b''' et c''-c'''). Les figures b''' et c''' représentent la superposition des marquages, Ci-C-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5. Le signal CFP est reconstitué et détecté en bleu (b et c).

d) Schéma représentant la dissociation de l'interaction entre Fu et le fragment C-terminal Ci sous l'effet d'Hh.

e) Quantification du signal CFP lors de la transfection de Ci-C-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5 en absence ou présence d'Hh. Les barres représentent la moyenne +/- l'erreur standard de 3 expériences indépendantes. Pour les histogrammes : **: p<0,01.

f-g) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre Fu et la partie N-terminale de Ci en absence ou présence d'Hh avec Cos2. Ci-N-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5 sont exprimés dans des cellules S2R+, induites(g) ou non (f) pour Hh. En haut à droite de chaque panneau, sont représentés les complexes transfectés dans les cellules. Ci-N-Flag est détectée en vert grâce à l'anticorps Ci (f'-f''' et g'-g'''), et Fu-C-CFP-V5 est détectée en rouge avec l'anticorps V5 (f'-f''' et g'-g'''). Les figures f''' et g''' représentent la superposition des marquages, Ci-N-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5. Le signal CFP est reconstitué et détecté en bleu (f et g).

h) Schéma illustrant le renforcement de l'association entre Fu et le fragment N-terminal Ci en présence d'Hh.

i) Quantification du signal CFP dans les conditions où Ci-N-N-CFP-Flag et Fu-C-CFP-V5 ont été transfectés en absence ou présence d'Hh. Les barres représentent la moyenne +/- l'erreur standard de 3 expériences indépendantes. Pour les histogrammes : **: p<0,01.

Comme contrôle de l'expérience précédente, nous avons exprimé les deux régions de Ci sans Fu et aucun signal CFP n'a été détecté, confirmant la spécificité de la technique de BiFC (Fig. 44-2a et b). Il est à noter que le fragment Ci-N se localise dans le noyau car cette forme ne possède plus le signal d'exportation nucléaire, situé dans la région C-terminale de Ci, alors que le fragment Ci-C est cytosolique. De plus, comme le montre l'analyse par Western Blot de l'expérience de BiFC, nous nous sommes placés dans des conditions où la protéine Ci est reconstituée dans les cellules afin de laisser à Fu le choix d'interagir avec l'un ou l'autre des domaines de Ci, et de réaliser ainsi une expérience de compétition. En effet, quand nous avons étudié l'interaction entre Fu et la partie N-terminale de Ci, nous avons en même temps transfecté le domaine C-terminal de Ci non fusionné avec un tag BiFC. A

l'inverse, un fragment N-terminal de Ci non fusionné à une séquence BiFC a été transfecté lors de l'analyse de l'interaction entre Fu et la région C-terminale de Ci (Fig. 44-2c).

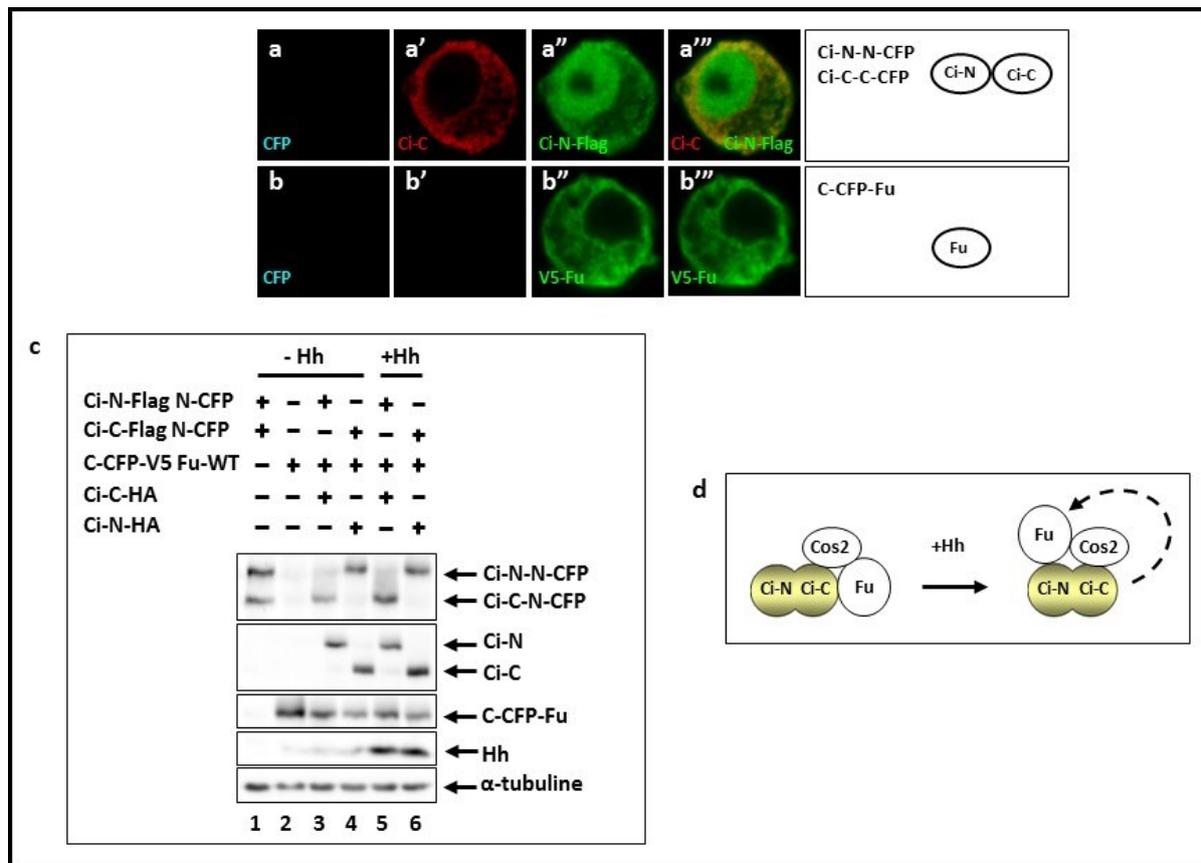


Fig. 44-2 : Divers contrôles en BiFC et WB de l'expérience décrite précédemment

a-b) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre Fu et les fragments N-terminal et C-terminal de Ci. La transfection des fragments, Ci-N-N-CFP-Flag et Ci-C-N-CFP-Flag (a), ou Fu-C-CFP-V5 (b) sert de contrôle négatif de l'expérience décrite précédemment. La protéine Ci-N est principalement localisée dans le noyau, alors que Ci-C est cytoplasmique. En présence de Fu, Ci-N devient cytoplasmique (**Fig.X-1g**).

c) Analyse par Western Blot de l'expérience de BiFC entre Fu et les différents domaines de Ci. Les cellules S2R+ sont transfectées avec les protéines comme annotées sur la figure. Le Western blot ainsi révélé correspond aux échantillons de l'expérience décrite en Fig. X-1. Il est à noter que, dans cette expérience de compétition, les différentes formes Ci-N et Ci-C sont exprimées dans les mêmes proportions, et la tubuline sert de contrôle de charge.

d) Schéma représentant la relocalisation de Fu du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci en présence d'Hh.

L'ensemble des résultats de cette figure confirme que Fu interagit constamment avec Ci, comme nous l'avons vu dans la Fig. 40, et explique pourquoi nous avons observé une interaction plus forte entre Fu et Ci en présence d'Hh. En effet, la séquence BiFC étant placée en N-terminal de Ci, il paraît logique de visualiser une augmentation de l'association entre Fu et Ci, puisque la présence d'Hh entraîne une relocalisation de Fu de la région C-

terminale à la région N-terminale de Ci (Fig. 40). Les données apportées par cette expérience montrent pour la première fois un mouvement intra-domaine de la protéine Fu vers des domaines différents de Ci en fonction d'Hh (Fig. 44-2d). Ce déplacement vers la partie N-terminale de Ci en présence d'Hh fait sens, puisque les sites putatifs de Fu sur Ci ont été localisés dans cette région (Fig. 39). Il est probable que cette relocalisation de Fu en présence d'Hh soit une conséquence de l'action de Smo qui induit l'éloignement de la PKA de Ci. L'interaction entre la PKA et Smo pourrait ainsi laisser un espace que Fu semble aller combler. De ce fait, nous avons ensuite réalisé une série d'expériences de co-immunoprécipitations afin d'étudier plus en détail l'effet d'Hh sur les interactions dans le complexe Fu/PKA/Ci.

La relocalisation du complexe Fu/PKA, du domaine C-terminal de Ci au domaine N-terminal de Ci

Pour analyser l'influence d'Hh sur la relation entre les protéines Fu/PKA/Ci, nous avons d'abord étudié les interactions entre PKA/Fu et les différents fragments de Ci par immuno-précipitation. Dans cette figure, j'ai choisi d'encadrer les puits montrant une interaction spécifique du complexe répresseur en rouge, et du complexe activateur en vert, afin de mieux visualiser les interactions différentielles au sein de ces deux complexes.

Les protéines kinases PKA et Fu dépourvues d'activités interagissent préférentiellement avec Ci-C que Ci-N (Fig. 45a : puits 5 et 6 comparés aux puits 3 et 4). Ceci indique qu'en absence d'Hh, il existe un complexe tertiaire entre ces trois protéines dans lequel la PKA et Fu peuvent chacune indépendamment s'associer avec le domaine C-terminal de Ci (Fig. 45a : puits 5 et 6, encadrés en rouge). Il est à noter, que dans cette expérience, nous avons utilisé une PKA sans activité kinase pour éviter une dégradation de Ci, et une forme inactive de Fu pour mimer un complexe répresseur.

Nous avons voulu par la suite analyser le domaine par lequel Fu se lie à Ci. Dans la littérature, il a été montré que la fonction répressive de Fu, qui a lieu en absence d'Hh, est due à son domaine régulateur qui interagit avec Cos2 (Ascano et al., 2002), formant ainsi la plateforme Fu/Cos2 pour rapprocher les protéines PKA et Ci. Nous avons donc découpé Fu et regardé si le domaine régulateur est suffisant pour interagir avec Ci. Comme le montre la figure 45b, la kinase Fu interagit constitutivement avec Ci par son domaine régulateur. De manière intéressante, la présence d'Hh favorise l'interaction entre la région régulatrice de Fu et le domaine N-terminal de Ci au détriment de l'association Fu-Reg et Ci-C (Fig. 45b : puit 4, encadré en vert, en comparaison au puit 2, entouré en rouge). Ce résultat confirme celui de la figure 39, renforçant l'idée que l'interaction entre Fu, via son domaine régulateur, et le domaine N-terminal de Ci est caractéristique de la présence d'Hh.

Précédemment, nous avons montré l'existence d'un complexe PKA/Fu/Ci-C (Fig. 45a), une question vient alors à l'esprit : comment se comporte la PKA dans l'interaction entre Fu-Reg et Ci-N? La présence d'Hh entraîne la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo. Ainsi la PKA ne devrait pas se retrouver dans le complexe Fu-Reg/PKA/Ci-N à part si cette dernière interagit avec Fu-Reg, puisqu'on sait déjà qu'elle n'interagit pas avec Ci-N (Fig. 45a). En fait,

une interaction constitutive et donc indépendante d'Hh entre les kinases Fu et PKA a déjà été montrée (Ranieri et al., 2014). Nous avons ici affiné ce résultat en montrant que la PKA interagit préférentiellement avec le domaine régulateur plutôt qu'avec le domaine catalytique de Fu (Fig. 45c : puit 4, encadré en rouge et vert, comparé au puit 5). De plus, en générant différents fragments du domaine régulateur de Fu, nous avons déterminé que le domaine allant des acides aminés 669 à 803 était suffisant pour l'association avec la PKA (donnée non montrée).

Les résultats de ces trois immunoprécipitations semblent indiquer que les protéines PKA/Fu/Ci forment un complexe tertiaire dans lequel les relations entre chacune des protéines varient en fonction du signal Hh. En effet, en absence d'Hh, PKA et Fu peuvent chacune se lier au domaine C-terminal de Ci de façon indépendante alors qu'en présence d'Hh, Fu s'associe avec la région N-terminale de Ci et apporte la PKA au sein du complexe sans que celle-ci n'interagisse avec Ci.

Afin de confirmer cette observation, nous avons visualisé en parallèle les complexes PKA/Fu-reg/Ci-N et PKA/Fu/Ci-C en immunoprécipitant les domaines N et C-terminaux de Ci et analysant la présence ou non des protéines Fu-Reg et PKA. En résumé, nous avons démontré la présence d'un complexe ternaire entre la PKA/Fu-Reg et Ci-C (Fig. 45d : puit 6) qui est représentative du complexe répresseur, et où Ci interagit à la fois avec Fu-Reg et la PKA (Fig. 45d : puit 4 et puit 5, entouré en rouge). Alors que, comme je l'ai montré dans les immunoprécipitations précédentes, dans le complexe ternaire PKA/Fu-Reg/Ci-N (Fig. 45d : puit 3), qui est plus caractéristique d'un complexe activateur, Ci-N interagit avec Fu-Reg mais pas avec la PKA (Fig. 45d : puit 1 et 2, encadré en vert).

L'ensemble des données nous a permis d'affiner le modèle de régulation de Ci en Fig.45e. En absence d'Hh, les kinases PKA et Fu se concentrent dans la région C-terminale de Ci. Dans ce complexe ternaire, PKA et Fu *via* son domaine régulateur, peuvent indépendamment l'un de l'autre interagir avec Ci (Fig. 45e, entouré en rouge). En présence d'Hh, la relocalisation de la PKA vers Smo, permet à Fu de se rapprocher du domaine N-terminale de Ci, dans lequel des séquences consensus de phosphorylation par la kinase Fu ont été identifiées (Fig. 39a). Autour de la région N-terminale de Ci, il existe un autre complexe ternaire entre Fu/PKA et Ci-N où seule Fu est capable d'interagir avec les deux autres protéines (Fig. 45e, à gauche, encadré en vert).

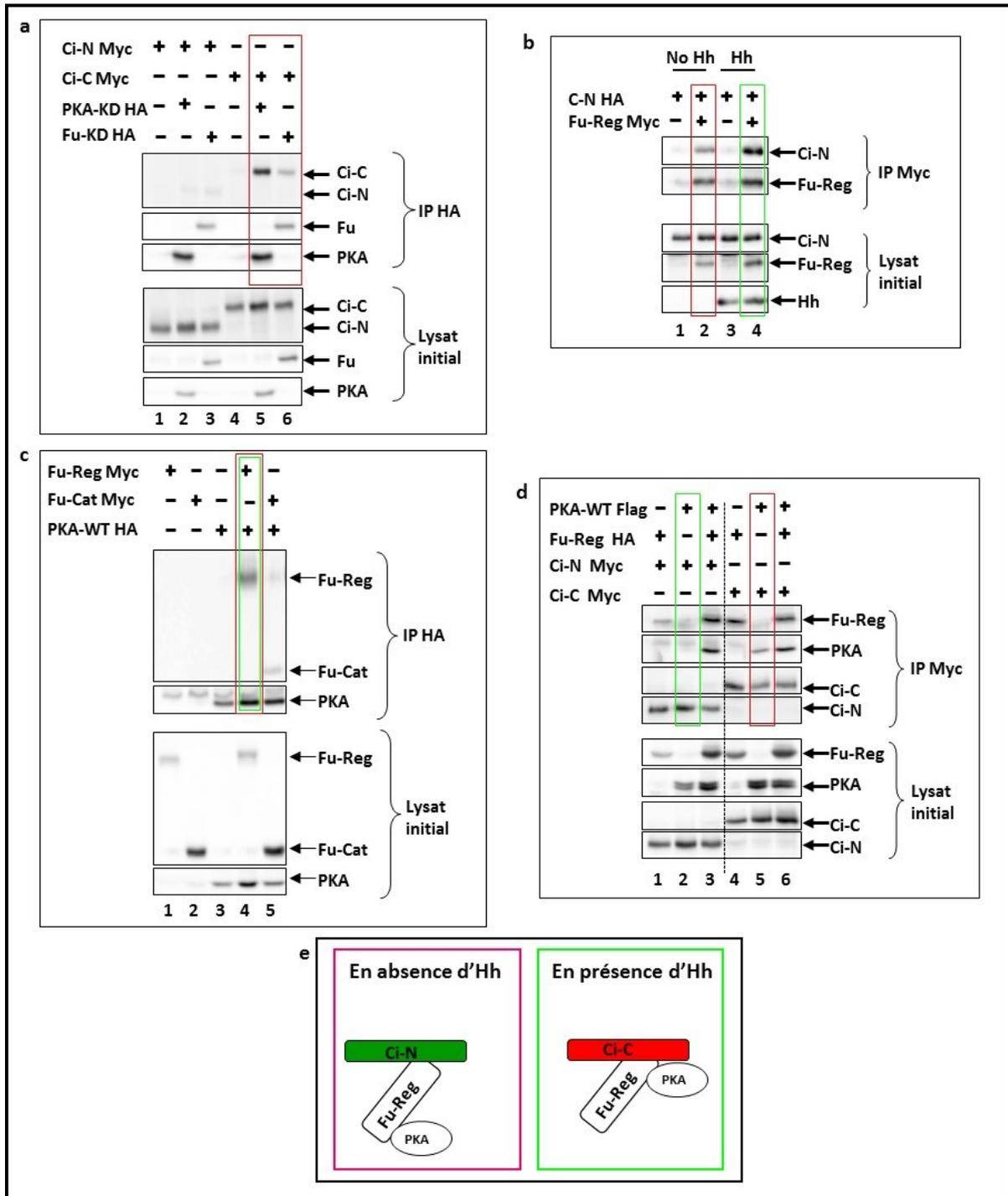


Fig. 45 : La relocalisation du complexe Fu/PKA du domaine C-terminal de Ci au domaine N-terminal de Ci

a) Des formes inactives des kinases PKA et Fu interagissent préférentiellement avec le domaine C-terminal de Ci qu'avec le domaine N-terminal de Ci. Les cellules S2R+ sont transfectées avec les conditions indiquées. Les complexes sont immunoprécipités avec un anticorps anti-HA, et les protéines sont analysées par Western Blot. Les interactions entre PKA-KD/Ci-C et Fu-KD/Ci-C ont lieu dans un complexe inactif, et sont ainsi encadrées en rouge.

b) La présence d'Hh favorise l'interaction entre le domaine N-terminal de Ci et la partie régulatrice de Fu. Les cellules S2R+ activées ou non par Hh sont transfectées avec Fu-Reg-Myc ou Ci-N-HA selon

les conditions indiquées sur la figure. Fu-Reg est immunoprécipité avec un anticorps dirigé contre l'épitope Myc, et la présence du domaine N-terminal de Ci est révélé en utilisant un anticorps reconnaissant la séquence HA. L'interaction entre Fu-Reg et Ci-N, plus caractéristique d'un complexe activateur en présence d'Hh, est entourée en vert.

c) La PKA s'associe avec plus d'affinité à la partie régulatrice de Fu qu'à la partie catalytique de Fu.

Les protéines PKA-WT-HA, Fu-Reg-Myc et Fu-Cat-Myc sont exprimées dans les cellules comme annoté dans la figure. La PKA-WT-HA est immunoprécipitée par l'anticorps HA et la présence des différentes régions de Fu est analysée par Western Blot par l'utilisation d'un anticorps visant la séquence Myc. L'association constitutive entre le domaine régulateur de la PKA et Fu est encadrée en rouge et vert.

d) La conformation des complexes PKA/Fu-Reg/Ci-C et PKA/Fu-Reg/Ci-N ne sont pas identiques. Les cellules S2R+ sont transfectées avec les différentes constructions comme indiqué, et les domaines N-terminal ou C-terminal de Ci sont immunoprécipités par leur tag Myc. La présence des protéines Fu-Reg et PKA-WT est révélée avec des anticorps dirigés contre les tags HA (Fu-Reg-HA) ou Flag (PKA-WT-Flag). Le complexe PKA/Fu-Reg/Ci-C, caractéristique d'un complexe répresseur, est entouré en rouge, alors que le complexe PKA/Fu-Reg/Ci-N, révélateur du complexe activateur, est encadré en vert.

e) Représentation schématique des interactions différentielles entre les protéines PKA/Fu/ Ci en fonction du signal Hh. En absence d'Hh, les protéines PKA et Fu, *via* sa région régulatrice, interagissent chacune avec le domaine C-terminal de Ci au sein du complexe ternaire formé par les protéines PKA/Fu/Ci-C (encadré en rouge). En présence d'Hh, Smo entraîne l'éloignement de la PKA de Ci, et par conséquent dans le complexe ternaire PKA/Fu-Reg/Ci-N, seule Fu-Reg interagit avec le domaine N-terminal de Ci (entouré en vert).

Ce modèle illustre les différences d'interactions entre les protéines appartenant au complexe de transduction en fonction du signal Hh. Pour compléter notre étude, nous avons décidé de visualiser le complexe répresseur, caractéristique de l'absence d'Hh, et le complexe activateur, spécifique de la présence d'Hh.

La visualisation du complexe répresseur et du complexe activateur

Nous avons résumé de manière schématique la distinction entre le complexe répresseur du complexe activateur dans la Figure. 46a. En absence d'Hh, dans le complexe répresseur, les kinases PKA et Fu interagissent avec Ci, alors qu'en présence d'Hh, seule l'interaction Fu et Ci peut être observée. Afin de distinguer les deux types de complexes, nous avons réalisé des expériences de « double complémentation » par BiFC, en utilisant des séquences YFP pour l'interaction entre PKA et Ci, et CFP pour suivre le couple Fu/Ci. La colocalisation entre le signal YFP, causé par l'interaction PKA/Ci, et le signal CFP, dû à l'association Fu/Ci, sera caractéristique du complexe répresseur. En revanche, l'observation d'un signal CFP seul, sera spécifique d'un complexe activateur dans lequel uniquement l'interaction entre Fu et Ci a lieu. Dans la figure 46b, nous avons représenté les différentes constructions utilisées sous chaque panneau pour rendre l'expérience plus compréhensible. Nous avons utilisé une forme mutante non phosphorylable de Ci par la PKA, Ci3m, afin d'éviter la dégradation de Ci. Afin de nous assurer de l'expression des différentes protéines,

nous avons choisi d'immunomarquer les protéines PKA (Fig. 46b''') et Fu (Fig. 46b''''), qui contiennent les fragments N-terminaux des protéines fluorescentes, parties responsables de l'émission de la fluorescence. Nous pouvons voir que le signal YFP, spécifique de l'interaction PKA/Ci (Fig. 46b'') se superpose parfaitement avec celui de la CFP (Fig. 46b'), révélateur de l'association Fu/Ci (Fig. 46b'''''). Ce résultat indique que dans cette cellule, les protéines PKA et Fu se situent dans les mêmes complexes, mais il est cependant difficile d'affirmer que ces deux protéines forment un complexe répresseur.

En effet, plusieurs remarques doivent être évoquées pour comprendre cette observation. Tout d'abord, nous n'avons pas traité les cellules avec Hh, il est donc nécessaire de répéter cette expérience avec Hh ou Smo pour observer des variations d'interactions. De plus, étant donné que le complexe ternaire PKA/Fu/Ci existe en absence et présence d'Hh, et même si les relations entre les protéines de ce complexe sont modifiées par le signal Hh, il est probable que la technique de BiFC ne soit pas suffisamment résolutive pour observer des différences aussi spécifiques.

Afin de surmonter ces deux problèmes, nous avons choisi de remplacer le couple PKA/Ci par le couple PKA/Smo, qui est spécifique de la présence de Smo (Ranieri et al., 2014 ; Li et al., 2014). Ainsi, non seulement les cellules seront induites pour Hh, mais en plus, la technique de BiFC devrait faire la distinction entre un complexe répresseur, caractérisé par l'interaction Fu/Ci, et un complexe activateur, révélé par les interactions PKA/Smo et Fu/Ci (Fig.X.c). Comme dans la Fig. 46b, nous avons suivi l'expression des protéines Smo (Fig. 46d'''), Ci (Fig. 46d''''), ainsi que les interactions PKA/Smo en YFP (Fig. 46d'') et Fu/Ci en CFP (Fig. 46d'''''). Un signal YFP sera révélateur d'un complexe activateur dans lequel la PKA interagit avec Smo alors qu'un spot CFP, qui permet de suivre l'interaction entre Fu et Ci, pourra être observé dans les deux types de complexes. Les signaux YFP et CFP, contrairement à la Fig. 46b', ne se superposent pas tout le temps, indiquant la présence de différents complexes au sein d'une même cellule. En effet, un spot uniquement CFP (Fig. 46d') est représentatif d'un complexe répresseur (entouré en rouge) où Smo est absent (Fig. 46d'''), mais le complexe Fu/Ci est présent (Fig. 46d'''''). Une colocalisation YFP et CFP (Fig. 46d'') est caractéristique d'un complexe activateur (entouré en vert) dans lequel Smo (Fig. 46d''') et Ci (Fig. 46d''''') sont présents, et où l'on peut détecter les associations Smo/PKA (Fig. 46d'') et Fu/Ci (Fig. 46d''''').

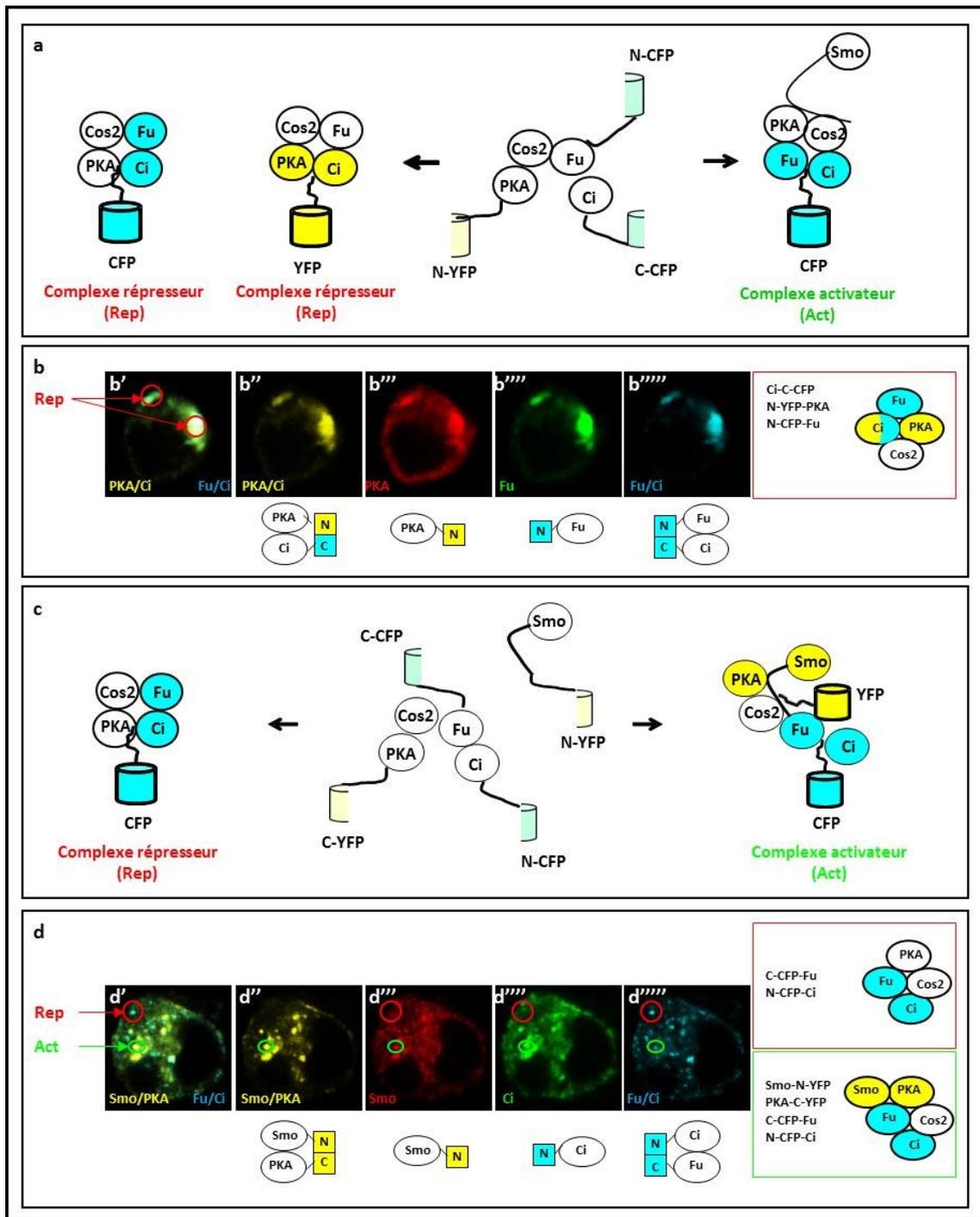


Fig. 46 : La visualisation du complexe répresseur et du complexe activateur

a) Représentation schématique de la reconstitution du signal CFP entre Flag-N-CFP-Fu et Ci3m-C-CFP-V5 et du signal YFP entre Myc-N-YFP-PKA et Ci3m-C-CFP-V5.

b) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre PKA et Ci ainsi que Fu et Ci. Les cellules sont transfectées avec les différentes protéines formant un complexe qui est indiqué sur la droite. Sous chaque panneau est représenté la (les) protéine(s) détectée(s) par l'utilisation d'anticorps, comme HA en rouge pour voir la PKA (b''') ou Flag en vert pour visualiser Fu (b''''), ou bien par l'utilisation du signal YFP, caractéristique de l'interaction PKA/Ci (b'') ou le signal CFP, représentative de l'association Fu/Ci (b'''''). La figure b' représente la superposition des marquages YFP et CFP, où les complexes répresseurs, caractérisés par les interactions PKA/Ci et Fu/Ci, sont entourés en rouge.

c) Représentation schématique de la reconstitution du signal CFP entre Flag-N-CFP-Ci et V5-C-CFP-Fu et du signal YFP entre Smo-Myc-N-YFP et HA-C-YFP-PKA.

d) Complémentation par fluorescence bimoléculaire entre Smo et PKA ainsi que Fu et Ci. Les cellules sont transfectées avec les différentes protéines formant deux types de complexes qui sont représentés sur la droite. Sous chaque panneau est annotée la (les) protéine(s) détectée(s) par l'utilisation d'anticorps, comme Myc en rouge pour visualiser Smo (d''') ou Flag en vert pour suivre Ci (d'''), ou bien par l'utilisation du signal YFP, caractéristique de l'interaction Smo/PKA (d'') ou le signal CFP, représentative de l'association Fu/Ci (d'''). La figure d' représente la superposition des marquages YFP et CFP, dans laquelle un complexe répresseur, caractérisé par l'interaction Fu/Ci, est entouré en rouge, alors qu'un complexe activateur, composé des interactions Smo/PKA et Fu/Ci, est encadré en vert.

Les résultats préliminaires obtenus lors de ces expériences de « double complémentation » permettent pour la première fois d'identifier et de distinguer à l'intérieur d'une même cellule un complexe répresseur d'un complexe activateur. Pour poursuivre ce type d'expériences, il sera nécessaire d'améliorer la résolution des images afin de pouvoir interpréter le mieux possible les données apportées lors de l'analyse par microscopie.

Conclusion

Prises ensemble, les données obtenues lors de cette étude indiquent que des changements de conformations au sein du complexe de transduction entre les protéines Fu, PKA et Smo sont responsables du passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur. En absence d'Hh, les kinases Fu et PKA interagissent avec le domaine C-terminal de Ci, formant ainsi un complexe ternaire, dans lequel l'interaction directe de la PKA avec son substrat Ci permet la formation de la forme répressive de Ci. Dans ce complexe, Fu n'est pas actif, mais a un rôle de support pour favoriser l'interaction entre la PKA et Ci. En présence d'Hh, la stabilisation de Smo induit l'éloignement de la PKA de Ci, avec pour conséquence l'activation et la relocalisation de Fu du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci. Les kinases Fu et PKA sont alors concentrées autour de la région N-terminale de Ci, formant ainsi un nouveau complexe ternaire dans lequel la PKA n'interagit plus avec Ci. Dans ce complexe, Fu va probablement phosphoryler Ci afin d'aboutir à l'apparition du Ci-Activateur (Fig. 47).

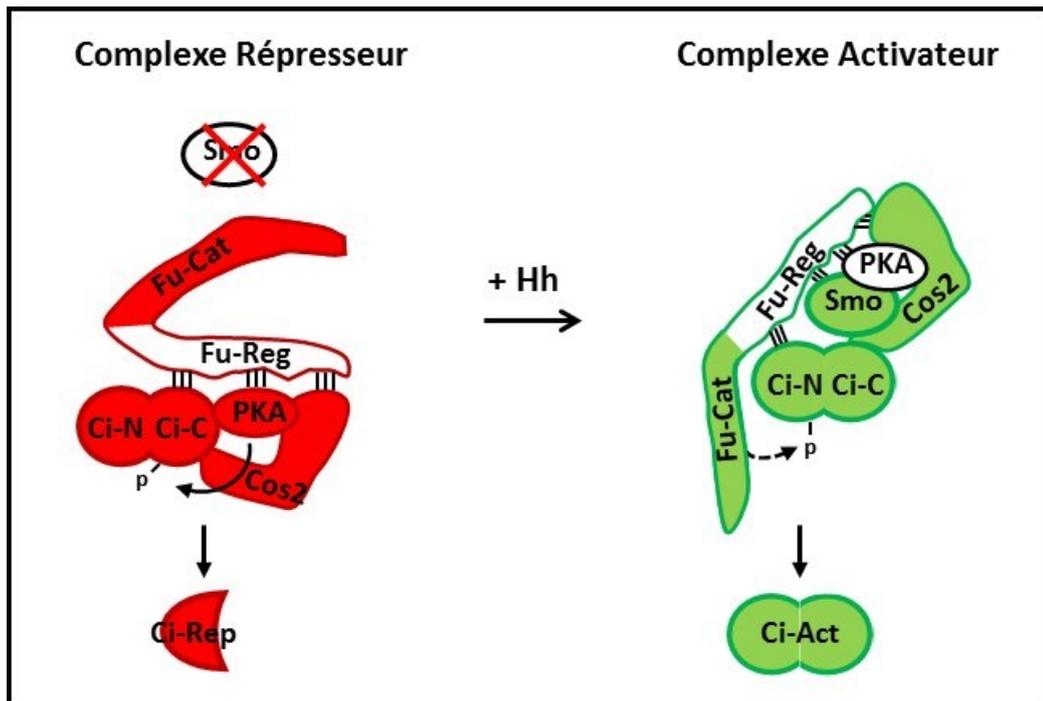


Fig. 47 : Le modèle de la transition d'un complexe Répresseur en absence d'Hh à un complexe Activateur en présence d'Hh.

En absence d'Hh, Smo est dégradé et dans le complexe PKA/Fu-Reg/Ci-C, la kinase PKA phosphoryle le domaine C-terminal de Ci, aboutissant à la formation du Ci Répresseur (Ci-Rep). La présence d'Hh induit la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo et le déplacement de la partie régulatrice de Fu du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci. La région catalytique de Fu est alors proche du domaine N-terminal de Ci où des sites putatifs de cette kinase ont été identifiés. La formation du Ci Activateur (Ci-Act), qui reste à être démontrée, est sûrement la résultante de sa phosphorylation par Fu.

Discussion

Pendant mon doctorat, j'ai étudié la transduction du signal Hh en analysant d'une part le mécanisme d'activation de la voie et d'autre part, les changements de conformation induits par Hh afin d'entraîner le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur. Dans ces deux projets, je me suis focalisée sur le rôle essentiel de la protéine Fu, qui agit comme une protéine d'échafaudage en absence d'Hh, et comme une kinase en présence d'Hh. Durant ce chapitre, j'analyserai les résultats obtenus en concentrant la discussion sur la fonction de Fu, mais également sur sa régulation par ses multiples partenaires d'interactions à l'instar des protéines PKA, Smo, Cos2, Gprk2 et Ci.

Chapitre 1 : Le mécanisme d'activation de la kinase Fused en présence d'Hh

En vue de comprendre le rôle central de la protéine Fused dans ce processus d'activation, deux questions méritent d'être élucidées : Comment la protéine Fu est activée ? Et, de quelles manières les différentes doses d'Hh sont transmises et interprétées par la kinase Fu pour aboutir à l'activation différentielle des gènes cibles de la voie Hh ?

De nombreuses publications indiquent une relation directe entre Smo et Fu (Sanial et al., 2017 ; Claret et al., 2007 ; Malpel et al., 2007, Ruel et al., 2003). De plus, il a été démontré que les différentes concentrations d'Hh sont perçues et traduites par des phosphorylations successives de la queue cytoplasmique de Smo, impliquant plusieurs kinases (PKA, CK1, Gprk2), et aboutissant à deux états d'activation de Smo qui diffèrent par leurs conformations (Zhao et al., 2007 ; Chen et al., 2010). Récemment, l'étude de Sanial et al., 2017, décrit un modèle dans lequel la kinase Fu est activée en plusieurs étapes, étapes qui sont corrélées à l'activation différentielle de Smo. L'ensemble de la littérature nous a poussés à étudier plus en détail le mécanisme par lequel Smo permet l'activation de Fu en adéquation avec les doses d'Hh reçues par les cellules.

Pour cela, nous avons procédé à une analyse structure-fonction de Smo sur l'activation de Fu. En prenant avantage des phospho-anticorps dirigés contre Cos2 qui permettent de suivre l'activation différentielle de la kinase Fu (Ranieri et al., 2012), nous avons remarqué que les 52 derniers acides aminés de Smo sont responsables de l'activation de Fu pour de hauts niveaux d'Hh. Nous avons également identifié une interaction constitutive entre Gprk2 et Fu, suggérant une fonction directe de Gprk2 dans l'activation de Fu, ce qui fait sens puisque comme Fu, la kinase Gprk2 est impliquée dans l'expression des gènes cibles de hauts niveaux d'Hh. Enfin, par des expériences BiFC, nous avons visualisé et mis en évidence des changements de conformation au sein du complexe Smo/Gprk2/Fu qui constituent la base de notre modèle de régulation de la kinase Fu.

L'ensemble de nos données, qui sera discuté dans les paragraphes suivants, suggère que l'action morphogénétique d'Hh est transmise à Fu par l'intermédiaire des différentes conformations qu'adopte Smo sous l'effet d'Hh.

1.1 Le couple Smo/Fu : senseur des différents niveaux d'Hh.

1.1.1 Le rôle des 52 derniers acides aminés de Smo dans l'activation de Fu pour des hauts niveaux d'Hh

Il a été précédemment montré que les 52 derniers acides aminés de Smo sont suffisants pour interagir avec Fu par une expérience de double hybride (Malpel et al. 2007). Dans notre étude, nous avons confirmé ce résultat par co-immunoprécipitation et également observé que l'expression de ce petit peptide (Smo^{Fu}) entraîne l'activation de la voie Hh *in vitro* et *in vivo*. De manière intéressante, Smo^{Fu} semble être impliqué, *via* son action sur Fu, uniquement dans les cellules soumises à des hauts niveaux d'Hh. En effet, l'expression de Smo^{Fu} induit l'augmentation des phosphorylations des sérines 572 et 931 de Cos2, et la phosphorylation sur la position 931 est une caractéristique d'activation de Fu pour de fortes doses d'Hh (Ranieri et al., 2012). Ce résultat est renforcé par l'analyse des gènes cibles, où l'expression de Smo^{Fu} entraîne un signal plus fort et plus étendu des gènes *ptc* et *en*, gènes s'exprimant seulement pour des niveaux forts d'Hh.

Il est à noter que l'expression des formes Smo^{Cyto} et $\text{Smo}^{\text{ASAID}}$ n'induit pas d'activation ectopique des gènes *ptc* (manuscrit ; Fig. 1c'' et d'') et *en* (manuscrit ; Fig. 1c''' et d'''), même si ces deux formes possèdent les 52 derniers acides aminés de Smo. En fait, une explication vient directement de l'analyse des structures de ces deux mutants. Smo^{Cyto} possède les sites de liaison aux protéines PKA, CK1 et GSK3, il est donc soumis à la régulation de ces kinases que j'ai décrite dans la section de l'introduction consacrée à Smo (Paragraphe 2.2.3.2.2). On peut imaginer que les quantités de PKA, CK1 et GSK3 endogènes ne sont pas suffisantes pour permettre la phosphorylation de Smo^{Cyto} et ainsi induire l'ouverture de sa conformation qui est nécessaire à la transmission du signal Hh (Zhao et al., 2007). En ce qui concerne $\text{Smo}^{\text{ASAID}}$, l'analyse de sa structure indique que cette forme de Smo ne possède pas les sites de phosphorylation aux protéines PKA/CK1 et GSK3, et ne devrait donc pas être tributaire de cette régulation négative. Cependant, la plupart des sites de fixation de la kinase CK2, qui a été récemment impliquée dans l'activation des gènes cibles de hauts niveaux d'Hh (Jia et al., 2010), sont présents. Il est probable qu'une quantité insuffisante de CK2 puisse expliquer l'absence d'activation ectopique de la voie observée avec Smo^{Fu} .

Dans la figure 3 de notre manuscrit, nous avons montré que l'effet activateur de Smo^{Fu} est dépendant de la présence de Smo endogène. En fait, si l'on s'attarde un peu plus sur le marquage de Ci dans des conditions où Smo^{Fu} est exprimé, on peut voir que la formation du Ci-Rep n'est pas affectée (manuscrit ; Fig. 1e'). Ce résultat confirme que ce peptide n'agit qu'en présence d'Hh, mais indique que sa fonction nécessite la présence d'un complexe préalablement activé. Le blocage du Ci-Rep est permis par le déplacement de la PKA de Ci vers Smo (Ranieri et al., 2014). Ce mécanisme explique pourquoi Smo^{Fu} n'est pas capable d'entraîner l'activation de la voie Hh en absence de Smo endogène (manuscrit ; Fig. 3b'''), puisque Smo^{Fu} ne possède pas le site de liaison à la PKA (manuscrit ; Fig. 1b) et n'est donc pas capable de déplacer la PKA. Une expérience intéressante pour confirmer cette

hypothèse serait d'exprimer Smo^{Fu} dans un contexte mutant pour les protéines PKA et Smo et de voir si une activation ectopique de la voie peut être observée.

Pour renforcer le rôle activateur de ce peptide, nous avons pris avantage d'une forme mutante de Smo, Smo Δ Fu (Malpel et al., 2007), dont les 59 derniers acides aminés ont été enlevés. L'expression de Smo Δ Fu induit une perte de la phosphorylation de la sérine en position 931 de Cos2 (manuscrit ; Fig. 2h et h'), démontrant que la kinase Fu et le complexe de transduction ne sont pas activés. Mais de façon paradoxale, certains gènes cibles sont activés, comme *ptc* (manuscrit ; Fig. 1g). Malpel et al., 2007 avait également observé une activation ectopique de la voie Hh, caractérisée par une augmentation de l'expression des gènes de *ptc* et *en*, loin dans l'antérieur là où les cellules ne reçoivent pas d'Hh. Bien que nous soyons en accord avec leurs résultats, nous arrivons à une interprétation différente. Avec l'aide de phospho-anticorps de Cos2 dont Malpel et al., ne disposait pas en 2007, nous sommes arrivés à la conclusion que le peptide de 52 acides aminés de Smo, en interagissant avec la protéine Fu, induit l'activation de cette kinase. Un argument en faveur de cette idée vient de l'analyse de clones exprimant Smo Δ Fu dans le compartiment postérieur, dans lesquels une perte de la phosphorylation de la sérine 931 est observée (manuscrit ; Fig. 2i''). Comment peut-on expliquer l'effet activateur de Smo Δ Fu sur les gènes cibles alors que le complexe de transduction Fu/Cos2 n'est pas activé ? La particularité de Smo Δ Fu est que cette protéine possède encore le domaine de fixation à la PKA, mais pas celui de Fu. Nous interprétons les résultats publiés précédemment par le fait que l'expression de Smo Δ Fu dans une zone où la protéine Smo n'est pas stabilisée va induire le déplacement de la PKA de Ci, bloquant la formation du Ci-Rep ce qui lève la répression des gènes cibles. Il est à noter que l'augmentation des gènes cibles, induite par Smo Δ Fu, comme *ptc*, se caractérise par une augmentation limitée. En effet, la quantité de Ptc activée n'est pas aussi forte qu'à l'A/P, suggérant que l'augmentation de Ptc observée correspond plutôt à une dé-répression qu'à une réelle activation, car le complexe Fu/Cos2 n'est pas complètement activé par le mutant Smo.

L'ensemble de nos données indique que Smo, *via* son interaction avec Fu par ses 52 derniers acides aminés, traduit les hauts niveaux d'Hh. Sachant que Smo est capable de percevoir les différentes doses d'Hh en adoptant des conformations plus ou moins actives (Chen et al. 2010), il est probable que Fu existe sous plusieurs états dans la cellule en fonction du signal Hh. Ces états d'activation de Fu ont d'ailleurs été révélés par les phosphorylations différentielles de Cos2 (Ranieri et al., 2012), mais le mécanisme d'action de Smo dans ce processus reste encore à être étudié, même s'il est évident qu'une relation directe entre ces deux protéines soit la base de ce mécanisme d'activation différentielle de Fu.

1.1.2 Le rôle de Smo dans l'activation différentielle de Fu

Contrairement à l'importance de l'activité kinase de Fu dans la régulation des gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh, qui a été validée par la communauté scientifique, le rôle catalytique de Fu sur l'expression des gènes caractéristiques des niveaux intermédiaires d'Hh

est encore débattu à l'heure actuelle. Avant mon arrivée au laboratoire, Raisin et al., 2010 ont montré que la phosphorylation de Cos2 sur la sérine 572, ainsi que l'expression de *collier*, gène activé à des concentrations moyennes d'Hh, sont perdues dans des clones exprimant une forme dépourvue d'activité kinase de Fused (Fu-KD). Ces résultats indiquent que la fonction kinase de Fu est nécessaire à la régulation de la transduction du signal pour de faibles doses d'Hh. Les conclusions de cette étude constituent une base de notre modèle dans lequel les phosphorylations de Smo par la PKA aboutissent à l'obtention du premier état d'activation de Fu, Fu-Act1, visible par la phosphorylation du résidu 572 de Cos2. Dans cet état, Fu possède une activité catalytique qui est nécessaire à l'expression des gènes cibles activés à des niveaux intermédiaires d'Hh. Un argument penchant en faveur de notre hypothèse, mais qui nécessite des expériences complémentaires, est que nous avons observé une interaction directe de Smo avec Fu *via* un autre domaine que les 52 derniers acides aminés de Smo (donnée non montrée). On peut donc imaginer un mécanisme de fermeture éclair avec une première interaction entre Fu et Smo, responsable de l'activité kinase de Fu-Act1, qui permettrait l'expression des gènes cibles activés à faibles niveaux d'Hh. Une deuxième interaction entre Fu et Smo, *via* les 52 derniers acides aminés de Smo, entrainerait une activation renforcée de l'activité kinase de Fu, Fu-Act2 dont le rôle est de permettre l'expression des gènes cibles présents pour de fortes doses d'Hh. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'enlever la première zone d'interaction entre Fu et Smo et de regarder les conséquences sur la transduction du signal Hh. Normalement, si ce mécanisme d'activation est séquentiel, ni les gènes cibles de faibles niveaux, ni ceux de hauts niveaux ne seront exprimés.

Les données apportées dans la publication de Sanial et al., 2017 ont permis aux auteurs d'émettre l'idée que l'expression des gènes cibles de hauts niveaux d'Hh serait la résultante d'un « dialogue moléculaire » entre Fu et Smo. Dans leur modèle, Fu phosphoryle Smo, et par conséquent entraîne l'hyper-activation de Smo qui, en retour, induit le second état d'activation de la kinase Fu. Cet état d'hyper-activation peut être analysé par une augmentation de la stabilité et de la localisation membranaire de Smo. Leur séduisante idée est en accord avec notre expérience de BiFC entre Smo et Fu (manuscrit ; Fig. 4, panneau de haut et i). En effet, les résultats de cette expérience confirment que la localisation membranaire de Smo/Fu est maximale dans un complexe hyperactif, mimé par la présence des kinases PKA et Gprk2 (Chen et al., 2010). Ces données viennent également confirmer une précédente étude du laboratoire (Ranieri et al., 2012), dans laquelle les auteurs avaient montré que le second état d'activation de Fu, visualisé par la phosphorylation sur la sérine 931 de Cos2, entraînait la localisation membranaire du complexe de transduction.

Afin d'analyser l'effet des différentes doses d'Hh sur l'association entre Smo et Fu, nous avons réalisé des expériences de BiFC dans le disque imaginal de l'aile (manuscrit ; Fig. 6). Une première observation est que, quelles que soient les conditions génétiques, le signal YFP est plus fort dans les cellules du compartiment postérieur où la voie Hh est constamment activée que dans les cellules loin dans l'antérieur, zone dans laquelle les cellules ne reçoivent pas d'Hh. Ce résultat est en accord avec notre modèle puisque

l'interaction entre Smo et Fu est ici caractéristique de la présence d'Hh. Cependant, l'analyse de l'interaction entre les formes sauvages de Fu et Smo, nous a quelque peu déroutés. En effet, on observe une absence de reconstitution de l'activité YFP, synonyme d'une perte d'interaction entre Smo et Fu, dans le domaine où s'expriment les gènes activés pour de hauts niveaux d'Hh, *ptc* et *en*.

Il est à noter que l'expression des protéines Smo et Fu n'est pas affectée dans cette zone (manuscrit ; Suppl. Fig. 6a et a'). Cette observation permet d'éliminer l'idée que la diminution du signal YFP soit causée par une réduction de la présence des protéines dont on a testé l'interaction, indiquant ainsi que les processus de dégradation et d'endocytose du complexe Smo/Fu ne sont pas impliqués ici. Le résultat obtenu est en contradiction avec notre expérience de BiFC *in vitro* mais également avec notre hypothèse selon laquelle l'interaction entre Smo et Fu est nécessaire à l'activation des gènes exprimés à de fortes doses d'Hh. Comme le montre la suite de la figure, nous nous sommes aperçus que les variations de l'intensité du signal YFP sont corrélées à l'expression de Ptc. En effet, la diminution de l'expression de Ptc due soit à une perte d'activité kinase de Fu (manuscrit ; Fig. 6b-b'''), soit à l'absence de Ptc (manuscrit ; Fig. 6d-d'''), de Ci (manuscrit ; Fig. 6e-e'''), ou de Gprk2 (manuscrit ; Fig. 6f-f'''), induit une reconstitution du gradient d'interaction Fu/Smo dans la zone d'action d'Hh. A l'inverse, l'expression de Smo^{Fu}, qui entraîne une expansion de Ptc (donnée non montrée), est responsable d'un agrandissement « du trou » de l'intensité YFP. Comme je l'ai mentionné plus haut, l'observation d'une diminution du signal YFP est souvent interprétée par une perte d'interaction entre les deux protéines étudiées. Néanmoins, une autre manière d'analyser ce résultat est d'imaginer que des changements de conformation puissent avoir lieu dans le complexe de transduction. Ces changements pourront entraîner un éloignement des fluorochromes et ainsi une réduction du signal YFP, qui dans ce cas-là, n'est pas causée par une dissociation des partenaires d'interaction. Des expériences complémentaires *in vitro* montrent que la protéine Ptc induit une réduction du signal YFP en BiFC entre Smo et Fu (manuscrit ; Suppl. Fig. 6b), sans entraîner de dissociation entre ces deux protéines (manuscrit ; Suppl. Fig. 6c). Sachant que le fragment YFP est placé à l'extrémité N-terminale du domaine catalytique de Fu, ces résultats montrent que la présence d'Hh entraîne un éloignement entre le domaine catalytique de Fu et Smo, visible par la diminution de l'activité recombinante YFP. La région catalytique de Fu, libre de toute contrainte, pourrait alors aller phosphoryler Cos2 et Ci dans le but de former le Ci-Act. Cette hypothèse est d'autant plus plausible car nous savons que sous l'effet d'Hh, la protéine Fu est relocalisée du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci (Fig. 44-1), fournissant ainsi une preuve dans l'hypothèse de remaniements protéiques à l'intérieur du complexe qui seraient responsables de l'activation de Ci.

Mais alors, quel est le rôle de Ptc dans le processus qui entraîne la dissociation des protéines Smo et Fu ? Etant donné qu'Hh entraîne les changements de conformation évoqués précédemment afin d'aboutir à l'expression de Ptc, il est envisageable que l'observation de la diminution du signal YFP et la présence de Ptc ne soit qu'une corrélation dans ce mécanisme.

Malgré ce résultat surprenant de l'interaction entre Smo et Fu *in vivo*, nos données appuient un modèle selon lequel les différents niveaux d'Hh sont transmis au complexe de transduction par l'intermédiaire de la régulation différentielle du couple Smo/Fu (Fig. 48).

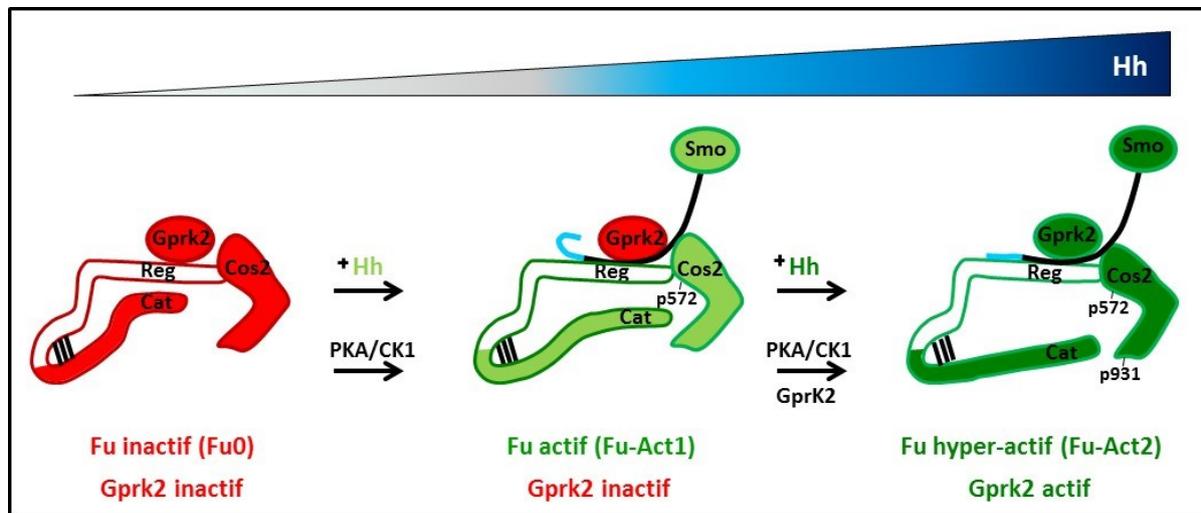


Fig. 48 : Le modèle de l'activation différentielle de Fu

En absence d'Hh, la kinase Fu est inactive (Fu0) et adopte une conformation dite « fermée » causée par l'interaction entre ses domaines régulateur et catalytique. Au sein de ce complexe répresseur, la protéine Gprk2 est présente mais inactive. Pour des niveaux faibles ou intermédiaires d'Hh, la phosphorylation de Smo par les kinases PKA et CK1 permet d'activer Fu à un premier niveau, Fu-Act1, visible par la phosphorylation de la sérine 572 de Cos2. Selon notre modèle, le couple Smo/PKA induit des changements de conformation entre le domaine catalytique et le domaine régulateur de Fu, permettant au domaine catalytique de se rapprocher de ses substrats, à l'instar de Cos2. Le complexe Smo/Fu-Act1/Cos2 est principalement localisé dans des vésicules cytoplasmiques (Ranieri et al., 2012) et dans ce complexe, Gprk2 est toujours inactive et ne semble pas avoir de fonction. En revanche, pour de fortes concentrations d'Hh, la combinaison des activités des protéines PKA/CK1/Gprk2 et le rétro-contrôle positif de Fu permet l'activation complète de Smo, qui est responsable du second niveau d'activation de Fu, Fu-Act2. La protéine Fu-Act2 se caractérise par un éloignement plus important de ses domaines régulateur et catalytique, permettant de renforcer le rapprochement de la partie catalytique de Fu avec ses substrats et d'aboutir à la phosphorylation du résidu 931 de Cos2. Le mécanisme conduisant à Fu-Act2 impliquerait une interaction entre les 52 derniers acides aminés de Smo (schématisé par un trait bleu clair) et le domaine régulateur de Fu. Le complexe Smo/Fu2/Cos2, dans lequel la forme hyper-active de Fu est capable de phosphoryler Cos2 sur les sérines 572 et 931, est retrouvé majoritairement à la membrane plasmique (Ranieri et al., 2012).

Dans ce modèle, la protéine Gprk2, que j'ai d'ailleurs déjà évoquée au cours des différentes expériences décrites plus haut, a un rôle important que je vais maintenant discuter.

1.2 La protéine Gprk2 : un acteur supplémentaire pour réguler l'activité de la kinase Fused

1.2.1 Le rôle de Gprk2 dans l'activation de Fu pour des hauts niveaux d'Hh

La protéine Gprk2 a été impliquée dans la régulation des hauts niveaux d'Hh. En effet, dans des mutants « perte de fonction » de *gprk2*, l'expression des gènes caractéristiques des hauts niveaux d'Hh est abolie alors que l'activité des gènes cibles représentatifs des niveaux intermédiaires d'Hh (Molnar et al., 2007), ainsi que la phosphorylation de Cos2 sur la sérine 572 ne sont pas affectées (Ranieri et al., 2012). Nos expériences de BiFC sont en accord avec la littérature puisque la présence de Gprk2 favorise l'association et la localisation membranaire du complexe Smo/Fu, indiquant une activation plus importante de la voie Hh (manuscrit ; Fig. 4d-d''' et i). Cet effet de Gprk2 passe par deux mécanismes distincts (Chen et al. 2010) : un mécanisme dépendant de son activité kinase (Molnar et al., 2007 ; Cheng et al., 2010) et un mécanisme indépendant de sa fonction de kinase, *via* son action sur les Pi4Ps (Jiang et al., 2016). Etant donné le rôle de Smo^{Fu} dans l'expression des gènes activés pour de fortes doses d'Hh, nous avons regardé si l'action de ce peptide est dépendante de la présence et de l'une ou l'autre des activités de Gprk2. Dans la figure 3, nous avons montré que l'activation ectopique de la voie Hh causée par l'expression de Smo^{Fu} est perdue en absence de Gprk2 (manuscrit ; Fig. 3e'et f'). Ce phénotype est également observé quand on réintroduit dans un contexte mutant « perte de fonction » pour *gprk2*, soit une forme dépourvue d'activité kinase de Gprk2 (manuscrit ; Gprk2KD ; Suppl. Fig. 3e'') soit une forme incapable de se lier au Pi4P (manuscrit ; Gprk2ΔC ; donnée non montrée), alors qu'une forme sauvage de Gprk2 sauve ce phénotype. Ces résultats indiquent que la fonction des derniers 52 acides aminés de Smo nécessite la présence d'une protéine Gprk2 possédant toutes ses capacités.

Comment interpréter le besoin de Gprk2 pour l'effet de l'extrémité C-terminale de la queue cytoplasmique de Smo ? Sachant l'importance de Fu dans l'activation de la voie pour des hauts niveaux d'Hh, il est possible que Gprk2 agisse sur Fu afin de rendre celle-ci apte à interagir avec les 52 derniers acides aminés de Smo. De manière intéressante, nous avons observé une interaction entre Fu et Gprk2 qui est augmentée en présence de Smo et d'Hh (manuscrit ; Fig. 4, panneau du bas, j et k), indiquant la formation d'un complexe ternaire entre ces protéines. A cela, s'ajoute un essai de co-immunoprécipitation qui révèle une interaction directe entre Gprk2 et Smo^{Fu} avec le domaine régulateur de Fu. De même, nos expériences en BiFC montrent que Smo^{Fu} induit des changements d'intensité YFP entre Fu et Gprk2 alors que ces deux protéines restent associées de façon constitutive. Ainsi, en raison de ces différentes expériences, nous proposons que la fixation de Smo^{Fu} au domaine régulateur de Fu induit un changement de conformation entre Gprk2 et Fu conduisant à une activation renforcée de Fu (Fig. 48).

Nos résultats suggèrent qu'une association directe entre Gprk2, Fu, et Smo semble être cruciale pour la transmission des fortes quantités d'Hh. De plus, nos données révèlent

une nouveauté : une interaction constitutive entre Fu et Gprk2. Cet aspect sera discuté dans le chapitre suivant.

1.2.2 L'identification d'un nouveau rôle du complexe Fu/Cos2 dans l'activation de Smo par Gprk2

L'analyse des expériences de BiFC *in vitro* et des immunomarquages des disques imaginaux avec Kinco, forme recombinante de Cos2, a apporté une nouvelle information qui n'avait jamais été documentée auparavant : la présence d'une interaction constitutive entre Fu et Gprk2. En effet, en exprimant Kinco, nous avons vu que Gprk2 forme un complexe avec Fu et Ci dans un contexte mutant pour *smo*, mimant ainsi l'absence d'Hh (manuscrit ; Suppl. Fig. 5b-b'''). Ceci suggère que Gprk2 s'associe de façon préférentielle au complexe Fu/Cos2, alors que dans la littérature, la protéine Gprk2 est décrite comme une kinase qui interagit avec Smo pour activer les gènes cibles présents pour de fortes doses d'Hh. Pour renforcer nos données, nous avons procédé à des immunoprécipitations, et confirmé l'interaction directe et constitutive de Gprk2 à Fu (manuscrit ; Fig. 5c). De plus, grâce à des expériences similaires, mais en jouant sur l'absence de l'une ou l'autre des protéines Smo, Fu ou Cos2, nous avons pu démontrer que Gprk2 interagit avec Fu, en particulier sur le domaine régulateur de Fu, et non pas avec Cos2.

Cette découverte, alliée à nos expériences de BiFC, nous permet de proposer un autre modèle concernant l'activation à hauts niveaux d'Hh de Smo par Gprk2. Ranieri, en 2014, a démontré que la PKA est associée au complexe Fu/Cos2, et que ce complexe participe à la phosphorylation et l'activation de Smo. Nos données actuelles montrent que ce même complexe rapproche la kinase Gprk2 de Smo afin de permettre son hyperactivation qui est caractéristique des fortes concentrations du morphogène Hh. Ainsi, dans notre modèle, quel que soit son rôle négatif ou positif, l'une des fonctions du complexe PKA/Gprk2/Fu/Cos2 est d'apporter les kinases PKA et Gprk2 à proximité de leurs substrats Smo ou Ci pour l'activer par phosphorylation. En présence d'Hh, la protéine Smo est stabilisée et incorporée dans le complexe (Lum et al., 2003 ; Ruel et al., 2003), facilitant le rapprochement et l'interaction entre Smo et les protéines PKA et Gprk2. L'étape suivante vise à comprendre comment s'effectue l'activation différentielle de Smo au sein d'un même complexe PKA/Gprk2/Fu/Cos2. Nous savons que pour des hauts niveaux d'Hh, Gprk2 est capable d'activer Smo *via* un mécanisme dépendant de son activité kinase et un mécanisme indépendant, qui met en jeu les Pi4Ps (Jiang et al., 2016). Cependant, le mécanisme par lequel Gprk2 est activé n'est pas documenté. Une hypothèse envisageable est que les Pi4Ps soient responsable de l'activation de la kinase Gprk2 afin de conduire à la formation du complexe hyper-actif. L'étude de Yavari et al., 2010 vient renforcer cette idée, puisque les auteurs ont montré que la présence d'Hh est responsable d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Pi4Ps permettant ainsi l'activation de Smo, mais révélant surtout que Gprk2 se trouve dans un environnement riche en Pi4Ps. De plus, une publication de Ziemba et al., 2013 a révélé un mécanisme dans lequel les « phosphatidylinositol-3,4-5-trisphosphate » (PIP3) sont capables d'activer la « Phosphoinositide-Dependent Kinase-1 »

(PDK1) *via* leur liaison au domaine PH de cette dernière. En effet, dans leurs travaux, les chercheurs ont montré que la phosphorylation du domaine PH de la PDK1 modifie l'affinité des PiP3s pour ce domaine, ce qui a pour conséquence la transition d'une forme dimérique à une forme monomérique de la PDK1, forme associée à l'activation de la kinase.

Un processus similaire pourrait être imaginé pour Gprk2, sauf que les Pi4Ps seraient ici responsables de l'activation de Gprk2, probablement en entraînant sa dimérisation qui a été montrée comme essentielle dans la formation de l'état hyper-activé de Smo (Chen et al., 2010). Un autre rôle des Pi4Ps, en plus de leur fonction hypothétique sur l'activation de la kinase Gprk2, pourrait être de favoriser l'action d'une protéine Gprk2 déjà fonctionnelle, en démasquant des sites de phosphorylation de cette dernière sur Smo. Ceci est appuyé par le fait que les Pi4Ps et Gprk2 se concentrent dans la même région de Smo. En effet, en 2016, Jiang et al., ont montré que les Pi4Ps se lient à Smo dans le domaine arginine aux alentours des acides aminés situés en position 730, zone qui a été préalablement identifiée comme lieu d'interaction avec Gprk2 (Chen et al., 2010). Ainsi, dans ce micro-domaine, la liaison des Pi4Ps à Smo pourrait entraîner des modifications conformationnelles de sa structure, laissant apparaître les sites de phosphorylations de la kinase Gprk2 comme la sérine 741 ou la thréonine 742 (Li et al., 2012 ; Fig. 21). Des analyses plus poussées sur la relation entre les Pi4Ps, Smo et Gprk2 devront être faites pour mieux comprendre le rôle des Pi4Ps dans l'activation différentielle de Smo au sein du complexe PKA/Gprk2/Fu/Cos2.

1.3 L'activation de la kinase Fused : une histoire de conformation ?

En 2004, Ascano et Robbins ont présenté un modèle innovant afin d'expliquer l'activation de la kinase Fu. Selon les auteurs, en absence d'Hh, le domaine régulateur interagit avec le domaine catalytique de Fu, induisant une conformation fermée et inactive de la kinase. La présence d'Hh serait responsable de la dissociation de l'interaction entre les deux domaines de Fu, libérant le site catalytique de Fu et permettant ainsi son activation (Fig. 33). Dans un premier temps, nous avons testé ce modèle en réalisant des expériences d'immunoprécipitation entre les deux régions de Fu. Nous avons pu visualiser une interaction entre la partie catalytique et la partie régulatrice de Fu, mais malheureusement nous n'avons pas révélé de variation de cette association sous l'effet d'Hh. Sachant que nous voulons montrer des remaniements intra-moléculaires, il est probable que la technique d'immunoprécipitation ne soit pas adaptée à ce genre d'analyse.

De manière surprenante, nous avons observé que l'association du domaine catalytique de Fu avec son domaine régulateur conduit à une kinase active capable de phosphoryler la protéine Cos2 (manuscrit ; Fig.7c). En revanche, la perte du domaine régulateur, ou une délétion du site de fixation du domaine catalytique dans le domaine régulateur conduisent à la perte de la phosphorylation de Cos2 (manuscrit ; Suppl. Fig. 7a et b). Ce résultat suggère que l'une des fonctions du domaine régulateur pourrait être de rapprocher le domaine catalytique de Fu des substrats à phosphoryler. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé la technique de BiFC dans le but de visualiser les différentes conformations qui ont lieu entre les domaines catalytique et régulateur de Fu, et de

déterminer l'effet de ces changements sur la phosphorylation de Cos2 en fonction du signal Hh. Sachant que Gprk2 intervient dans l'activation différentielle de la kinase Fu, nous avons décidé de mimer les différents niveaux d'Hh en utilisant soit une forme mutante de Gprk2 dépourvue d'activité kinase, représentative des faibles doses d'Hh, soit une forme sauvage de Gprk2, caractéristique des hautes concentrations d'Hh. Ceci nous a permis d'une part, de mesurer l'importance de Gprk2 dans ces changements de conformation, et d'autre part, de déterminer son impact sur la phosphorylation de Cos2.

Pour cela, nous avons placé le premier fluorochrome en N-terminal du domaine catalytique de Fu, et le second à l'extrémité C-terminale de Cos2, et analysé l'intensité du signal YFP en présence du domaine régulateur et des différentes formes de Gprk2 (manuscrit ; Fig. 7d). De manière intéressante, un signal YFP est quantifiable en présence d'Hh, caractéristique d'une interaction ou d'une proximité entre le domaine catalytique de Fu et son substrat Cos2. Ceci semble être corrélé avec la phosphorylation de Cos2 sur la sérine 572. De plus, la présence d'une Gprk2 sauvage augmente cette proximité et conduit à la phosphorylation de Cos2 sur la sérine 931, suggérant un rapprochement renforcé ou une ouverture du domaine catalytique vers son substrat Cos2 (manuscrit ; Fig. 7e). Ce résultat semble confirmer, en partie, l'hypothèse d'Ascano et Robbins émise en 2004, et indique qu'une fois encore, Hh induit des changements structurels des protéines appartenant au complexe de transduction. Néanmoins, comme je l'ai évoqué dans le paragraphe traitant du rôle de Smo dans l'activation différentielle de Smo, nous pensons qu'il existe au moins deux états d'activation de Fu qui pourraient être expliqués par des conformations différentes de la protéine Fu (Fig. 48). Actuellement, nous avons mis en évidence ces 2 états de conformation grâce à des expériences de BiFC entre le domaine catalytique et Cos2, alors que la technique d'immunoprécipitation, ne nous a pas permis de visualiser des changements d'interaction entre les domaines régulateur et catalytique de Fu. Des expériences complémentaires, menées à l'aide d'autre technique à l'instar du FRET, pourront permettre d'affiner ces différents états d'activation de Fu.

Une autre question reste en suspens, comment Hh induit l'ouverture de Fu ? Dans leur papier de 2011, Zhou et Kalderon ont montré qu'Hh entraîne de nombreuses phosphorylations sur la protéine Fu, causées soit par la kinase Fu elle-même, soit par la kinase CK1. Cependant, selon les auteurs, il n'existe pas d'interaction intra-moléculaire entre les deux domaines d'une protéine Fu, mais il s'agit d'une association entre le domaine catalytique d'une molécule de Fu et le domaine régulateur d'une autre molécule de Fu. Cette association permet des phosphorylations croisées sous l'effet d'Hh, et ainsi l'activation de la kinase Fu. Dans ce raisonnement, Il est évident que Fu ne peut s'auto-phosphoryler qu'après avoir été activée, probablement par les phosphorylations de la CK1. Nous sommes d'accord avec le fait que des phosphorylations initiées par le signal Hh puissent activer Fu, mais nous pensons que l'interaction se fait entre les deux domaines d'une même protéine Fu et non pas entre des domaines de deux molécules de Fu différentes. Un argument en faveur de cette hypothèse est qu'une protéine Fu inactive (Fu-KD) n'est jamais phosphorylée par une Fu-WT (donnée non montrée). L'analyse par FRET ou BiFC de la structure de formes

de Fu dont l'activité kinase a été soit éliminée (Fu-KD), soit rendue constitutivement active (Fu-EE) pourrait s'avérer nécessaire pour prouver notre modèle.

L'ensemble de nos données suggère que le signal Hh induit des changements de conformation à l'intérieur de la protéine Fu afin de rapprocher le domaine catalytique de Fu de ses substrats qui sont associés au domaine régulateur.

Dans ce chapitre, j'ai tenté d'apporter des arguments afin d'illustrer un modèle expliquant comment Hh, *via* son action sur les protéines Smo et Gprk2, permet l'activation différentielle de la kinase Fu (Fig. 48). Ces états d'activation de la kinase Fu en fonction de la quantité d'Hh sont probablement causés par des interactions avec différentes protéines et également des phosphorylations de la kinase Fu. L'addition de ces deux processus induit des changements de conformation de la structure de Fu, afin de libérer progressivement le site catalytique de la kinase, et de permettre ainsi les phosphorylations différentielles de Cos2 et probablement celles de Ci (Chapitre 3 de la discussion) pour obtenir une activation des gènes cibles de la voie adaptée aux doses d'Hh perçues par la cellule.

Dans le chapitre suivant, je me suis intéressée au rôle de la protéine Fu en absence d'Hh dans le complexe répresseur, et en présence d'Hh au sein du complexe activateur, dans lequel l'activité kinase Fu est essentielle pour permettre la formation du Ci-Activateur.

Chapitre 2 : La transition d'un complexe répresseur en absence d'Hh à un complexe activateur en présence d'Hh

Dans la signalisation Hh, le complexe de transduction joue un rôle décisif dans la répression, en absence d'Hh, ou l'activation, en présence d'Hh, des gènes cibles de la voie. La composition de ce complexe est sensiblement identique, si ce n'est l'insertion de Smo en présence d'Hh. C'est d'ailleurs la protéine Smo qui est l'initiateur des changements de conformation intra-moléculaire mais aussi inter-moléculaire qui permettent d'aboutir à l'activation du signal. En effet, dans les cellules réceptrices, Hh permet la stabilisation de Smo, qui va alors entrer et remporter la compétition contre Ci pour la liaison à la PKA, entraînant une relocalisation de la PKA au sein du complexe de transduction (Ranieri et al., 2014). En fonction des quantités d'Hh perçues, Smo adopte des conformations plus ou moins actives afin de transmettre l'information de concentrations différentielles d'Hh à la kinase Fu, par les mécanismes évoqués plus haut. L'observation de tels changements de conformation entre des protéines appartenant à un même complexe, nous a amenés à nous demander si la présence d'Hh pouvait induire des processus similaires plus en aval dans la voie qui pourraient expliquer la formation du Ci en activateur.

Une façon de répondre à cette problématique est d'analyser les différences structurales entre le complexe répresseur et le complexe activateur. Les données apportées par la littérature, ainsi que nos résultats indiquent qu'en absence d'Hh, le complexe de transduction se compose des protéines PKA, Fu, Cos2, Gprk2, Ci. Au sein de ce complexe répresseur, Ranieri et al., 2014 ont montré que Fu rapproche la PKA de son substrat Ci qui est lié à la kinésine Cos2. Les résultats de cette publication indiquent que la maturation du Ci-Rep nécessite la présence de la protéine Fu, protéine dont l'activité kinase est cruciale dans le mécanisme d'activation (Alves et al., 1998). Ainsi, Fu exerce une fonction à la fois en absence et en présence d'Hh, suggérant que Fu pourrait avoir un rôle majeur dans le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur.

Pour étudier comment Fu, en plus des protéines PKA et Smo, participe aux changements de conformation qui permettent de différencier les complexes de transduction en fonction du signal Hh, nous avons analysé l'importance de l'état d'activation de Fu en absence ou en présence d'Hh. Nous avons démontré que la présence d'Hh active Fu, entraînant une augmentation de la phosphorylation de Ci qui est associée à l'activation des gènes cibles de la voie Hh *in vivo*. En plus de la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo, nous avons révélé qu'Hh induit un nouveau changement de conformation au sein du complexe de transduction. En effet, en présence d'Hh, Fu se déplace du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci, dans lequel nous avons pu identifier des sites putatifs de phosphorylation de Fu. Des expériences de co-immunoprécipitation et de BiFC *in vitro* et *in vivo*, nous ont permis de mieux caractériser les différences d'interactions entre les protéines du complexe en absence ou présence d'Hh. Ainsi un complexe répresseur est caractérisé par les interactions de la PKA et Fu avec la partie C-terminale de Ci, alors que l'association entre la

PKA et Smo ainsi que l'interaction entre Fu et la région N-terminale de Ci sont représentatives d'un complexe activateur.

Notre étude, qui devra être poursuivie par des expériences complémentaires et qui va être discutée dans le chapitre suivant, suggère un rôle majeur de l'axe PKA/Smo/Fu dans la transition d'un complexe répresseur, en absence d'Hh, à un complexe activateur en présence d'Hh.

2.1 Fu exerce une fonction indépendante de son activité kinase afin de réguler l'interaction entre la PKA et Ci

Il a été montré que l'interaction entre la PKA et Ci en absence d'Hh, a lieu dans le complexe Fu/Cos2 (Ranieri et al., 2014). Cependant, dans leur expérience, les auteurs ont utilisé une forme sauvage de Fu, alors qu'en absence d'Hh la kinase Fu ne possède pas d'activité. Pour affiner leur étude, nous avons choisi de reproduire cet essai en utilisant une Fu-KD, mimant ainsi un complexe Fu/Cos2 répresseur qui est représentatif de l'état dans lequel se trouvent des cellules ne recevant pas de signal Hh. Par des expériences de BiFC *in vitro*, nous avons pu confirmer d'une part, que l'interaction entre la PKA et Ci est maximale en présence des protéines Fu et Cos2 (Fig. 41), et d'autre part, que l'activité kinase de Fu n'est pas nécessaire à cette interaction, puisque l'interaction entre la PKA et Ci est identique quel que soit l'état d'activation du complexe Fu/Cos2 (Fig. 42). Ces résultats, associés à ceux de Ranieri et al. 2014, nous ont permis de conclure que le complexe Fu/Cos2, dans un état répresseur, agit comme une plateforme afin de mettre en proximité la kinase PKA de son substrat Ci. Ainsi, comme l'avait suggéré Alves et al., 1998, Méthot et Basler, 2000, et plus récemment Ranieri et al., 2014, la protéine Fu peut être qualifiée de « régulateur », impliquée dans la formation du Ci-Rep en absence d'Hh, car elle a un rôle essentiel dans l'association et la phosphorylation de Ci par la PKA.

En présence d'Hh, la protéine Smo est stabilisée et s'insère dans le complexe, induisant la rupture de l'interaction entre la PKA et Ci (Ranieri et al., 2014). Etant donné qu'Hh est responsable de l'activation de la kinase Fu, il est tout à fait envisageable que Fu contribue en partie à la dissociation des protéines PKA et Ci. Néanmoins, nos expériences de BiFC indiquent que la perte d'interaction entre la PKA et Ci en présence d'Hh est indépendante de l'activité kinase de Fu (Fig. 42), confirmant que Smo est la seule protéine qui régule cette association.

Nos données montrent une relocalisation de la PKA dans le complexe de transduction sous l'effet d'Hh. Cette relocalisation permet, d'une part, d'empêcher la maturation de Ci-155 en Ci-Rep, et d'autre part, d'activer Smo qui va entraîner la formation du complexe activateur, notamment en déclenchant l'activation de la kinase Fu puis de Ci, comme je l'ai mentionné dans le chapitre 1 de cette discussion.

2.2 Le rôle de la kinase Fu dans la régulation de Ci

2.2.1 La formation du Ci-Activateur : implication de phosphorylations par la kinase Fu ?

De nombreuses publications ont montré que l'activation de la kinase Fu par Hh est nécessaire à l'expression des gènes cibles de la voie. Ceci suggère une probable fonction de Fu sur la formation du Ci-Act au sein du complexe de transduction qui est maintenant qualifié d'activateur en raison de la présence d'Hh. Cependant, jusqu'à présent, aucun lien n'avait été fait entre ces deux protéines, et nos résultats, que nous allons discuter dans les paragraphes suivants, établissent clairement une relation directe entre Fu et Ci.

L'analyse par Western Blot de l'état biochimique de la protéine Ci en présence de différentes protéines, dans des cellules induites ou non pour Hh, ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des phosphatases, nous a permis de démontrer que Ci est phosphorylée en présence d'Hh. Cette phosphorylation est dépendante d'une forme de Fu activée (Fig. 37a), et est augmentée par Smo (Fig. 37d). Suite à cette observation, nous avons cherché et identifié des sites putatifs de phosphorylation de Fu dans le domaine N-terminal de Ci, dont la fonction sur Ci a été validée par des expériences de Western Blot et par des mesures d'activité transcriptionnelle à l'aide de gènes rapporteurs. Néanmoins, l'expression des protéines Fu et Ci dans un système de baculovirus, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse des formes de Ci phosphorylées par Fu, sera nécessaire pour confirmer ces sites. De manière intéressante, nous avons remarqué que les séquences potentielles de phosphorylation de Fu sur Ci se situent proche du domaine de fixation de Sufu (Methot et Basler, 2000 ; Monnier et al., 1998), mais aussi de HIB, protéine appartenant au complexe ubiquitine ligase E3 de type CBC (Zhang et al., 2006). Ces deux protéines ont des actions opposées concernant la stabilité de Ci, puisque l'expression de Sufu abolit la dégradation de Ci causée par HIB, indiquant que Sufu stabilise Ci (Zhang et al., 2009). Ainsi, le domaine N-terminal de Ci est le lieu d'une compétition entre Sufu et HIB pour la régulation de l'homéostasie cellulaire de Ci. Sachant que, sous l'effet d'Hh, la kinase Fu est activée et phosphoryle Sufu (Shi et al., 2011 ; Lum et al., 2003) et Ci, il est probable que la phosphorylation de Ci par Fu renforce le rôle protecteur de Sufu vis à vis de Ci, et favorise ainsi sa translocation dans le noyau (Shi et al., 2011 ; Sisson et al., 2006). Cependant, l'étude récente Oh et al., 2015, a montré que la phosphorylation de Sufu par Fu n'a aucun rôle fonctionnel dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Ci en présence d'Hh. En effet, la mutation des sites de phosphorylation de Fu sur Sufu ainsi que la délétion du domaine d'interaction entre Sufu et Fu n'empêchent pas l'activation de Ci *in vitro* et *in vivo*. De ce fait, et malgré le rôle primordial de Sufu chez les vertébrés, il semblerait que la protéine Sufu n'est pas de fonction chez la Drosophile en présence d'Hh.

Contrairement aux phosphorylations de Fu sur Sufu, la phosphorylation de Fu sur Ci a une importance dans le mécanisme d'activation de Ci. Afin de renforcer l'idée que la kinase Fu est responsable de la formation du Ci-Act en présence d'Hh, nous avons évalué l'effet d'une forme de Fu constitutivement activée (Fu-EE) dans des disques sauvages ou mutants

pour *smo*, qui code pour une protéine essentielle dans le passage d'un complexe répresseur à un complexe activateur. De manière intéressante, l'expression de Fu-EE dans des disques où Smo a été enlevé par *ARNi*, révèle une absence d'activation des gènes cibles de la voie, alors que Fu-EE est capable de phosphoryler Cos2. L'analyse en immunofluorescence révèle que l'expression de Fu-EE dans un contexte mutant pour *smo* induit la production constitutive du Ci-Rep. Ce résultat apparait tout à fait paradoxal, puisqu'on a un complexe Fu/Cos2 activé par phosphorylation, qui conduit à la formation de l'isoforme répressive de Ci et non activatrice. Mais ce paradoxe est en accord avec le papier de Ranieri et al., 2014, puisque l'absence de Smo, empêche la relocalisation de la PKA au sein du complexe de transduction. De ce fait, la PKA reste associée à Ci, formant inlassablement du répresseur, alors que le complexe Fu/Cos2 est activé par phosphorylation. L'analyse de disques d'ailes dans lesquels la forme Fu-EE est exprimée en absence des protéines Smo et PKA sera nécessaire pour valider cette interprétation. Dans cette expérience, on s'attend à une activation ectopique de la voie Hh, car le Ci-Rep ne peut plus être formé alors que Fu va constamment phosphoryler et activer Ci155.

Nos données indiquent que Fu permet la formation du Ci-Act, probablement par phosphorylation, conduisant à l'activation des gènes cibles de la voie. La possibilité que Fu phosphoryle Ci sous-entend l'existence d'une interaction directe entre Fu et Ci, association que j'ai montrée dans les résultats et qui mérite d'être discutée dans le paragraphe ci-dessous.

2.2.2 L'interaction entre Fu et Ci : un changement de conformation de plus dans le complexe de transduction sous l'effet d'Hh !

L'étude du rôle de la kinase Fu sur la protéine Ci, nous a conduit à analyser et découvrir une interaction constitutive entre Fu et Ci par l'utilisation de différentes techniques comme la co-immunoprécipitation et la BiFC. Ce résultat nous a d'abord quelque peu surpris, car nous pensions visualiser cette interaction seulement en présence d'Hh, condition où la kinase Fu est supposée agir sur Ci, et non pas en absence d'Hh. Cependant, Ranieri et al., 2014 ont montré qu'en absence d'Hh, la PKA interagit avec la région C-terminale de Ci (Ci-C), et que Fu forme un complexe stable avec la PKA, indiquant la présence d'un complexe ternaire entre ces protéines. De plus, j'ai montré que Fu est également capable d'interagir directement avec l'extrémité C-terminale de Ci. Les expériences de BiFC réalisées entre Fu et Ci, nous ont aussi révélé une augmentation de cette interaction en présence d'Hh, suggérant un rapprochement des fluorochromes, probablement causé par un changement de conformation entre ces deux protéines. Sachant que nous avons localisé des sites putatifs de phosphorylation de Fu dans la partie N-terminale de Ci (Ci-N), nous avons émis l'hypothèse que la présence d'Hh puisse être responsable d'une relocalisation de Fu de Ci-C à Ci-N. Cette idée a été validée à la fois par l'utilisation des techniques de BiFC (Fig. 44-1) et de co-immunoprécipitations (Fig. 44-2c), dans lesquelles des fragments de la protéine Ci ont été utilisés. De façon intéressante, quand Fu interagit avec Ci-N, il emmène avec lui la PKA, formant ainsi un autre complexe ternaire,

concentré cette fois-ci vers Ci-N (Fig. 45d). Néanmoins la conformation entre les protéines PKA/Fu/Ci n'est pas la même selon la localisation des kinases PKA/Fu du côté Ci-N ou Ci-C, car la PKA n'est pas capable d'interagir avec Ci-N. Sachant que l'association entre les protéines PKA/Fu/Ci-N est représentative de la présence d'Hh, puisque que Fu interagit préférentiellement avec Ci-N quand les cellules sont traitées avec Hh (Fig. 44-1f, g, h, i et Fig. 45b), il est logique que la PKA n'interagisse pas avec Ci puisque le signal Hh bloque la PKA par sa relocalisation vers Smo.

Ces résultats, associés à ceux de la littérature, nous ont permis de mieux comprendre l'effet d'Hh sur les interactions différentielles entre les protéines du complexe de transduction. Dans le complexe répresseur, les kinases PKA et Fu s'associent chacune avec le domaine C-terminal de Ci aboutissant à la formation du Ci-Rep. Dans cette configuration, Fu n'est pas actif alors que la PKA, par proximité, va phosphoryler et permettre ainsi la maturation de Ci en répresseur. La présence d'Hh entraîne la relocalisation de la PKA vers Smo, ce qui a pour conséquence l'éloignement de la PKA de Ci. Dans cette conformation, Smo bloque la fonction de la PKA sur Ci, mais active la kinase Fu par directe interaction, qui va, par proximité, phosphoryler l'extrémité N-terminale de Ci, entraînant probablement la formation du Ci-Act. Une des explications possibles du déplacement de Fu vers Ci-N est d'imaginer que le départ de la PKA induise la libération d'un espace autour de Ci, laissant à Fu un accès pour se mouvoir de Ci-C à Ci-N. Une façon de vérifier cette théorie serait de mesurer l'interaction entre Fu et Ci dans des cellules où la PKA a été enlevée par *ARNi*. Dans cette expérience, l'absence de la PKA devrait avoir pour conséquence une augmentation de l'interaction Fu/Ci similaire à celle observée quand on compare des cellules traitées ou non avec Hh.

Dans cette partie de la discussion consacrée à la régulation de Ci par la kinase Fu, nous avons pu nous rendre compte que la fonction de Fu sur Ci est dépendante des autres protéines du complexe, en particulier de la PKA et Smo. Les trois protéines PKA/Fu et Smo jouent un rôle crucial dans la régulation de Ci en absence ou en présence d'Hh, en raison des connexions qu'elles tissent les unes avec les autres. La visualisation de ces associations différentielles, qui va être discutée dans le paragraphe suivant, constitue une manière d'analyser l'effet d'Hh sur le complexe de transduction et les gènes cibles de la voie.

2.3 La détection des complexes répresseurs et activateurs : un nouvel outil dans l'étude de la voie Hh.

Comme nous l'avons vu dans l'ensemble de ce chapitre, les interactions entre les protéines du complexe de transduction varient en fonction du signal Hh. En absence du morphogène, les interactions entre PKA et Ci, ainsi que Fu et Ci-C, sont caractéristiques du complexe répresseur alors que le complexe activateur, visible en présence d'Hh, est révélé par les associations entre la PKA et Smo, mais également Fu et Ci-N.

Nos résultats démontrent que globalement, Hh exerce une action opposée sur les interactions PKA/Smo et Fu/Ci, caractéristiques d'un complexe activateur et PKA/Ci,

représentative du complexe répresseur. En effet, dans les cellules recevant le signal Hh, l'interaction entre Fu et Ci est augmentée et l'ajout de Smo permet de visualiser un gradient du complexe Fu/Ci dans le domaine d'action d'Hh (Fig. 46a'' et b''). Il en est de même pour l'association entre PKA et Smo qui est favorisée dans le compartiment postérieur et proche de l'A/P, deux zones où la voie Hh est activée (Fig. 43f''). L'analyse de l'intensité de la reconstitution de l'activité YFP pour l'interaction entre la PKA et Ci révèle un profil inversé, en comparaison aux complexes PKA/Smo et Fu/Ci. En effet, le signal YFP est plus fort dans le compartiment antérieur que dans le compartiment postérieur, confirmant que l'association entre PKA et Ci est caractéristique de l'absence d'Hh. L'utilisation de ces interactions différentielles, dans des conditions génétiques où le gradient d'Hh est altéré, pourrait être intéressante afin de corréliser la quantité d'Hh à l'état d'activation du complexe et à l'expression des gènes cibles de la voie.

Nous avons ensuite poussé l'analyse un peu plus loin en tentant de visualiser les deux complexes, répresseur et activateur, au sein d'une même cellule. Pour cela, nous avons profité de l'interaction entre Fu et Ci qui se déroule dans les deux types de complexes et réalisé une expérience de double complémentation en utilisant les associations Fu/Ci et PKA/Smo. Comme nous le montre la Fig. 46d, nous avons été capables de détecter spécifiquement un complexe répresseur d'un complexe activateur. En effet, dans les cellules où Smo est présent, nous avons pu faire la distinction entre les complexes activateurs, visualisés par les associations entre Smo/PKA et Fu/Ci, et les complexes répresseurs, détectés par l'interaction entre Fu et Ci et dans lesquels l'association entre Smo et PKA est absente.

Cependant, étant donné notre modèle dans lequel des événements de relocalisation ont lieu au sein d'un même complexe et où la distance entre chaque protéine est faible, il serait intéressant d'utiliser une technique complémentaire à la BiFC, à l'instar du FRET, ou bien de combiner ces 2 techniques. En comparaison avec la BiFC, qui permet de visualiser une interaction entre des protéines situées à 50nm de distance, le FRET révèle une interaction seulement si les deux partenaires sont distants de 10nm, rendant cette technique plus sensible que la BiFC. Le revers de la technique de FRET est que l'interaction n'est pas directement visualisable, puisqu'il est nécessaire de faire des analyses quantitatives des données obtenues aux microscopes. Enfin, pour une meilleure quantification des complexes répresseurs et activateurs dans différentes conditions, des améliorations techniques et une meilleure résolution dans l'acquisition des images doivent être faites.

L'ensemble des données *in vivo* et *in vitro* obtenu lors de l'étude des associations PKA/Ci, Smo/PKA et Fu/Ci confirment nos résultats précédents en ce qui concerne les différences d'interactions entre un complexe répresseur et activateur. De plus, l'analyse des relations entre les protéines du complexe apporte un nouvel outil pour mieux comprendre comment le morphogène Hh induit l'expression différentielle de ses gènes cibles. En effet, même s'il est admis que ce sont les proportions de Ci-Rep, Ci-155 et Ci-Act qui sont

responsables de l'activation des gènes en fonction des niveaux d'Hh, l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre les formes répressives et activatrices de Ci empêche de visualiser toutes les isoformes de Ci. Ainsi, l'utilisation des interactions différentielles pourrait permettre de corrélérer l'expression des gènes cibles aux niveaux relatifs des complexes répresseurs, caractéristiques du Ci-Rep, et des complexes activateurs, représentative du Ci-155 et du Ci-Act, en fonction du signal Hh. Un dernier point important qui mérite d'être abordé, est qu'avec ces interactions, nous pouvons certes différencier un complexe répresseur d'un complexe activateur, mais il existe deux complexes activateurs en fonction des quantités d'Hh. Les conformations différentielles de Smo, ainsi que la relation entre le couple Smo/Fu caractérisent les formes plus ou moins actives de ce complexe. D'ailleurs, nous avons suggéré dans le chapitre 1 de la discussion que la capacité de Smo à interagir sur deux domaines de Fu pouvait expliquer les deux états d'activation de la kinase Fu. Il est tout à fait possible d'imaginer que la comparaison d'autres interactions, à l'instar de Fu/Ci-N et Fu/Smo, en jouant sur la position du fragment fluorescent sur Fu, pourrait permettre de différencier un complexe moins actif d'un complexe hyper-actif. Cette transition implique aussi l'action de Gprk2, et des expériences complémentaires devront être réalisées afin de mieux définir les étapes qui permettent d'aboutir aux différents complexes activateurs.

Conclusion

Les résultats obtenus durant mon doctorat, en association avec les données de la littérature, nous ont permis de résumer la cinétique des évènements de la transduction du signal Hh dans la Fig. 49.

En absence d'Hh, Ptc inhibe Smo en provoquant son ubiquitination qui conduit à sa dégradation *via* le protéasome et les lysosomes (Xia et al., 2012 ; Li et al., 2012). Le complexe cytoplasmique composé des protéines PKA/Fu/Cos2/Gprk2/Ci est alors qualifié de répresseur. Dans ce complexe, la protéine Fu apporte la PKA à son substrat Ci-155, plus précisément dans le domaine C-terminal de Ci-155, région par laquelle cette dernière interagit également avec Cos2 (Wang et al., 2000). La kinésine Cos2 est aussi associée aux kinases CK1 et GSK3, créant ainsi un environnement qui concentrent les protéines PKA, CK1 et GSK3 afin de favoriser la phosphorylation séquentielle de Ci-155, d'abord par la PKA puis par GSK3 et enfin par CK1 (Price et Calderon, 2002 ; Jia et al., 2002 ; Jia et al., 2005). Les phosphorylations multiples de Ci-155, et en particulier la phosphorylation due à CK1, entraîne la reconnaissance de Ci-155 par la protéine Slimb qui appartient au complexe ubiquitine ligase E3 de type SCF. Le SCF induit l'ubiquitination de la protéine Ci-155 qui est alors reconnue et dégradée partiellement par le protéasome afin d'aboutir à la formation du Ci-Rep (Jia et al., 2005 ; Smelkinson et Calderon, 2006 ; Smelkinson et al., 2007). Une fois mûré, le facteur de transcription Ci sous sa forme répressive, se dissocie du complexe et entre dans le noyau où il réprime ses gènes cibles (Hepker et al., 1997; Aza-Blanc et al., 1997).

La présence d'Hh bloque l'activité inhibitrice de Ptc sur Smo, permettant l'arrêt de la dégradation de Smo ce qui entraîne l'accumulation et la stabilisation de cette dernière à la membrane plasmique (Xia et al., 2012 ; Li et al., 2012). Smo va ensuite interagir avec Cos2, ce qui a pour conséquence son incorporation dans le complexe cytoplasmique (Ruel et al., 2003 ; Lum et al., 2003 ; Ogden et al., 2003). La présence de Smo au sein du complexe induit le déplacement de la PKA de Ci-155 vers Smo, causée par une affinité plus forte de la PKA pour Smo que pour Ci-155 (Ranieri et al., 2014). En fonction des doses d'Hh perçues par les cellules, la phosphorylation de Smo par les kinases PKA, CK1, GSK3 et Gprk2 ainsi que l'action de Fu vont permettre la formation de complexes plus ou moins actifs afin de réguler l'activation différentielle des gènes cibles de la voie Hh. A des faibles niveaux d'Hh, la phosphorylation de Smo par les kinases PKA/CK1 et GSK3 induit l'ouverture de l'extrémité C-terminale et la dimérisation de Smo (Zhang et al., 2004 ; Zhao et al., 2007), qui va interagir une première fois avec Fu. Ce contact entraîne le premier état d'activation de Fu, caractérisé par la phosphorylation de la sérine 572 de Cos2, qui permet l'activation partielle de Ci-155 (Raisin et al., 2010 ; Ranieri et al., 2012). D'après nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que dans ce complexe moins actif, la kinase Fu s'est probablement déjà relocalisée du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci permettant à la kinase Fu de phosphoryler Ci à un premier niveau. Ainsi, selon notre modèle, le Ci-155 peut-être renommé Ci-Act1, afin de renforcer l'idée d'un premier état d'activation de Ci par Fu. Pour de fortes doses d'Hh, la phosphorylation et donc l'activation de Smo est augmentée par l'action combinée des kinases PKA/CK1/GSK3, de Gprk2 (Molnar et al., 2007 ; Cheng et al.,

2010 ; Chen et al., 2010) et de Fu (Sanial et al., 2017). La protéine Gprk2 agit en renforçant la dimérisation des extrémités C-terminales de Smo *via* son activité kinase et par son association aux Pi4Ps (Jia et al., 2016). Selon nos données, nous pouvons imaginer que ce changement de conformation dans la queue cytoplasmique de Smo entraîne une deuxième interaction de Smo sur Fu, par l'intermédiaire des 52 derniers acides aminés de Smo (Malpel et al., 2007). Cette association aboutit au second état d'activation de Fu, révélé par la phosphorylation des sérines 572 et 931 sur Cos2 (Ranieri et al., 2012), qui induit la présence d'une forme plus activée de Ci nommée Ci-Act2, qui serait probablement hyperphosphorylée par Fu.

Même si des expériences complémentaires devront être menées pour valider notre modèle, l'ensemble de mon travail de doctorat permet de mieux comprendre le rôle de Fu et la composition du complexe de transduction en fonction du signal Hh.

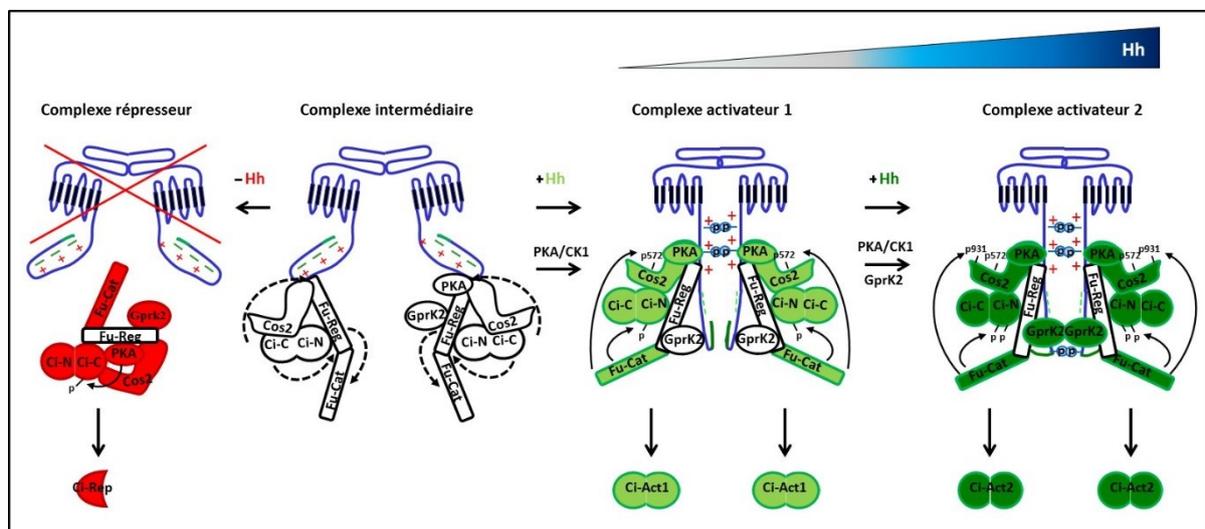


Fig. 49 : Le modèle de transduction du signal Hh

En absence d'Hh, Smo est dégradé, et au sein du complexe répresseur, les protéines Fu et Cos2 agissent comme une plateforme pour rapprocher la PKA de son substrat Ci. La phosphorylation de Ci induit la digestion partielle de Ci aboutissant à la formation du Ci-Rep qui réprime les gènes cibles de la voie Hh. La présence d'Hh entraîne la stabilisation de Smo à la membrane plasmique, Smo qui est l'initiateur de nombreux changements structurels au sein du complexe de transduction, qui sera ensuite qualifié d'activateur. Sur ce schéma, par souci de compréhension, j'ai représenté l'ensemble des changements de conformation par des flèches en pointillés dans une structure que j'ai nommée « complexe intermédiaire », mais qui n'existe pas dans la réalité. Ainsi, Hh est responsable de la relocalisation de la PKA de Ci vers Smo, de l'ouverture de la structure de Fu et du déplacement de Fu du domaine C-terminal au domaine N-terminal de Ci. Pour de faibles niveaux d'Hh, les kinases PKA et CK1 (CK1 : non représentée ici) phosphorylent Smo, induisant l'ouverture partielle de la queue cytoplasmique qui en interagissant avec Fu, entraîne le premier état d'activation de la kinase. Fu phosphoryle Cos2 sur la sérine 572, et induit l'activation de Ci à un premier niveau, probablement par phosphorylation. Cette forme de Ci est appelée Ci-Act1 et va activer les gènes cibles de la voie exprimés pour de faibles ou intermédiaires doses d'Hh. A de fortes concentrations d'Hh, PKA, CK1 et

en particulier Gprk2 renforce l'activation de Smo, visible par une ouverture totale de sa queue cytoplasmique. Cet évènement permet à Smo d'interagir une seconde fois avec Fu, *via* ses 59 derniers acides aminés, et ainsi d'activer Fu à un second niveau. Fu va alors phosphoryler Cos2 sur le résidu 931, et également entraîner la formation d'une isoforme hyper-active de Ci, Ci-Act2, sûrement par phosphorylation. Le facteur de transcription Ci-Act2 va ensuite transloquer dans le noyau et permettre l'expression des gènes cibles activés à hauts niveaux d'Hh.

Annexe

Les collaborations Scientifiques

En plus de mes deux projets de recherche effectués sous la direction des Docteurs Pascal Théron et Laurent Ruel, j'ai également collaboré avec des membres de mon laboratoire, Dr. Tamas Matusek (chercheur CR2), Dr Tanvi Gore (ancienne étudiante en thèse) et Dr. Andrew Rallis (chercheur post-doctorant). Ces collaborations m'ont permis de travailler sur d'autres aspects de la voie Hh, notamment la sécrétion du signal Hh dans le disque ainsi qu'un nouveau rôle d'Hh au cours de la vie adulte. Cette participation va donner lieu prochainement à deux publications scientifiques :

Article 1: Role of the small GTP-ase Rab8 in the establishment of Hedgehog long-, and short-range activity.

Les auteurs ont montré que la protéine Rab8, petite GTP-ase, est impliquée dans la sécrétion, régulant la diffusion du signal Hh. Etant donné le rôle d'Ihog dans l'établissement du gradient Hh, mon rôle a été de démontrer l'existence d'un lien entre Rab8 et Ihog. Grâce à des expériences de co-immunoprécipitations, j'ai pu prouver que Rab8 interagissait directement avec la queue cytoplasmique d'Ihog.

Article 2: A newly identified function for the Hedgehog morphogen in lifespan determination and neuroprotection in *Drosophila*.

Les chercheurs ont identifié une fonction inédite d'Hh au cours de la vie adulte, puisque le morphogène augmente l'espérance de vie et exerce également un effet neuro-protecteur chez la drosophile. Le mécanisme d'action d'Hh passe par l'activation de gènes cibles, notamment du gène *Igel (hui)*, qui code pour une protéine chaperonne. Dans ce projet, j'ai démontré d'une part, que l'expression de la protéine Hui est augmentée au cours du vieillissement, et d'autre part, que cette dernière subit un clivage afin d'être sécrétée pour agir en tant que neuro-protecteur.

1.1 Article 1: Role of the small GTP-ase Rab8 in the establishment of Hedgehog long-, and short-range activity

Article en préparation

Tamas Matusek, Tanvi Gore, Gisela D'Angelo, Cécile Giordano, Laurence Lavenant-Staccini, Thomas Tognacci and Pascal Théron

Institute of Biology Valrose, UNS - CNRS UMR7277 - Inserm U1091, Nice, France

Introduction: Hedgehog (Hh) morphogen secretion and signaling have essential roles in defining cell fate during development as well as maintaining stem cells in various tissues like the reproductive system or the intestine. Understanding how Hh, and other morphogens, reach it's targets at short and long distance is a key question we are trying to resolve. Hh trafficking within its place of production is essential for proper morphogen secretion and gradient establishment. In *Drosophila* imaginal disc, Dynamin and Dispatched-dependent endocytosis prepares Hh for its final release either at the apical pole (for its long-range activity) or the basal pole (to induce short-range targets) of the producing cells (Ayers et al., Dev. Cell 2010; D'Angelo et al., Dev. Cell 2015). Apical secretion of Hh is dependent on the fast recycling machinery involving the Rab4 small GTPase, while basal rerouting and secretion is hypothesized to be regulated by the Hh coreceptors Interference Hedgehog (Ihog) and Brother of Ihog (Boi; Biloni et al., Dev. Biol. 2013).

Results: In a screen to find novel members of the Hh trafficking pathway, we have found that absence of the small GTPase Rab8 affects Hh secretion and target gene expression. We have developed *rab8* knock-out animals and found that, in absence of Rab8, Rab4 and Ihog distribution were affected. These changes were associated with a simultaneous change of short and long range Hh target expressions. Additionally we observed a shift of Hh subcellular distribution from a predominant apical distribution to a more basolateral one. We are currently assessing whereas Rab8 changes directly the secretion of Hh from apical to basal, or changes its recycling route from one cellular pole to the other.

1.2 Article 2: A newly identified function for the Hedgehog morphogen in lifespan determination and neuroprotection in *Drosophila*

Article soumis à *Nature*

Andrew Rallis¹, Juan A. Navarro², Raphaël Rousset^{1,3}, Cécile Giordano¹, Laurent Ruel¹, Stéphane Noselli¹, Stephan Schneuwly² and Pascal P. Thérond¹.

¹Université Côte d'Azur, CNRS UMR 7277, INSERM U1091, Institut de Biologie-Valrose, France

²Department of Developmental Biology, Institute of Zoology, Universitaetsstr. 31, University of Regensburg, 93040 Regensburg, Germany.

³Current address: Université Côte d'Azur, INRA, Institut Sophia Agrobiotech, 400 route des chappes, BP 167, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

Abstract

The drastic increase in the worldwide life expectancy has culminated in a dramatic upsurge in ageing-related diseases and mortality. However, the molecular signals that promote healthy longevity have yet to be fully determined. Here we show that Hedgehog activity is involved in lifespan determination as well as neuroprotection in *Drosophila melanogaster*. We report that adult-specific expression of Hedgehog considerably extends lifespan, whereas its depletion drastically shortens longevity associated with decreased locomotion and impaired dopaminergic neuron homeostasis. Furthermore, stimulation of the Hedgehog pathway in adult brain glia is able to potently rescue the shortened lifespan and accompanying age-related defects of hedgehog mutants. We found that the Hedgehog-specific transcription factor *Cubitus interruptus* and its target *Hase und Igel*, when expressed in the glia of hedgehog mutant animals, rescue lifespan, locomotion and dopaminergic neuron viability close to wild type levels. Finally, we further demonstrate the ability of Hedgehog target to counteract the effects of neuronal alpha-Synuclein overexpression in an *in vivo* Parkinson Disease model. Overall, we propose that the Hedgehog signalling cascade in glial cells is critical for aging determination during adulthood and is sufficient to provide neuroprotection.

Abbreviations

Les termes se trouvant dans la table des abbreviations sont écrits en anglais.

Les molécules impliquées directement ou indirectement dans la voie de signalisation Hh/Shh (1)	
Hh/Shh	Hedgehog/Sonic Hedgehog
Dhh	Desert Hedgehog
Ihh	Indien Hedgehog
Ptc/Ptch	Patched
Smo	Smoothened
Cos2/Kif7 et Kif27	Costal2/Kinesin7 et Kinesin27
Fu/Stk36/Ulk3	Fused/serine/threonine protein kinase 36 /unc51 like kinase3
Sufu/SUFU	Suppressor of fused
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
CK1-2	Casein Kinase 1-2
Gish	Gilgamesh
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
Gprk/GRK	G-Protein Coupled Receptor Kinase
Ci/Gli	Cubitus interruptus/Glioma-associated oncogene
Ci-Act/Gli-Act	Ci-Activator/Gli-Activator
Ci-155/Gli-FL	Ci-155/Gli-Full lenght
Ci-Rep/Gli-Rep	Ci-Repressor/Gli-Répressor
Ihog/Cdo	Interference of hedgehog/CAM-related/downregulated by oncogenes
Boi/Boc	Brother of ihog/brother of CDO
Gas-1	Growth arrest-specific 1
Hip-1	HH-interacting protein 1
Dally	Dally
Dlp	Dally like
Disp	Dispatched
Shf	Shifted
HSPG	Heparan Sulphate Proteoglycans
Dbr	Debra
Slimb/ β -TrcP	Supernumerary limbs/ β -transducin repeat-containing protein
SCF	E3 Skp1-Cullin-F-box
MATH	Mepirin and TRAF homology
HIB/SPOP	Hh-induced MATH and BTB domain protein/ Speckle-type POZ protein

Les molécules impliquées directement ou indirectement dans la voie de signalisation Hh/Shh (2)	
Stt4	Phosphatidylinositol-4-kinase
Sac1	Phosphoinositide phosphatase
PP1	serine/threonine Protein Phosphatase 1
PP2A	serine/threonine Protein Phosphatase 2A
PP4	Protein Phosphatase 1
Scube2	Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2
Sort1	Sortilin-1
Sit	Sightless
Sky	Skinny hedgehog
Central missing	Central missing
Krz	Krutz
Smurf3	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase
Vps36	Vacuolar Protein Sorting 36
Uba1	Ubiquitin-activating enzyme (E1)
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
UBPY/USP8	ubiquitin specific peptidase 8
Hrs	HGF-regulated tyrosine kinase substrate
AMPk	AMP-activated protein kinase
Wg	Wingless
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
FGF	Fibroblast Growth Factor
Ato	Atonal

Autres molécules	
PDK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
Pi3P	phosphatidylinositol-3,4-5-trisphosphate
CFP	Cyan Fluorescent Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Les gènes cibles de la voie Hh	
<i>col</i>	<i>collier</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>iro</i>	<i>iroquois</i>
<i>ptc</i>	<i>patched</i>

Les domaines protéiques	
SSD	Sterol Sensing Domain
HS	Heparan Sulphate
GAG	Glycosaminoglycans
GPI	Glycosylphosphatidylinositol anchor
RND	Resistant, Nodulation, Division
FNIII	Fibronectin type III
Ig	Immunoglobulin
EB2	Ephrin receptor 2
EphB2	Ephrin receptor 2 ligand
MVB	Multivesicular Body
PH	Pleckstrin Homology
SAID	Smo Auto-Inhibitory Domain
CBP	CREB Binding Domain
NLS	Nuclear Localization Signal
NES	Nuclear Export Signal
ZNF	Zinc Fingers Domain
PEST	Proline, Glutamic acid, Serine, Threonine
Cat	Catalytic
Reg	Regulatory

Les structures des tissus	
AER	Apical Ectoderm Ridge
A/P	Antero/Posterior
D/V	Dorso/Ventral
P/D	Proximo/Distal
PS	Parasegment
V	Vein
ZPA	Zone of Polarizing Activity

Autres abréviations	
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
MPF	M-Phase promoting factor
MTs	Microtubules
CSCs	Cancer Stem Cells
BCCs	Basal Cell Carcinomas
aa	Amino acids

Gal4 drivers		
apGal4	apterous	Dorsal
RnGal4	rotund	Pouch

Bibliographie

- Adolphe, C., Junker, J. P., Lyubimova, A., van Oudenaarden, A., & Wainwright, B. (2017). Patched Receptors Sense, Interpret, and Establish an Epidermal Hedgehog Signaling Gradient. *Journal of Investigative Dermatology*, *137*(1), 179–186.
- Ahn, S., & Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*, *437*(7060), 894–897.
- Aikin, R. A., Ayers, K. L., & Thérond, P. P. (2008). The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO Reports*, *9*(4), 0–6.
- Akiyama, T., & Gibson, M. C. (2015). Decapentaplegic and growth control in the developing *Drosophila* wing. *Nature*, *527*, 375–378.
- Alcedo, J., Zou, Y., & Noll, M. (2000). Posttranscriptional regulation of smoothed is part of a self-correcting mechanism in the Hedgehog signaling system. *Mol Cell*, *6*(2), 457–465.
- Alenzi, F. Q. (2004). Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *Br J Biomed Sci*, *61*(2), 99–102.
- Alexandre, C., Jacinto, A., & Ingham, P. W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes & Development*, *10*, 2003–2013.
- Allen, B. L., Song, J. Y., Izzi, L., Althaus, I. W., Kang, J.-S., Charron, F., ... McMahon, A. P. (2011). Overlapping roles and collective requirement for the co-receptors Gas1, Cdo and Boc in Shh pathway function. *Developmental Biology*, *20*(6), 775–787.
- Alves, G., & Limbourg-bouchon, B. (1998). Modulation of Hedgehog target gene expression by the Fused serine-threonine kinase in wing imaginal discs. *Mechanisms of Development*, *78*, 17–31.
- Amanai, K., & Jiang, J. (2001). Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development (Cambridge, England)*, *128*(24), 5119–27.
- Apionishev, S., Katanayeva, N. M., Marks, S. A., Kalderon, D., & Tomlinson, A. (2005). *Drosophila* Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nature Cell Biology*, *7*(1), 86–92.
- Artinger, K. B., & Bronner-Fraser, M. (1992). Notochord grafts do not suppress formation of neural crest cells or commissural neurons. *Development (Cambridge, England)*, *116*(4), 877–86.
- Ascano, M., Nybakken, K. E., Sosinski, J., Stegman, M. A., & Robbins, D. J. (2002). The Carboxyl-Terminal Domain of the Protein Kinase Fused Can Function as a Dominant Inhibitor of Hedgehog Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(3), 1555–1566.
- Ascano, M., & Robbins, D. J. (2004). An Intramolecular Association between Two Domains of the Protein Kinase Fused Is Necessary for Hedgehog Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(23), 10397–10405.
- Ayers, K. L., Gallet, A., Staccini-lavenant, L., & Therond, P. P. (2010). The Long-Range Activity

of Hedgehog Is Regulated in the Apical Extracellular Space by the Glypican Dally and the Hydrolase Notum. *Developmental Cell*, 18(4), 605–620.

Aza-blanc, P., Laget, M., Schwartz, C., & Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis That Is Inhibited by Hedgehog Targets Cubitus interruptus Protein to the Nucleus and Converts It to a Repressor. *Cell*, 89, 1043–1053.

Baker, N. E. (1987). Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryos. *The EMBO Journal*, 6(6), 1765–73.

Barnes, E. a, Kong, M., Ollendorff, V., & Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *The EMBO Journal*, 20(9), 2214–2223.

Basler, K., & Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature*, 368(6468), 208–14.

Beachy, P. A., Karhadkar, S. S., & Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 432(7015), 324–331.

Bellaiche, Y., The, I., & Perrimon, N. (1998). Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature*, 394, 95.

Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., ... Beachy, P. A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425(6960), 846–851.

Bernfield, M., Götte, M., Park, W. P., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999). Functions of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 729–777.

Bhardwaj, G., Murdoch, B., Baker, D. P., Chadwick, K., Ling, L. E., Karanu, N., & Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nature Immunology*, 2(2).

Bhatia, N., Thiyagarajan, S., Elcheva, I., Saleem, M., Dlugosz, A., Mukhtar, H., & Spiegelman, V. S. (2006). Gli2 is targeted for ubiquitination and degradation by beta-TrCP ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19320–19326.

Bijlsma, M. F., Spek, C. A., Zivkovic, D., Van De Water, S., Rezaee, F., & Peppelenbosch, M. P. (2006). Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biology*, 4(8), 1397–1410.

Bilioni, A., Sánchez-Hernández, D., Callejo, A., Gradilla, A. C., Ibáñez, C., Mollica, E., ... Guerrero, I. (2013). Balancing Hedgehog, a retention and release equilibrium given by Dally, Ihog, Boi and shifted/DmWif. *Developmental Biology*, 376(2), 198–212.

Bischoff, M., Gradilla, A., Seijo, I., Andrés, G., Rodríguez-navas, C., González-méndez, L., & Guerrero, I. (2013). Cytosomes are required for the establishment of a normal Hedgehog morphogen gradient in *Drosophila* epithelia. *Nature Cell Biology*, 1–13.

Bitgood, M. J., Shen, L., & McMahon, A. P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog

regulates the male germline. *Current Biology*, 6, 298–304.

Bolanos-Garcia, V. M., & Miguel, R. N. (2003). On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83(1), 47–68.

Bosanac, I., Maun, H. R., Scales, S. J., Wen, X., Lingel, A., Bazan, J. F., ... Lazarus, R. A. (2009). The structure of SHH in complex with HHIP reveals a recognition role for the Shh pseudo active site in signaling. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(7), 691–697.

Briscoe, J., & Théron, and P. P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(July), 416–429.

Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K. a, Dickson, B. J., & Basler, K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*, 99(7), 803–815.

Büscher, D., Bosse, B., Heymer, J., & Rüther, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mechanisms of Development*, 62(2), 175–182.

Callejo, A., Biloni, A., Mollica, E., Gor, N., Andrés, G., Ibáñez, C., ... Guerrero, I. (2011). Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the Drosophila wing disk epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12591–12598.

Callejo, A., Culi, J., & Guerrero, I. (2008). Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(3), 912–7.

Campbell, C., Beug, S., Nickerson, P. E. B., Peng, J., Mazerolle, C., Bassett, E., ... Wallace, V. (2016). Sortilin regulates sorting and secretion of Sonic hedgehog. *Journal of Cell Science*, 129, 3832–3844.

Canettieri, G., Di Marcotullio, L., Greco, A., Coni, S., Antonucci, L., Infante, P., ... Gulino, A. (2010). Histone deacetylase and Cullin3–RENKCTD11 ubiquitin ligase interplay regulates Hedgehog signalling through Gli acetylation. *Nature Cell Biology*, 12(2), 132–142.

Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J., & Martí, E. (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development (Cambridge, England)*, 133(3), 517–28.

Chamoun, Z., Mann, R. K., Nellen, D., von Kessler, D. P., Bellotto, M., Beachy, P. a, & Basler, K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5537), 2080–4.

Chang, D. T., Lopez, A., von Kessler, D. P., Chiang, C., Simandl, B. K., Zhao, R., ... Beachy, P. A. (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development*, 120(11), 3339–3353.

Chang, H., Li, Q., Moraes, R. C., Lewis, M. T., & Hamel, P. A. (2010). Activation of Erk By Sonic Hedgehog Independent of. *Int J Biochem Cell Biol.*, 42(9), 1462–1471.

- Chen, C., Kessler, D. P. Von, Park, W., Wang, B., Ma, Y., & Beachy, P. A. (1999). Nuclear Trafficking of Cubitus interruptus in the Transcriptional Regulation of Hedgehog Target Gene Expression. *Cell*, *98*, 305–316.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., & Beachy, P. a. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed service Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & Development*, (410), 2743–2748.
- Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M., & Chuang, P. T. (2004). Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes and Development*, *18*(6), 641–659.
- Chen, X., Tukachinsky, H., Huang, C. H., Jao, C., Chu, Y. R., Tang, H. Y., ... Salic, A. (2011). Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, *192*(5), 825–838.
- Chen, Y., Gallaher, N., Goodman, R. H., & Smolik, S. M. (1998). Protein kinase A directly regulates the activity and proteolysis of cubitus interruptus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*, 2349–2354.
- Chen, Y., Li, S., Tong, C., Zhao, Y., Wang, B., Liu, Y., & Jia, J. (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 & Development*, *24*, 2054–2067.
- Chen, Y., Sasai, N., Ma, G., Yue, T., Jia, J., Briscoe, J., & Jiang, J. (2011). Sonic Hedgehog dependent Phosphorylation by CK1 α and GRK2 is required for Ciliary Accumulation and Activation of Smoothened. *PLoS Biology*, *9*(6), e1001083 (1-16).
- Chen, Y., & Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell*, *87*(3), 553–563.
- Cheng, S., Maier, D., Neubueser, D., & Hipfner, D. R. (2010). Regulation of Smoothened by Drosophila G-protein-coupled receptor kinases. *Developmental Biology*, *337*(1), 99–109.
- Cheng, S. Y., & Bishop, J. M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(8), 5442–5447.
- Cheung, H. O.-L., Zhang, X., Ribeiro, A., Mo, R., Makino, S., Puvindran, V., ... Hui, C.-C. (2009). The kinesin protein Kif7 is a critical regulator of Gli transcription factors in mammalian hedgehog signaling. *Science Signaling*, *2*(76), ra29.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., & Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, *383*, 407–413.
- Chuang, P.-T., & McMahon, A. P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, *397*, 617–21.
- Chuang, P., Kawcak, T. N., & McMahon, A. P. (2003). Feedback control of mammalian

Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein , Hip1 , modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung service Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein , Hip1 , . *Genes & Development*, (415), 342–347.

Claret, S., Sanial, M., & Plessis, A. (2007). Report Evidence for a Novel Feedback Loop in the Hedgehog Pathway Involving Smoothed and Fused. *Current Biology*, 17, 1326–1333.

Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., & Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 Signaling Regulates Human Glioma Growth, Cancer Stem Cell Self-Renewal, and Tumorigenicity. *Current Biology*, 17(2), 165–172.

Cooper, A. F., Yu, K. P., Brueckener, M., Bailey, L. L., Johnson, L., McGrath, J. M., & Bale, A. E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development and Disease*, 132(19), 4407–4417.

Corcoran, R. B., & Scott, M. P. (2006). Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22), 8408–13.

Crozatier, M., Glise, B., & Vincent, A. (2002). Connecting Hh , Dpp and EGF signalling in patterning of the Drosophila wing ; the pivotal role of collier/knot in the AP organiser. *Development*, 129, 4261–4269.

D'Angelo, G., Matusek, T., Pizette, S., & Théron, and P. P. (2015). Endocytosis of Hedgehog through Dispatched Regulates Long-Range Signaling. *Developmental Cell*, 32, 290–303.

Dahmann, C., & Basler, K. (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends in Genetics*, 15, 320–326.

Dai, P., Akimaru, H., & Ishii, S. (2003). A Hedgehog-responsive region in the Drosophila wing disc is defined by Debra-mediated ubiquitination and lysosomal degradation of Ci. *Developmental Cell*, 4(6), 917–928.

De Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the Drosophila wing: The development of the veins. *BioEssays*, 25(5), 443–451.

Delcros JG, Mehlen P (2013). Les récepteurs à dépendance : carrefours entre vie et mort. *Bull Cancer*, 100 : 1261-74.

De Robertis, E. M. (2006). Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos Edward. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7(4), 296–302.

Denef, N., Neubu, D., Perez, L., & Cohen, S. M. (2000). Hedgehog Induces Opposite Changes in Turnover and Subcellular Localization of Patched and Smoothed. *Cell*, 102, 521–531.

Desbordes, S. C., & Sanson, B. (2003). The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of Drosophila. *Development (Cambridge, England)*, 130(25), 6245–55.

Dierks, C., Grbic, J., Zirlik, K., Beigi, R., Englund, N. P., Guo, G.-R., ... Warmuth, M. (2007). Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nature*

Medicine, 13(8), 944–51.

DiNardo, S., Sher, E., Heemskerk-Jongens, J., Kassis, J. A., & O'Farrell, P. H. (1988). Two-tiered regulation of spatially patterned engrailed gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Nature*, 332(6165), 604–9.

Ding, Q., Motoyama, J., Gasca, S., Mo, R., Sasaki, H., Rossant, J., & Hui, C. C. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development (Cambridge, England)*, 125(14), 2533–43.

Dussillol-godar, F., Brissard-zahraoui, J., Limbourg-bouchon, B., Boucher, D., Fouix, S., Lamour-isnard, C., ... Busson, D. (2006). Modulation of the Suppressor of fused protein regulates the Hedgehog signaling pathway in *Drosophila* embryo and imaginal discs. *Developmental Biology*, 291, 53–66.

Dwyer, J. R., Sever, N., Carlson, M., Nelson, S. F., Beachy, P. A., & Parhami, F. (2007). Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8959–8968.

Dyson, J. M., Conduit, S. E., Feeney, S. J., Hakim, S., DiTommaso, T., Fulcher, A. J., ... Mitchell, C. A. (2017). INPP5E regulates phosphoinositide-dependent cilia transition zone function. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 247–263.

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (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.

Endoh-Yamagami, S., Evangelista, M., Wilson, D., Wen, X., Theunissen, J. W., Phamluong, K., ... Peterson, A. S. (2009). The Mammalian Cos2 Homolog Kif7 Plays an Essential Role in Modulating Hh Signal Transduction during Development. *Current Biology*, 19(15), 1320–1326.

Ericson, J., Morton, S., Kawakami, A., Roelink, H., & Jessell, T. M. (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell*, 87(4), 661–673.

Esko, J. D., & Selleck, S. B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 435–471.

Eugster, C., Panáková, D., Mahmoud, A., & Eaton, S. (2007). Lipoprotein-Heparan Sulfate Interactions in the Hh Pathway. *Developmental Cell*, 13(1), 57–71.

Fan, J., Liu, Y., & Jia, J. (2012). Hh-induced Smoothed conformational switch is mediated by differential phosphorylation at its C-terminal tail in a dose- and position-dependent manner. *Developmental Biology*, 366(2), 172–184.

Farzan, S. F., Ascano, M., Ogden, S. K., Sanial, M., Brigui, A., Plessis, A., & Robbins, D. J. (2008). Costal2 Functions as a Kinesin-like Protein in the Hedgehog Signal Transduction Pathway. *Current Biology*, 18(16), 1215–1220.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., & Nishida, E.

(1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, 390(6657), 308–311.

Fukumoto, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fujisawa, K., Nagata, S., & Fukunaga, R. (2001). The Fused Protein Kinase Regulates Hedgehog-stimulated Transcriptional Activation in *Drosophila Schneider 2 Cells* *. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38441–38448.

Fumoto, K., Hoogenraad, C. C., & Kikuchi, A. (2006). GSK-3beta-regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *The EMBO Journal*, 25(24), 5670–5682.

Gallet, A., Lavenant-staccini, L., & Thérond, P. P. (2008). Cellular Trafficking of the Glypican Dally-like Is Required for Full-Strength Hedgehog Signaling and Wingless Transcytosis. *Developmental Cell*, 14, 712–725.

Gallet, A., Rodriguez, R., Ruel, L., & Therond, P. P. (2003). Cholesterol Modification of Hedgehog Is Required for Trafficking and Movement , Revealing an Asymmetric Cellular Response to Hedgehog. *Developmental Cell*, 4, 191–204.

Gallet, A., & Therond, P. P. (2005). Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Developmental Biology*, 277(1), 51–62.

Glise, B., Miller, C. A., Crozatier, M., Halbisen, M. A., Wise, S., Olson, D. J., ... Blair, S. S. (2005). Shifted, the *Drosophila* ortholog of Wnt inhibitory factor-1, controls the distribution and movement of hedgehog. *Developmental Cell*, 8(2), 255–266.

Goetz, S. C., & Anderson, K. V. (2010). The Primary Cilium: A Signaling Center During Vertebrate Development. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 331–344.

Gorfinkiel, N., Sierra, J., Callejo, A., Ibañez, C., & Guerrero, I. (2005). The *Drosophila* ortholog of the human Wnt inhibitor factor shifted controls the diffusion of lipid-modified hedgehog. *Developmental Cell*, 8(2), 241–253.

Gradilla, A.-C., González, E., Seijo, I., Andrés, G., Bischoff, M., González-Mendez, L., ... Guerrero, I. (2014). Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nature Communications*, 5, 5649.

Guerrero, I., & Chiang, C. (2007). A conserved mechanism of Hedgehog gradient formation by lipid modifications. *Trends in Cell Biology*, 17(1), 1–5.

Hahn, H., Christiansen, J., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Chidambaram, A., Gerrard, B., ... Wainwright, B. (1996). A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12125–12128.

Han, C., Belenkaya, T., Khodoun, M., Tauchi, M., & Lin, X. (2004). Distinct and collaborative roles of *Drosophila* EXT family proteins in morphogen signalling and gradient formation. *Development*, 131(7), 1563–1575.

Hardie, D. G., Ross, F. a., & Hawley, S. a. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that

maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 251–262.

Hatini, V., & DiNardo, S. (2001). Divide and conquer: Pattern formation in *Drosophila* embryonic epidermis. *Trends in Genetics*, 17(10), 574–579.

Hatta, K., Bremiller, R., Westerfield, M., & Kimmel, C. B. (1991). Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 112(3), 821–32.

Hausmann, O. N. (2003). Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, 41(7), 369–378.

Hegde, G. V., Peterson, K. J., Emanuel, K., Mittal, A. K., Joshi, A. D., Dickinson, J. D., ... Joshi, S. S. (2008). Hedgehog-induced survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in a stromal cell microenvironment: a potential new therapeutic target. *Mol Cancer Res*, 6(12), 1928–1936.

Hemmati-brivanlou, A. (2000). La morphogénèse du système nerveux chez les vertébrés. *Medecine/Sciences*, 16, 150–158.

Heo, J. S., Lee, M. Y., & Han, H. J. (2007). Sonic hedgehog stimulates mouse embryonic stem cell proliferation by cooperation of Ca²⁺/protein kinase C and epidermal growth factor receptor as well as Gli1 activation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(12), 3069–3080.

Hepker, J., Wang, Q., Motzny, C. K., Holmgren, R., & Orenic, T. V. (1997). *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development*, 124, 549–558.

Hernández, F., Langa, E., Cuadros, R., Avila, J., & Villanueva, N. (2010). Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 344(1–2), 211–215.

Himanen, J. P., & Nikolov, D. B. (2003). Eph signaling: A structural view. *Trends in Neurosciences*, 26(1), 46–51.

Ho, K. S., Suyama, K., Fish, M., & Scott, M. P. (2005). Differential regulation of Hedgehog target gene transcription by Costal2 and Suppressor of Fused. *Development*, 132, 1401–1412.

Hollway, G. E., Maule, J., Gautier, P., Evans, T. M., Keenan, D. G., Lohs, C., ... Currie, P. D. (2006). Scube2 mediates Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Developmental Biology*, 294(1), 104–118.

Hooper, J. E. (2003). Smoothed translates Hedgehog levels into distinct responses. *Development*, 130, 3951–3963.

Huang, P., Nedelcu, D., Watanabe, M., Jao, C., Kim, Y., Liu, J., ... Salic, A. (2016). Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell*, 166(5), 1176–1187.e14.

Huang, S., Zhang, Z., Zhang, C., Lv, X., Zheng, X., Chen, Z., ... Chen, D. (2013). Activation of Smurf E3 Ligase Promoted by Smoothed Regulates Hedgehog Signaling through Targeting Patched Turnover. *PLoS Biology*, 11(11), e1001721 (1-18).

- Humke, E. W., Dorn, K. V., Milenkovic, L., Scott, M. P., & Rohatgi, R. (2010). The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes and Development*, *24*(7), 670–682.
- Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes and Development*, *15*(23), 3059–3087.
- Ingham, P. W., Taylor, A. M., & Nakano, Y. (1991). Role of the Drosophila patched gene in positional signalling. *Nature*, *353*(6340), 184–7.
- Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: Emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular Signalling*, *21*(7), 1023–1034.
- Jessell, T. M. (2000). Neuronal Specification in the Spinal Cord: Inductive Signals and Transcriptional Codes. *Nature Reviews Genetics*, *1*, 20–29.
- Jia, H., Liu, Y., Xia, R., Tong, C., Yue, T., Jiang, J., & Jia, J. (2010). Casein kinase 2 promotes Hedgehog signaling by regulating both Smoothed and Cubitus interruptus. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37218–37226.
- Jia, H., Liu, Y., Yan, W., & Jia, J. (2009). PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation. *Development (Cambridge, England)*, *136*, 307–316.
- Jia, J., Amanai, K., Wang, G., & Tang, J. (2002). Shaggy / GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating Cubitus interruptus. *Nature*, *416*, 2–6.
- Jia, J., Kolterud, A., Zeng, H., Hoover, A., Teglund, S., Toftgard, R., & Liu, A. (2009). Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Developmental Biology*, *330*(2), 452–460.
- Jia, J., Tong, C., Wang, B., Luo, L., & Jiang, J. (2004). Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature*, *432*(December), 1045–1050.
- Jia, J., Zhang, L., & Zhang, Q. (2005). Phosphorylation by Double-Time / CKI e and CKI a Targets Cubitus Interruptus for Slimb / b -TRCP-Mediated Proteolytic Processing. *Developmental Cell*, *9*, 819–830.
- Jiang, J., & Struhl, G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/ WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, *391*, 493–496.
- Jiang, K., Liu, Y., Fan, J., Epperly, G., Gao, T., Jiang, J., & Jia, J. (2014). Hedgehog-regulated atypical PKC promotes phosphorylation and activation of Smoothed and Cubitus interruptus in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*, E4842–E4850.
- Jiang, K., Liu, Y., Fan, J., Zhang, J., Li, X., & Evers, B. M. (2016). PI (4) P Promotes Phosphorylation and Conformational Change of Smoothed through Interaction with Its C-terminal Tail. *PLoS Biology*, *14*, 1–26.
- Jiang, X., Yang, P., & Ma, L. (2009). Kinase activity-independent regulation of cyclin pathway

by GRK2 is essential for zebrafish early development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(25), 10183–8.

Jin, Z., Schwend, T., Fu, J., Bao, Z., Liang, J., Zhao, H., ... Yang, J. (2016). Members of the Rusc protein family interact with Sufu and inhibit vertebrate Hedgehog signaling. *Development*, 143(21), 3944–3955.

Johnson, R. L., Grenier, J. K., & Scott, M. P. (1995). Patched Overexpression Alters Wing Disc Size and Pattern: Transcriptional and Post-Transcriptional Effects on Hedgehog Targets. *Development*, 121(12), 4161–4170.

Johnson, R. L., Milenkovic, L., & Scott, M. P. (2000). In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration. *Molecular Cell*, 6(2), 467–478.

Kaesler, S., Luscher, B., & Ruther, U. (2000). Transcriptional activity of GLI1 is negatively regulated by protein kinase A. *Biological Chemistry*, 381(7), 545–551.

Kagawa, H., Shino, Y., Kobayashi, D., Demizu, S., Shimada, M., Ariga, H., & Kawahara, H. (2011). A novel signaling pathway mediated by the nuclear targeting of c-terminal fragments of mammalian patched 1. *PLoS ONE*, 6(4), e18638 (1-11).

Kanazawa, S., Fujiwara, T., Matsuzaki, S., Shingaki, K., Taniguchi, M., Miyata, S., ... Kubo, T. (2010). bFGF regulates PI3-Kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS ONE*, 5(8), 1–12.

Karhadkar, S. S., Bova, G. S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., ... Beachy, P. A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431(7009), 707–12.

Katoh, Y., & Katoh, H. (2009). Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Current Molecular Medicine*, 9(7), 873–886.

Katzmann, D. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2), 145–155.

Keeler, R. F. (1969). The Structure Of The Glycosidic Alkaloid Cycloposide. *Steroids*, 579–588.

Kent, D., Bush, E. W., & Hooper, J. E. (2006). Roadkill attenuates Hedgehog responses through degradation of Cubitus interruptus. *Development (Cambridge, England)*, 133(2006), 2001–2010.

Khaliullina, H., Bilgin, M., Sampaio, J. L., Shevchenko, A., & Eaton, S. (2015). Endocannabinoids are conserved inhibitors of the Hedgehog pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(11), 3415–3420.

Khaliullina, H., Panáková, D., Eugster, C., Riedel, F., Carvalho, M., & Eaton, S. (2009). Patched regulates Smoothed trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development (Cambridge, England)*, 136(24), 4111–4121.

- Khare, N., & Baumgartner, S. (2000). Dally-like protein, a new *Drosophila* glypican with expression overlapping with wingless. *Mechanisms of Development*, *99*(1–2), 199–202.
- Kim, J., Kato, M., & Beachy, P. a. (2009). Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(51), 21666–21671.
- Kise, Y., Morinaka, A., Teglund, S., & Miki, H. (2009). Sufu recruits GSK3 β for efficient processing of Gli3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *387*(3), 569–574.
- Kovacs, J. J., Whalen, E. J., Liu, R., Xiao, K., Kim, J., Chen, M., ... Lefkowitz, R. J. (2008). β -Arrestin-Mediated Localization of Smoothed to the Primary Cilium. *Science*, *1777*(5884), 1777–1781.
- Kupinski, A. P., Raabe, I., Michel, M., Ail, D., Bruschi, L., & Weidemann, T. (2012). Phosphorylation of the Smo tail is controlled by membrane localisation and is dispensable for clustering. *Journal of Cell Science*, *126*, 4684–4697.
- Kuzhandaivel, A., Schultz, S. W., Alkhori, L., & Alenius, M. (2014). Report Cilia-Mediated Hedgehog Signaling in *Drosophila*. *Cell Reports*, *7*(3), 672–680.
- Lauth, M., & Bergström, Å. (2007). Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(20), 8455–60.
- Law, K. K. Lo, Makino, S., Mo, R., Zhang, X., Puvindran, V., & Hui, C. chung. (2012). Antagonistic and Cooperative Actions of Kif7 and Sufu Define Graded Intracellular Gli Activities in Hedgehog Signaling. *PLoS ONE*, *7*(11), 3–10.
- Lawrence, P. A., & Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: Lessons from *Drosophila*? *Cell*, *85*(7), 951–961.
- Lee, J. D., & Treisman, J. E. (2001). Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active hedgehog protein. *Current Biology*, *11*(14), 1147–1152.
- Lee, J. J., Ekker, S. C., von Kessler, D. P., Porter, J. a, Sun, B. I., & Beachy, P. a. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *266*(5190), 1528–1537.
- Lewis, P. M., Dunn, M. P., McMahon, J. A., Logan, M., Martin, J. F., St-Jacques, B., & McMahon, A. P. (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.
- Lewis I Held, J. (2002). Imaginal Discs The Genetic and Cellular Logic of Pattern. *Developmental and Cell Biology*, *39*.
- Li, S., Chen, Y., Shi, Q., Yue, T., Wang, B., & Jiang, J. (2012). Hedgehog-Regulated Ubiquitination Controls Smoothed Trafficking and Cell Surface Expression in *Drosophila*. *PLoS Biology*, *10*(1), e1001239 (1-15).
- Li, S., Li, S., Han, Y., Tong, C., & Wang, B. (2016). Regulation of Smoothed Phosphorylation

and High-Level Hedgehog Signaling Activity by a Plasma Membrane Associated Kinase. *PLoS Biology*, 14(6), e1002481 (1-24).

Li, S., Ma, G., Wang, B., & Jiang, J. (2014). Hedgehog induces formation of PKA-Smoothed complexes to promote Smoothed phosphorylation and pathway activation. *Developmental Biology*, 7(332), 1–15.

Liem, K. F., He, M., Ocbina, P. J. R., & Anderson, K. V. (2009). Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13377–13382.

Litingtung, Y., & Chiang, C. (2000). Control of Shh Activity and Signaling in the Neural Tube. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 219, 143–154.

Liu, S., Dontu, G., Mantle, I. D., Patel, S., Ahn, N. S., Jackson, K. W., ... Wicha, M. S. (2006). Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Research*, 66(12), 6063–6071.

Liu, Y., Cao, X., Jiang, J., & Jia, J. (2007). Fused-Costal2 protein complex regulates Hedgehog-induced Smo phosphorylation and cell-surface accumulation. *Genes & Development*, 21, 1949–1963.

Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M., & Beachy, P. A. (2003). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells. *Science (New York, N.Y.)*, 299, 2039–2045.

Lum, L., Zhang, C., Oh, S., Mann, R. K., Kessler, D. P. Von, Taipale, J., ... Beachy, P. A. (2003). Hedgehog Signal Transduction via Smoothed Association with a Cytoplasmic Complex Scaffolded by the Atypical Kinesin , Costal-2. *Mol Cell*, 12, 1261–1274.

Makino, S., Masuya, H., Ishijima, J., Yada, Y., & Shiroishi, T. (2001). A Spontaneous Mouse Mutation, mesenchymal dysplasia (mes), Is Caused by a Deletion of the Most C-Terminal Cytoplasmic Domain of patched (ptc). *Developmental Biology*, 239(1), 95–106.

Maloverjan, A., Piirsoo, M., Michelson, P., Kogerman, P., & Østerlund, T. (2009). Identification of a novel serine / threonine kinase ULK3 as a positive regulator of Hedgehog pathway. *Experimental Cell Research*, 316(4), 627–637.

Malpel, S., Claret, S., Sanial, M., Brigui, A., Piolot, T., Daviet, L., ... Plessis, A. (2007). The last 59 amino acids of Smoothed cytoplasmic tail directly bind the protein kinase Fused and negatively regulate the Hedgehog pathway. *Developmental Biology*, 303, 121–133.

Marigo, V., Johnson, R. L., Vortkamp, a, & Tabin, C. J. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Developmental Biology*, 180(1), 273–283.

Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D. A., Sasaki, H., & McMahon, A. P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development*, 121(8), 2537–2547.

Martín, V., Carrillo, G., Torroja, C., & Guerrero, I. (2001). The sterol-sensing domain of

patched protein seems to control smoothed activity through patched vesicular trafficking. *Current Biology*, 11(8), 601–607.

Martinez Arias, A., Baker, N. E., & Ingham, P. W. (1988). Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)*, 103(1), 157–70.

Matusek, T., Wendler, F., Polès, S., Pizette, S., D'Angelo, G., Fürthauer, M., & Théron, P. P. (2014). The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog. *Nature*, 516, 99–103.

McGlinn, E., & Tabin, C. J. (2006). Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16(4), 426–432.

Meloni, A. R., Fralish, G. B., Kelly, P., Salahpour, A., Chen, J. K., Wechsler-Reya, R. J., ... Caron, M. G. (2006). Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7550–7560.

Methot, N., & Basler, K. (2000). Suppressor of fused opposes hedgehog signal transduction by impeding nuclear accumulation of the activator form of Cubitus interruptus. *Development*, 127(18), 4001–4010.

Méthot, N., & Basler, K. (1999). Hedgehog Controls Limb Development by Regulating the Activities of Distinct Transcriptional Activator and Repressor Forms of Cubitus interruptus. *Cell*, 96, 819–831.

Micchelli, C. a, The, I., Selva, E., Mogila, V., & Perrimon, N. (2002). Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development (Cambridge, England)*, 129(4), 843–51.

Miele, E., Po, A., Begalli, F., Antonucci, L., Mastronuzzi, A., Marras, C. E., ... Ferretti, E. (2017). β -arrestin1-mediated acetylation of Gli1 regulates Hedgehog/Gli signaling and modulates self-renewal of SHH medulloblastoma cancer stem cells. *BMC Cancer*, 17(1), 1–12.

Milenkovic, L., Scott, M. P., & Rohatgi, R. (2009). Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *Journal of Cell Biology*, 187(3), 365–374.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., ... Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL–caspase-9 complex. *Nature Cell Biology*, 11(6), 739–746.

Mohler, J., & Vani, K. (1992). Molecular organization and embryonic expression of the hedgehog gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development*, 115, 957–971.

Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Ruiz-Gomez, A., & de Celis, J. F. (2007). The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 7963–7968.

Molnar, C., Ruiz-Gomez, A., Martin, M., Rojo-berciano, S., Mayor Jr, F., & de Celis, J. F. (2011). Role of the *Drosophila* Non-Visual β -Arrestin Kurtz in Hedgehog Signalling. *Plos*

Genetics, 7(3).

Monnier, V., Ho, K. S., Sanial, M., Scott, M. P., & Plessis, A. (2002). Hedgehog signal transduction proteins: contacts of the Fused kinase and Ci transcription factor with the Kinesin-related protein Costal2. *BMC Developmental Biology*, 2(4), 1–9.

Müller, B., & Basler, K. (2000). The repressor and activator forms of Cubitus interruptus control Hedgehog target genes through common generic Gli-binding sites. *Development*, 127, 2999–3007.

Na Suh, H., & Jae Han, H. (2014). Sonic hedgehog increases the skin wound-healing ability of mouse embryonic stem cells through the microRNA 200 family. *British Journal of Pharmacology*, 172(3), 815–828.

Nakano, Y., Kim, H. R., Kawakami, A., Roy, S., Schier, A. F., & Ingham, P. W. (2004). Inactivation of dispatched 1 by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Developmental Biology*, 269(2), 381–392.

Nakato, H., Futch, T. A., Selleck, S. B., Baker, N. E., Benzer, S., Boynton, S., ... Glover, D. M. (1995). The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development (Cambridge, England)*, 121(11), 3687–702.

Nedelcu, D., Liu, J., Xu, Y., Jao, C., & Salic, A. (2013). Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothened in Hedgehog signaling. *Nature Chemical Biology*, 9(9), 557–564.

Nieuwenhuis, E., Barnfield, P. C., Makino, S., & Hui, C. chung. (2007). Epidermal hyperplasia and expansion of the interfollicular stem cell compartment in mutant mice with a C-terminal truncation of Patched1. *Developmental Biology*, 308(2), 547–560.

Noureddine, M. A., Donaldson, T. D., Thacker, S. A., & Duronio, R. J. (2002). *Drosophila* Roc1a encodes a RING-H2 protein with a unique function in processing the Hh signal transducer Ci by the SCF E3 ubiquitin ligase. *Developmental Cell*, 2(6), 757–770.

Nozawa, Y. I., Yao, E., Lin, C., Yang, J. H., Wilson, C. W., Gacayan, R., & Chuang, P. T. (2013). Fused (Stk36) is a ciliary protein required for central pair assembly and motile cilia orientation in the mammalian oviduct. *Developmental Dynamics*, 242(11), 1307–1319.

Nüsslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795–801.

Nybakken, K. E., Turck, C. W., Robbins, D. J., & Bishop, J. M. (2002). Hedgehog-stimulated Phosphorylation of the Kinesin-related Protein Costal2 Is Mediated by the Serine/Threonine Kinase Fused *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24638–24647.

Ocbina, P. J. R., Eggenschwiler, J. T., Moskowitz, I. P., & Anderson, K. V. (2011). Complex Interactions Between Genes Controlling Trafficking in Primary Cilia. *Health and Human Services*, 8(43), 547–553.

Ogden, S. K., Jr, M. A., Stegman, M. A., Suber, L. M., Hooper, J. E., & Robbins, D. J. (2003). Identification of a Functional Interaction between the Transmembrane Protein Smoothened

and the Kinesin-Related Protein Costal2. *Current Biology*, 13, 1998–2003.

Oh, S., Kato, M., Zhang, C., Guo, Y., & Beachy, P. A. (2015). A Comparison of Ci / Gli Activity as Regulated by Sufu in Drosophila and Mammalian Hedgehog Response. *PLoS ONE*, 10(8), 1–27.

Ohlmeyer, J. T., & Kalderon, D. (1998). Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature*, 396, 749–753.

Ou, C. Y., Lin, Y. F., Chen, Y. J., & Chien, C. T. (2002). Distinct protein degradation mechanisms mediated by Cul1 and Cul3 controlling Ci stability in Drosophila eye development. *Genes and Development*, 16(18), 2403–2414.

Paces-Fessy, M., Boucher, D., Petit, E., Paute-Briand, S., & Blanchet-Tournier, M.-F. (2004). The negative regulator of Gli, Suppressor of fused (Sufu), interacts with SAP18, Galectin3 and other nuclear proteins. *The Biochemical Journal*, 378(Pt 2), 353–62.

Pagán-Westphal, S. M., & Tabin, C. J. (1998). The transfer of left-right positional information during chick embryogenesis. *Cell*, 93(1), 25–35.

Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L., & Wang, B. (2006). Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation Sonic hedgehog Signaling Regulates Gli2 Transcriptional Activity by Suppressing Its Processing and Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 26(9), 3365–3377.

Pan, Y., & Wang, B. (2007). A novel protein-processing domain in Gli2 and Gli3 differentially blocks complete protein degradation by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 10846–10852.

Pan, Y., Wang, C., & Wang, B. (2009). Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development. *Developmental Biology*, 326(1), 177–189.

Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C., & Eaton, S. (2005). Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, 435(7038), 58–65.

Park, H. L., Bai, C., Platt, K. A., Matisse, M. P., Beeghly, A., Hui, C. c, ... Joyner, A. L. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development (Cambridge, England)*, 127(8), 1593–605.

Peacock, C. D., Wang, Q., Gesell, G. S., Corcoran-Schwartz, I. M., Jones, E., Kim, J., ... Matsui, W. (2007). Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 4048–4053.

Pedersen, L. B., & Rosenbaum, J. L. (2008). *Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT). Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Inc.

Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., ... Galdes, A. (1998). Identification of a Palmitic Acid-modified Form of Human Sonic hedgehog *. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 14037–14045.

- Pham, A., Therond, P., Georges, A., Tournier Blanchet, F., Busson, D., Lamour-Isnard, C., ... Tricoire, H. (1995). The Suppressor of fused Gene Encodes a Novel PEST Protein Involved in Drosophila Segment Polarity Establishment. *Genetics*, *140*, 587–598.
- Pierani, A., Brenner-Morton, S., Chiang, C., & Jessell, T. M. (1999). A Sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell*, *97*(7), 903–915.
- Polizio, A. H., Chinchilla, P., Chen, X., Kim, S., Manning, D. R., & Riobo, N. A. (2011). Heterotrimeric Gi proteins link hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(22), 19589–19596.
- Porter, J. a, Young, K. E., & Beachy, P. a. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, *274*(5285), 255–259.
- Preat, T. (1992). Characterization of Suppressor of fused, a complete suppressor of the fused segment polarity gene of Drosophila melanogaster. *Genetics*, *132*(3), 725–736.
- Preat, T., Therond, P., Limbourg-Bouchon, B., Pham, A., Tricoire, H., Busson, D., & Lamour-Isnard, C. (1993). Segmental polarity in Drosophila melanogaster: Genetic dissection of fused in a Suppressor of fused background reveals interaction with costal-2. *Genetics*, *135*(4), 1047–1062.
- Price, M. A., & Kalderon, D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell*, *108*(6), 823–835.
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., & Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods*, *5*(1), 877–879.
- Ramírez-Weber, F. A., & Kornberg, T. B. (1999). Cytonemes: Cellular processes that project to the principal signaling center in Drosophila imaginal discs. *Cell*, *97*(5), 599–607.
- Ranieri, N., Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., & Théron, P. P. (2012). Distinct Phosphorylations on Kinesin Costal-2 Mediate Differential Hedgehog Signaling Strength. *Developmental Cell*, *22*(22), 279–294.
- Ranieri, N., Ruel, L., & Théron, P. P. (2014). Switch of PKA substrates from Cubitus interruptus to Smoothed in the Hedgehog signalosome complex. *Nature Communications*, *5*(5034), 1–14.
- Ricolo, D., Butí, E., & Araújo, S. J. (2015). Drosophila melanogaster Hedgehog cooperates with Frazzled to guide axons through a non-canonical signalling pathway. *Mechanisms of Development*, *137*, 11–22.
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E., & Tabin, C. (1993). Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, *75*(7), 1401–1416.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, *16*(10), 522–529.

- Riobó, N. A., Lu, K., Ai, X., Haines, G. M., & Emerson, C. P. (2006). Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(12), 4505–10.
- Robarge, K. D., Brunton, S. A., Castanedo, G. M., Cui, Y., Dina, M. S., Goldsmith, R., ... Xie, M. (2009). GDC-0449-A potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *19*(19), 5576–5581.
- Robbins, D. J., Nybakken, K. E., Kobayashi, R., Sisson, J. C., Bishop, J. M., & The, P. P. (1997). Hedgehog Elicits Signal Transduction by Means of a Large Complex Containing the Kinesin-Related Protein Costal2. *Cell*, *90*, 225–234.
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Philippe, B., Scherer, S. W., ... Muenke, M. (1996). Mutations in the Human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.*, *14*(3), 353–6.
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., & Scott, M. P. (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*, *317*, 372–376.
- Ruel, L., Gallet, A., Raisin, S., Truchi, A., Staccini-lavenant, L., Cervantes, A., & Théron, P. P. (2007). Phosphorylation of the atypical kinesin Costal2 by the kinase Fused induces the partial disassembly of the Smoothed- Fused-Costal2-Cubitus interruptus complex in Hedgehog signalling. *Development*, *134*(20), 3677–3689.
- Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-staccini, L., Théron, P. P., Cos, S., & Myc, C. (2003). Stability and association of Smoothed , Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nature Cell Biology*, *5*(10), 907–914.
- Sagner, A., & Briscoe, J. (2017). Morphogen interpretation: Concentration, time, competence, and signaling dynamics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *6*, 1–19.
- Sampath, K., Cheng, a M., Frisch, a, & Wright, C. V. (1997). Functional differences among Xenopus nodal-related genes in left-right axis determination. *Development (Cambridge, England)*, *124*(17), 3293–302.
- Sanial, M., Bécam, I., Hofmann, L., Behague, J., Argüelles, C., Gourhand, V., ... Plessis, A. (2017). Dose-dependent transduction of Hedgehog relies on phosphorylation-based feedback between the G-protein-coupled receptor Smoothed and the kinase Fused. *Development*, *144*(10), 1841 LP-1850.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., & Elson, S. (1995). Drawing a Stripe in Drosophila Imaginal Disks: Negative Regulation of decapentuplegic and patched Expression by engrailed. *Genetics*, *139*, 745–756.
- Sanson, B. (2001). Generating patterns from fields of cells: Examples from Drosophila segmentation. *EMBO Reports*, *2*(12), 1083–1088.
- Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M., & Kondoh, H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development (Cambridge, England)*, *126*(17), 3915–

3924.

Saunders, J. W., & Fallon, J. F. (1966). Cell death in morphogenesis. *Major Problems of Developmental Biology*, 289–314.

Saunders, J. W., & Gasseling, T. M. (1968). Ectodermal–mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. *Epithelial–Mesenchymal Interactions*, Williams & Wilkins, Baltimore, 78–97.

Scales, S. J., & Sauvage, F. J. De. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Science*, 30(6), 303–312.

Schilling, T. F., Concordet, J.-P., & Ingham, P. W. (1999). Regulation of Left–Right Asymmetries in the Zebrafish by Shh and BMP4. *Developmental Biology*, 210(2), 277–287.

Shi, Q., Li, S., Jia, J., & Jiang, J. (2011). The Hedgehog-induced Smoothed conformational switch assembles a signaling complex that activates Fused by promoting its dimerization and phosphorylation. *Development*, 138, 4219–4231.

Shi, Q., Li, S., Li, S., Jiang, A., Chen, Y., & Jiang, J. (2014). Hedgehog-induced phosphorylation by CK1 sustains the activity of Ci / Gli activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(52), E5651–E5660.

Sisson, B. E., Ziegenhorn, S. L., & Holmgren, R. A. (2006). Regulation of Ci and Su(fu) nuclear import in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 294(1), 258–270.

Sisson, J. C., Ho, K. S., Suyama, K., & Scott, M. P. (1997). Costal2 , a Novel Kinesin-Related Protein in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell*, 90, 235–245.

Slusarski, D. C., Motzny, C. K., & Holmgren, R. (1995). Mutations that Alter the Timing and Pattern of cubitus interruptus Gene Expression in *Drosophila melanogush*. *Genetics*, 3–3(139), 229–240.

Smelkinson, M. G., & Kalderon, D. (2006). Processing of the *Drosophila* Hedgehog Signaling Effector Ci-155 to the Repressor Ci-75 Is Mediated by Direct Binding to the SCF Component Slimb. *Current Biology*, 16, 110–116.

Smelkinson, M. G., Zhou, Q., & Kalderon, D. (2007). Regulation of Ci-SCF Slimb Binding , Ci Proteolysis , and Hedgehog Pathway Activity by Ci Phosphorylation. *Developmental Cell*, 13, 481–495.

St-jacques, B., Hammerschmidt, M., & McMahon, A. P. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes & Development*, 13, 2072–2086.

Stanton, B. Z., Peng, L. F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Herlihy, K. M., ... Stuart, L. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signalling in human cells. *Nat Chem Biol*, 5(3), 154–156.

Stegman, M. A., Vallance, J. E., Elangovan, G., Sosinski, J., Cheng, Y., & Robbins, D. J. (2000). Identification of a Tetrameric Hedgehog Signaling Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29), 21809–21812.

- Strutt, H., Thomas, C., Nakano, Y., Stark, D., Neave, B., Taylor, A. M., & Ingham, P. W. (2001). Mutations in the sterol-sensing domain of patched suggest a role for vesicular trafficking in smoothed regulation. *Current Biology*, *11*(8), 608–613.
- Su, Y., Ospina, J. K., Zhang, J., Michelson, A. P., Schoen, A. M., & Zhu, A. J. (2012). Sequential Phosphorylation of Smoothed Transduces Graded Hedgehog Signaling. *Science Signaling*, *4*(180), 1–29.
- Suzuki, T., & Saigo, K. (2000). Transcriptional regulation of atonal required for Drosophila larval eye development by concerted action of eyes absent, sine oculis and hedgehog signaling independent of fused kinase and cubitus interruptus. *Development (Cambridge, England)*, *127*(7), 1531–40.
- Svärd, J., Henricson, K. H., Persson-Lek, M., Björn, R., Lauth, M., Asa, B., ... Teglund, S. (2006). Genetic Elimination of Suppressor of Fused Reveals an Essential Repressor Function in the Mammalian Hedgehog Signaling Pathway. *Developmental Cell*, *10*, 187–197.
- Sweet, H. O., Bronson, R. T., Donahue, L. R., & Davisson, M. T. (1996). Mesenchymal dysplasia: a recessive mutation on chromosome 13 of the mouse. *The Journal of Heredity*, *87*(2), 87–95.
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., & Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature*, *418*(August), 892–897.
- Takizawa, C. G., & Morgan, D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(6), 658–665.
- Talamillo, A., Bastida, M., Fernandez-Teran, M., & Ros, M. A. (2005). The developing limb and the control of the number of digits. *Clinical Genetics*, *67*(2), 143–153.
- Tay, S. Y., Ingham, P. W., & Roy, S. (2005). A homologue of the Drosophila kinesin-like protein Costal2 regulates Hedgehog signal transduction in the vertebrate embryo. *Development (Cambridge, England)*, *132*(4), 625–34.
- Tempé, D., Casas, M., Karaz, S., Blanchet-Tournier, M.-F., & Concordet, J.-P. (2006). Multisite protein kinase A and glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation leads to Gli3 ubiquitination by SCFbetaTrCP. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(11), 4316–26.
- Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S. L., Loipetzberger, A., Connor, T., ... Esterbauer, H. (2012). Hedgehog partial agonism drives warburg-like metabolism in muscle and brown fat. *Cell*, *151*(2), 414–426.
- Thayer, S. P., Pasca, M., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., ... Andrew, L. (2013). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, *425*(6960), 851–856.
- Therond, P. P., Knight, J. D., Kornberg, T. B., & Bishop, J. M. (1996). Phosphorylation of the fused protein kinase in response to signaling from hedgehog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 4224–4228.
- Theunissen, J.-W., & de Sauvage, F. J. (2009). Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer. *Cancer*

Research, 69(15), 6007–6010.

Thibert, C., Teillet, M.-A., Lapointe, F., Mazelin, L., Le Douarin, N. M., & Mehlen, P. (2003). Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. *Science*, 301(5634), 843–846.

Tickle, C. (2002). Molecular basis of vertebrate limb patterning. *American Journal of Medical Genetics*, 112(3), 250–255.

Torroja, C., Gorfinkiel, N., & Guerrero, I. (2004). Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development (Cambridge, England)*, 131, 2395–2408.

Torroja, C., Gorfinkiel, N., & Guerrero, I. (2005). Mechanisms of Hedgehog gradient formation and interpretation. *Journal of Neurobiology*, 64(4), 334–356.

Tremblay, M. R., Lescarbeau, A., Grogan, M. J., Tan, E., Lin, G., Austad, B. C., ... Castro, A. C. (2009). Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(14), 4400–4418.

Tukachinsky, H., Kuzmickas, R. P., Jao, C. Y., Liu, J., & Salic, A. (2012). Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand. *Cell Reports*, 2(2), 308–320.

Tukachinsky, H., Lopez, L. V., & Salic, A. (2010). A mechanism for vertebrate Hedgehog signaling: Recruitment to cilia and dissociation of SuFu-Gli protein complexes. *Journal of Cell Biology*, 191(2), 415–428.

Tukachinsky, H., Petrov, K., Watanabe, M., & Salic, A. (2016). Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), E5866–E5875.

Turing, A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 237(641), 37–72.

Tuson, M., He, M., & Anderson, K. V. (2011). Protein kinase A acts at the basal body of the primary cilium to prevent Gli2 activation and ventralization of the mouse neural tube. *Development*, 138(22), 4921–4930.

van den Heuvel, M., & Ingham, P. W. (1996). Smoothed Encodes a Receptor-Like Serpentine Protein Required for Hedgehog Signalling. *Nature*.

van Straaten, H. W. M., Thors, F., Wiertz-Hoessels, L., Hekking, J., & Drukker, J. (1985). Effect of a notochordal implant on the early morphogenesis of the neural tube and neuroblasts: Histometrical and histological results. *Developmental Biology*, 110(1), 247–254.

Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., Berghe, T. Vanden, ... Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–47.

Véronique Monnier, François Dussillol, Georges Alves, C. L.-I. and A. P. (1998). Suppressor of

- fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway Véronique Monnier , François Dussillol , Georges Alves , Claudie Lamour-Isnard. *Current Biology*, 8, 583–586.
- Vincent, J. P. (2008). Hedgehog Nanopackages Ready for Dispatch. *Cell*, 133(7), 1139–1141.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., & Tabin, C. J. (1996). Regulation of Rate of Cartilage Differentiation by Indian Hedgehog and PTH-Related Protein. *Science*, 273(5275), 613–622.
- Vyas, N., Goswami, D., Manonmani, A., Sharma, P., Ranganath, H. A., Vijayraghavan, K., ... Mayor, S. (2008). Nanoscale Organization of Hedgehog Is Essential for Long-Range Signaling. *Cell*, 133, 1214–1227.
- Vyas, N., Walvekar, A., Tate, D., Lakshmanan, V., Bansal, D., Lo Cicero, A., ... Dhawan, J. (2014). Vertebrate Hedgehog is secreted on two types of extracellular vesicles with different signaling properties. *Scientific Reports*, 4, 7357 (1-12).
- Wagner, W., & Wehrmann, M. (2007). Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(6), 1342–1351.
- Wang, B., & Li, Y. (2006). Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 33–38.
- Wang, C., Pan, Y., & Wang, B. (2010). Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors. *Development*, 137(12), 2001–2009.
- Wang, G., & Jiang, J. (2004). Multiple Cos2/Ci interactions regulate Ci subcellular localization through microtubule dependent and independent mechanisms. *Developmental Biology*, 268, 493–505.
- Wang, Q. T., & Holmgren, R. A. (1999). The subcellular localization and activity of Drosophila cubitus interruptus are regulated at multiple levels. *Development (Cambridge, England)*, 126(22), 5097–5106.
- Wang, Q. T., & Holmgren, R. A. (2000). Nuclear import of Cubitus interruptus is regulated by Hedgehog via a mechanism distinct from Ci stabilization and Ci activation. *Development*, 127, 3131–3139.
- Wang, Y., & Price, M. A. (2008). A Unique Protection Signal in Cubitus interruptus Prevents Its Complete Proteasomal Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 28(18), 5555–5568.
- Watkins, D. N., Berman, D. M., Burkholder, S. G., Wang, B., Beachy, P. A., & Baylin, S. B. (2003). Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422(6929), 313–317.
- Wilson, C. W., Nguyen, C. T., Chen, M.-H., Yang, J.-H., Gacayan, R., Huang, J., ... Chuang, P.-T. (2009). Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature*, 459(7243), 98–102.

- Wilson, L., Gale, E., Chambers, D., & Maden, M. (2004). Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Developmental Biology*, *269*(2), 433–446.
- Wilson, P. a, Lagna, G., Suzuki, a, & Hemmati-Brivanlou, a. (1997). Concentration-dependent patterning of the *Xenopus* ectoderm by BMP4 and its signal transducer Smad1. *Development (Cambridge, England)*, *124*(16), 3177–84.
- Wolpert, L. (1969). Positional Information and the Spatial Pattern of Cellular Differentiation. *Journal of Theoretical Biology*, *25*, 1–47.
- Woods, I. G., & Talbot, W. S. (2005). The you gene encodes an EGF-CUB protein essential for hedgehog signaling in zebrafish. *PLoS Biology*, *3*(3), 0476–0487.
- Xia, R., Jia, H., Fan, J., Liu, Y., & Jia, J. (2012). USP8 promotes smoothed signaling by preventing its ubiquitination and changing its subcellular localization. *PLoS Biology*, *10*(1).
- Yam, P. T., Langlois, S. D., Morin, S., & Charron, F. (2009). Sonic Hedgehog Guides Axons through a Noncanonical, Src-Family-Kinase-Dependent Signaling Pathway. *Neuron*, *62*(3), 349–362.
- Yan, D., Wu, Y., Yang, Y., Belenkaya, T. Y., Tang, X., & Lin, X. (2010). The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development. *Development (Cambridge, England)*, *137*, 2033–2044.
- Yang, X., Mao, F., Lv, X., Zhang, Z., Fu, L., Lu, Y., ... Zhao, Y. (2013). *Drosophila* Vps36 regulates Smo trafficking in Hedgehog signaling. *Journal of Cell Science*, *126*(18), 4230–4238.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., ... Tickle, C. (1997). Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development (Cambridge, England)*, *124*(21), 4393–404.
- Yao, S., Lum, L., & Beachy, P. (2006). The Ihog Cell-Surface Proteins Bind Hedgehog and Mediate Pathway Activation. *Cell*, *125*(2), 343–357.
- Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., ... de Sauvage, F. J. (2008). A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, *455*(7211), 406–410.
- Yavari, A., Nagaraj, R., Owisu-Ansah, E., Folick, A., Ngo, K., Hillman, T., ... Banerjee, U. (2010). Role of lipid metabolism in Smoothed de-repression in Hedgehog signaling. *Developmental Cell*, *19*(1), 54–65.
- Yu, F.-Y., Hong, Y.-Y., Qu, J.-F., Chen, F., & Li, T.-J. (2014). The large intracellular loop of Ptch1 mediates the non-canonical Hedgehog pathway through cyclinB1 in Nevroid basal cell carcinoma syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, *34*(2), 507–512.
- Yuan, X., Cao, J., He, X., Serra, R., Qu, J., Cao, X., & Yang, S. (2016). Ciliary IFT80 balances canonical versus non-canonical hedgehog signalling for osteoblast differentiation. *Nature Communications*, *7*, 11024.
- Zadorozny, E. V, Little, J. C., & Kalderon, D. (2015). Contributions of Costal 2-Fused interactions to Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Development*, *142*, 1–12.

- Zeng, H., Jia, J., & Liu, A. (2010). Coordinated translocation of mammalian gli proteins and suppressor of fused to the primary cilium. *PLoS ONE*, *5*(12), e15900 (1-12).
- Zeng, X., Goetz, J. a, Suber, L. M., Scott, W. J., Schreiner, C. M., & Robbins, D. J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, *411*(6838), 716–20.
- Zhang, C., Williams, E. H., Guo, Y., Lum, L., & Beachy, P. A. (2004). Extensive phosphorylation of Smoothed in Hedgehog pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(52), 17900–17907.
- Zhang, Q., Shi, Q., Chen, Y., Yue, T., Li, S., Wang, B., & Jiang, J. (2009). Multiple Ser / Thr-rich degrons mediate the degradation of Ci / Gli by the Cul3-HIB / SPOP E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21191–21196.
- Zhang, Q., Zhang, L., Wang, B., Ou, C. Y., Chien, C. T., & Jiang, J. (2006). A Hedgehog-Induced BTB Protein Modulates Hedgehog Signaling by Degrading Ci/Gli Transcription Factor. *Developmental Cell*, *10*(6), 719–729.
- Zhang, W., Zhao, Y., Tong, C., Wang, G., Wang, B., Jia, J., ... Aza-blanc, C. (2005). Hedgehog-Regulated Costal2-Kinase Complexes Control Phosphorylation and Proteolytic Processing of Cubitus Interruptus. *Developmental Cell*, *8*, 267–278.
- Zhang, Y., Mao, F., Lu, Y., Wu, W., Zhang, L., & Zhao, Y. (2011). Transduction of the Hedgehog signal through the dimerization of Fused and the nuclear translocation of Cubitus interruptus. *Cell Research*, *21*(10), 1436–1451.
- Zhang, Z., Feng, J., Pan, C., Lv, X., Wu, W., Zhou, Z., ... Zhao, Y. (2013). Atrophin–Rpd3 complex represses Hedgehog signaling by acting as a corepressor of Ci. *Journal of Cell Biology: Report*, *203*(4), 575–583.
- Zhang, Z., Shen, L., Law, K., Zhang, Z., Liu, X., Hua, H., ... Cheng, S. Y. (2016). Suppressor of Fused chaperones Gli proteins to generate transcriptional responses to Sonic Hedgehog signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *37*(3), MCB.00421-16.
- Zhao, Y., Tong, C., & Jiang, J. (2007a). Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature*, *450*, 252–259.
- Zhao, Y., Tong, C., & Jiang, J. (2007b). Transducing the hedgehog signal across the plasma membrane. *Fly*, *1*(6), 333–336.
- Zheng, X., Mann, R. K., Sever, N., & Beachy, P. A. (2010). Genetic and biochemical definition of the Hedgehog receptor. *Genes and Development*, *24*(1), 57–71.
- Zhou, F. E. N., Huang, D., Li, Y., Hu, G., Rao, H. A. I., Lu, Q., ... Wang, Y. A. O. (2017). Nek2A / SuFu feedback loop regulates Gli-mediated Hedgehog signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, *50*, 373–380.
- Zhou, Q., & Kalderon, D. (2011). Hedgehog Activates Fused through Phosphorylation to Elicit a Full Spectrum of Pathway Responses. *Developmental Cell*, *20*(6), 802–814.
- Zhu, A. J., Zheng, L., Suyama, K., & Scott, M. P. (2003). Altered localization of Drosophila

smoothened protein activates hedgehog signal transduction. *Genes and Development*, 17(10), 1240–1252.

Zhu, Z. X., Sun, C. C., Ting Zhu, Y., Wang, Y., Wang, T., Chi, L. S., ... Jin, L. T. (2017). Hedgehog signaling contributes to basic fibroblast growth factor-regulated fibroblast migration. *Experimental Cell Research*, 355(2), 83–94.

Ziemba, B. P., Philling, C., Calleja, V., Larijani, B., & Falke, J. J. (2013). The PH Domain of PDK1 Exhibits a Novel, Phospho-Regulated Monomer-Dimer Equilibrium With Important Implications for Kinase Domain Activation: Single Molecule and Ensemble Studies. *Biochemistry*, 52(28), 1–22.