



HAL
open science

**DECOUVERTE ET CARACTERISATION
PHARMACOLOGIQUE DE NOUVEAUX
ANTAGONISTES DU RECEPTEUR SMOOTHENED :
LES COMPOSES MRT**

Hermine Roudaut

► **To cite this version:**

Hermine Roudaut. DECOUVERTE ET CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DE NOUVEAUX ANTAGONISTES DU RECEPTEUR SMOOTHENED : LES COMPOSES MRT. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : . tel-00638720

HAL Id: tel-00638720

<https://theses.hal.science/tel-00638720>

Submitted on 7 Nov 2011

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.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI
Spécialité : Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Hermine ROUDAUT

Le 03 novembre 2011

**DECOUVERTE ET CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DE
NOUVEAUX ANTAGONISTES DU RECEPTEUR SMOOTHENED :
LES COMPOSES MRT**

Directeur de thèse : Mr le Dr Martial RUAT

JURY

Mr le Dr Hervé DANIEL	Président
Mr le Dr Laurent PREZEAU	Rapporteur
Mme le Dr Isabelle MUS-VETEAU	Rapporteur
Mr le Pr Gilles VASSAL	Examineur
Mme le Dr Tania ATTIE-BITACH	Examineur
Mr le Dr Martial RUAT	Examineur

Remerciements

Ce travail de doctorat n'aurait pu aboutir sans les personnes citées ci-après. La contribution de près ou de plus loin de chacun mérite donc d'être remerciée :

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr M. Ruat pour m'avoir accueillie au sein de son équipe durant mon stage de M2 puis pour ces 3 années de thèse. Je le remercie bien évidemment pour son encadrement, le suivi de mes recherches et les nombreuses discussions scientifiques qui ont permis de mener à bien ce travail mais je lui suis plus particulièrement reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreuses collaborations, toutes très enrichissantes et pour m'avoir permis de présenter mes travaux à de nombreux congrès scientifiques.

Je remercie le Dr H. Daniel pour son encadrement au cours des deux ans de master effectués à l'université Paris Sud XI et également pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je tiens à vivement remercier les Dr L. Prézeau et Dr I. Mus-Veteau pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps consacré à l'écriture des rapports et surtout pour votre expertise scientifique mise au service de ces recherches.

De même, je remercie chaleureusement le Dr T. Attié-Bitach et le Pr G. Vassal pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

La suite de mes remerciements va aux collaborateurs chimistes, sans qui ce projet n'aurait pu voir le jour. Je remercie le Pr M. Taddei, le Dr A. Solinas, le Dr F. Manetti, le Dr A. Mann ainsi qu'A. Schoenfelder pour la synthèse des composés et le développement du modèle pharmacophorique qui ont été les pierres fondatrices de ce projet. Je remercie également le Dr L. Vincent pour les outils scientifiques qu'il a développés durant son passage dans l'équipe. Ils m'ont été précieux pour ce travail.

Je remercie également le Dr S. Creuzet pour sa collaboration et l'échange de ses connaissances. Merci d'avoir pris le temps nécessaire pour m'enseigner vos techniques et m'avoir fait découvrir un nouveau modèle.

Ayant effectué mon stage de M2 puis ma thèse à l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, je remercie le Dr G. Baux et le Dr P. Vernier de m'avoir accueillie au sein de leurs unités de recherche respectives, le laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire et le laboratoire de Neurobiologie & Développement. Merci également à l'ensemble des chercheurs et étudiants de l'INAF ainsi qu'au personnel du secrétariat, de l'animalerie et de la laverie qui rendent la vie des thésards au sein de l'institut plus facile en nous déchargeant de nombreuses tâches administratives et techniques. En particulier, je remercie Bernadette, Patricia, Pascal pour la partie intendance/logistique, et Dominique, Odile, Cindy pour la partie secrétariat. Au sein de ce laboratoire, j'ai également fait la rencontre d'étudiants et j'ai apprécié de pouvoir partager avec eux les questions,

inquiétudes mais aussi « les moments de gloire » de thésards. Merci donc, à Sébastien, Cathy, Gaëlle, Vincent, Eléonore et Lucille pour les discussions au coin des photocopieuses et imprimantes du bâtiment. Je remercie également Julien B. pour ses conseils avisés de brillant thésard (et c'est sans ironie, je précise) ainsi que pour ses encouragements.

Je poursuis ces remerciements par les membres de l'équipe Transduction du Signal et Neuropharmacologie Développementale avec qui je viens de passer ces 4 ans. Tout d'abord, un merci général pour l'accueil, l'entraide et le soutien qui règnent dans cette équipe, une vraie petite « seconde famille ».

Je remercie le Dr E. Traiffort pour sa gentillesse, son aide et bien sûr le partage de ses connaissances scientifiques. Elisabeth, je te suis plus que reconnaissante pour ton soutien tout au long de ces 4 années, pour ta disponibilité sans limite et pour le temps que tu as consacré aux corrections de ce manuscrit. Je te remercie également pour ton immense gentillesse, ta douceur et l'intérêt que tu portes à chacun. Saches que ces qualités maternelles rendent les jours des enfants thésards de l'équipe plus faciles et agréables.

Un grand merci au Dr H. Faure avec qui j'ai fait mes premiers pas en pharmacologie. J'ai apprécié de partager ton savoir scientifique et tes astuces techniques. J'admire ton côté Mac-Gyver des temps modernes ! J'ai également aimé nos quelques jours à Marseille, une autre façon de se connaître. Cependant, c'est par-dessus tout, ton côté super-maman autant dévouée à ses garçons qu'à son travail qui m'impressionne ! Félicitation, tu es une belle preuve que grande famille et investissement professionnel ne sont pas incompatibles.

Je remercie le Dr T. Gorojankina pour son aide technique et surtout pour les discussions scientifiques que nous avons eues côte à côte sous les hottes de culture ou au coin d'un de nos bureaux. Merci également pour tes encouragements, ta gentillesse et ta disponibilité.

Je remercie également Loïc et Lucille. La relève est assurée et je vous souhaite le meilleur pour vos 3 années de thèse au sein de l'équipe.

Enfin, un grand grand merci à Elodie et Julien. Cette thèse m'a permis de lier deux solides amitiés. Merci à toi Elodie, tu as été ma « deuxième grande sœur ». Même exilée en Suède, nous n'avons pas perdu contact. Tu as été un exemple pour moi. En guise de flambeau, j'ai gardé ton fond d'écran pendant un an et demi et ta chaise jusqu'à la fin de cette thèse ! Nous avons partagé au labo de bons moments : les retours en voiture en chanson ou bien monopolisés par mes questions existentielles et désormais, les heures au téléphone ou les WE à Lund qui continuent d'enrichir notre amitié... Moi qui ai toujours aimé être la petite de quelqu'un, avec ton instinct maternel, c'était fait pour fonctionner !

Quant à toi Julien, qui mieux que toi, a connu, écouté, subi les anecdotes qui ont jalonné cette thèse ? Bien plus qu'un collègue, tu es rapidement devenu un ami, un vrai. Nos heures dans le RER à débattre science parfois, futilités souvent ont été un plaisir, tout comme nos soirées Nouvelle Star ou Star Wars. Je crois que tu peux avoir la fierté d'être de ceux qui connaissent le mieux Mimine. De mon côté, je suis honorée d'être ta

FAP depuis maintenant 3 ans ! L'année prochaine, ce sera ton tour et je te souhaite le meilleur pour cette dernière année de thèse ainsi que pour THE Post-doc ! En tout cas, tu peux compter sur moi pour venir te rendre visite où que tu sois. Saches aussi que je ne doute pas de tes qualités de chercheur et sais d'ores et déjà que tu auras la brillante carrière que tu souhaites.

Un grand merci général à mes amis qui sont tous très chers à mon cœur. Vous m'avez permis de me changer les idées, relativiser et passer de bons moments durant ces 3 ans et depuis de nombreuses années pour certains. Autour d'un verre ou pour un resto, je me sens toujours bien entourée avec vous et même si je n'aurai sans doute plus d'anecdotes concernant des dissections de souris pour vous divertir, je vais tacher de continuer de vous amuser. Merci à Marion de m'avoir rappelée de temps en temps que je m'appelle bien « Roudaut » mais surtout merci pour avoir toujours été là, même depuis le Mexique, pour m'avoir encouragée, soutenue et tant fait rire. Je remercie aussi Laure, Nico, la BTS Team avec Steph, Monia, Ludo et Raph, mais aussi Chloé, Nicole, Claire et Magali. Connus à différentes étapes de ma petite vie, vous reflétez tous des traits différents de ma personnalité et vous composez une jolie mosaïque que j'espère garder à mes côtés le plus longtemps possible. Merci à vous tous pour votre présence, pour votre côté bon public qui me donne l'impression d'être drôle et pour tous les petits mots d'encouragements de ces derniers mois, sachez que ces petites attentions m'ont énormément touchée. Je n'ai pas été très disponible dernièrement et vous suis plus que reconnaissante de ne pas m'avoir oubliée pour autant. Désormais, je peux le dire : Mimine is Back !

J'en viens maintenant à remercier ma famille. Merci à vous, Papa et Maman de m'avoir permis de faire les études que je souhaitais, de m'avoir soutenue dans mes choix professionnels, mais surtout merci de m'avoir donnée la confiance, l'estime et la fierté qui ont été les moteurs de mon développement personnel. Même si à 25 ans, je ne suis plus une petite fille, je resterai « votre petite dernière ». Aujourd'hui, je me réjouis de pouvoir vous rendre fiers de votre travail de parent à travers ce doctorat. Maman, tu peux être particulièrement fière de toi puisque je doute fort que sans une maman à la maison qui me fasse réciter les leçons, j'en sois arrivée là. Je remercie aussi Etienne et Gaëlle. Ça y est la môme a fini ses études et je vais peut-être enfin arrêter de complexer secrètement sur vos parcours !! En tout cas, je vous remercie pour les encouragements du début de ma scolarité jusqu'à la fin de ma thèse, pour les conseils et mots rassurants concernant ma vie professionnelle et le reste... C'est si bon d'être la petite dernière avec un frère et une sœur comme vous et sachez que notre complicité m'est indispensable. Merci également à J.Mi et Isa, je suis ravie d'avoir un beaufrère et une belle-sœur comme vous ! Je remercie également mes grands parents et j'ai, en particulier, une pensée pour toi Papi Dabit car je sais que si tu avais été encore là, tu aurais lu ce manuscrit du début à la fin à l'affût de la moindre coquille. Je remercie également la famille Bonnet : Jacques, Chantal, Nicolas, Cynthia, Christophe et Aude, sachez que je suis très contente de vous avoir comme belle-famille. Vos petits mots d'encouragement et l'intérêt que vous portez à mon travail sont des marques d'affection qui me vont droit au cœur.

Enfin, mes plus sincères remerciements sont pour toi, Manu. Tu es arrivé au début de ma deuxième année de thèse, autant dire que tu n'as pas commencé par le plus

facile... Si pendant 3 mois, j'ai réussi à te laisser croire que j'étais une fille cool et zen, tu t'es bien vite rendu compte du contraire... Tu as toujours su faire ce qu'il fallait, tu as pris la relève de ma famille pour le réconfort et pour subir ma mauvaise humeur chronique... Saches que tu le fais mieux que quiconque ! Je te remercie pour ton soutien sans faille mais aussi pour les innombrables surprises que tu me fais, ta tendresse, ton amour... Cette thèse, tu y as plus que contribué à travers toutes ces petites et grandes attentions. J'ai bien conscience de la chance que j'ai de t'avoir rencontré, voilà deux ans que je suis perchée sur un petit nuage et je ne compte pas le quitter de sitôt. Je ne sais comment te remercier pour tout cela... Comme je te le dis souvent, dans cette période de flou qui arrive, je ne suis sûre que d'une chose, je veux continuer ma route avec toi, où que ce soit...

Je pense n'avoir oublié personne et il est désormais temps de vous présenter l'aboutissement de ce travail de thèse qui marque, pour moi, la fin d'une aventure et le début d'une autre...

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
BC	BODIPY-cyclopamine
BCC	Basal cell-carcinoma ou carcinome basocellulaire
BMP	Bone morphogenetic protein ou protéine morphogène de l'os
Boc	Brother-of-Cdo
Boi	Brother-of-Ihog
Cdo	Cam-related/down-regulated by oncogenes
CE ₅₀	Concentration efficace à 50 %
Ci	Cubitus interruptus
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50 %
CKI	Caséine kinase 1
Cos2	Costal 2
CRD	Cystein Rich Domain ou domaine riche en cystéine
CSC	Cellule souche cancéreuse
Dhcr7	7-déhydrocholestérol réductase
Dhh	Desert Hedgehog
Disp	Dispatched
EGF	Epidermal growth factor ou facteur de croissance de l'épiderme
EGL	External granule cell layer ou couche externe granulaire
FDA	Food and drug administration ou agence américaine de contrôle des aliments et médicaments
FRET	Fluorescence resonance energy transfer ou transfert d'énergie par résonance de type Förster
Fu	Fused
Fz	Frizzled
Gas 1	Growth arrest specific gene 1
GCP	Granule cell precursor ou précurseurs des cellules granulaires
GDP	Guanosine diphosphate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein ou acide protéique fibrillaire glial
GFP	Green fluorescent protein ou protéine fluorescente verte
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRK2	G protein-coupled receptor kinase 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate
Hh	Hedgehog
Hh-N	Fragment Hedgehog N-terminal
Hh-Np	Fragment Hedgehog N-terminal palmitoylé
Hhip	Hedgehog interacting protein
HPE	Holoprosencéphalie
HSPG	Héparane sulfate protéoglycane

HTS	High throughput screening ou criblage à haut débit
IFT	Intraflagellar transport ou transport intraflagellaire
IGF1	Insulin-like growth factor 1 ou facteur de croissance ressemblant à l'insuline
IGF1R	Récepteur à l'IGF1
Ihh	Indian Hedgehog
Ihog	Interference Hedgehog
Kif	Kinesin family ou famille de kinésine
LDL	Low density lipoprotein ou lipoprotéine de faible densité
LMC	Leucémie myéloïde chronique
MB	Médulloblastome
NPC	Niemann-Pick C
OPC	Oligodendrocyte precursor cell ou cellules précurseurs des oligodendrocytes
PDGF	Platelet-derived growth factor ou facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PI4P	Phospho-inositol-4-phosphate
PKA	Protéine kinase A
PSA-NCAM	Polysialylated-neural cell adhesion molecule ou molécule d'adhésion des cellules neurales polysialylée
Ptc	Patched
PTX	Pertussis toxin ou toxine pertussique
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RGC	Retinal ganglion cell ou cellule ganglionnaire de la rétine
RMS	Rhabdomyosarcome
RND	Resistance nodulation division
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
Smo-WT	Smoothened sauvage
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SLOS	Smith-Lemli-Opitz syndrom ou syndrome de Smith-Lemli-Opitz
SSD	Sterol sensing domain ou domaine sensible aux stérols
Sufu	Suppressor of Fused
TM	Transmembranaire
TMR	Trajet de migration rostrale
VEGF	Vascular endothelial growth factor ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
vNTS	Noyau ventral du tractus solitaire
ZSG	Zone sous-granulaire
ZSV	Zone sous-ventriculaire

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Schéma de la maturation post-traductionnelle de la protéine Hedgehog	5
Figure 2 : Réception du signal Hedgehog sur une cellule de drosophile ou de mammifère	8
Figure 3 : Phylogénie et structure du récepteur Smoothened (Smo)	16
Figure 4 : Structure du cil primaire	23
Figure 5 : Localisation subcellulaire des complexes protéiques impliqués dans la signalisation Hedgehog dans le cil primaire	25
Figure 6 : Signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)	27
Figure 7 : La voie Hedgehog contrôle la différenciation des précurseurs neuraux du tube neural et la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet	31
Figure 8 : Signalisation Sonic Hedgehog et cellules souches dans le follicule pileux	39
Figure 9 : Aires de neurogenèse dans le cerveau de rongeur adulte	43
Figure 10 : Voie Sonic Hedgehog et développement de carcinomes basocellulaires	49
Figure 11 : Les différents modèles impliquant la signalisation Hedgehog dans les cancers	56
Figure 12 : Site d'action des principales molécules régulatrices de la signalisation Sonic Hedgehog dans le cil primaire	62
Figure 13 : Structures et mécanisme d'action des molécules dérivées du cholestérol capables d'activer ou d'inhiber la signalisation Hedgehog	65
Figure 14 : Structures chimiques des principaux agonistes synthétiques de Smoothened	70
Figure 15 : Structures et affinités de la cyclopamine et de ses dérivés	73
Figure 16 : Structures et activités des principaux antagonistes de synthèse de Smoothened	77
Figure 17 : Structures et affinités des principaux antagonistes de la voie Hedgehog dont la cible n'est pas le récepteur Smoothened	84
Figure 18 : Schéma des deux principales approches de criblage de molécules	146
Figure 19 : Modèle d'activation du récepteur Smoothened chez les vertébrés	152
Figure 20 : Schéma des modifications aboutissant aux résistances observées après le traitement de médulloblastomes par des antagonistes de Smoothened	158

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rôles majeurs de la signalisation Hedgehog dans le développement des tissus périphériques	37
Tableau 2 : Modèles murins de médulloblastomes	51
Tableau 3 : Inhibiteurs de la signalisation Hedgehog développés en clinique	81
Tableau 4 : Etude de relations structure-activité de dérivés de MRT-10	150

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. Mécanisme d'action de la voie Sonic Hedgehog.....	3
1. <i>Synthèse et sécrétion du ligand.....</i>	3
1.1. Synthèse.....	3
1.2. Sécrétion et transport.....	4
2. <i>Réception.....</i>	7
2.1. Patched.....	7
2.2. Hedgehog Interacting Protein.....	10
2.3. Les membres de la famille des protéines Ig/fibronectines Cdo et Boc.....	10
2.4. Les autres protéines capables de lier Hh.....	11
3. <i>Le récepteur Smoothened.....</i>	12
3.1. Structure du récepteur Smo.....	13
3.2. Signalisation.....	17
3.3. Smo : un récepteur couplé au protéine G ?.....	24
II. Physiologie et physiopathologie.....	29
1. <i>Signalisation Hh au cours du développement et chez l'adulte.....</i>	29
1.1. Signalisation Hh et développement du système nerveux.....	29
1.2. Signalisation Hh et développement des tissus périphériques.....	35
1.3. Rôle de la voie Shh dans le cerveau adulte.....	36
2. <i>Pathologies.....</i>	44
2.1. Cancers.....	44
2.2. Autres pathologies.....	57
III. Pharmacologie de la voie Hedgehog.....	61
1. <i>Pharmacologie du récepteur Smo.....</i>	61
1.1. Agonistes.....	61
1.2. Antagonistes.....	67
2. <i>Pharmacologie des autres composantes de la voie Hh.....</i>	79
2.1. Cibles pharmacologiques en amont de Smo.....	80
2.2. Cibles pharmacologiques en aval de Smo.....	82
IV. Présentation du sujet de thèse.....	87
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	89
Résumé de l'article <i>Manetti et al, 2010, Mol. Pharmacol.....</i>	91
Résumé de l'article <i>Roudaut et al, 2011, Mol. Pharmacol.....</i>	103
Résumé de l'article <i>Solinas et al, 2011, en préparation.....</i>	115

DISCUSSION	141
I. Modèle pharmacologique et criblage virtuel : une approche novatrice pour la recherche d'antagonistes de Smo	143
1. <i>Le criblage à haut débit, avantages et inconvénients.....</i>	144
2. <i>Modèle pharmacophorique de Smo et criblage virtuel.....</i>	144
II. Découverte de nouvelles familles de composés	147
1. <i>Structures originales des composés MRT</i>	147
2. <i>Les composés MRT au sein des autres antagonistes de Smo.....</i>	149
2.1. <i>Au niveau de leur structure et de leurs sites de liaison sur Smo</i>	149
2.2. <i>Au niveau de leur mécanisme de régulation de Smo.....</i>	151
III. Intérêt et apport fonctionnel des nouveaux outils pharmacologiques.....	153
1. <i>Rôle du cil primaire dans la signalisation Hh et les tumeurs Hh-dépendantes..</i>	153
2. <i>Mutations et résistances consécutives à un traitement par un antagoniste de Smo</i>	156
3. <i>Deuxième génération d'antagonistes de Smo capables d'interagir avec le récepteur mutant D473H</i>	157
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	161

INTRODUCTION

I. Mécanisme d'action de la voie Sonic Hedgehog

La voie de transduction du signal Hedgehog (Hh) est une cascade de signalisation essentielle au développement et au maintien de nombreux tissus aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés (*Wilson and Chuang, 2010*). Les gènes Hh ont été identifiés, lors d'un criblage génétique visant à déterminer les gènes impliqués dans l'organisation du corps de la larve de drosophile (*Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980*). Chez les mammifères, cette famille de gènes regroupe trois orthologues que sont Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh). Les trois protéines correspondantes partagent les mêmes mécanismes de synthèse, sécrétion et transport jusqu'à leurs cibles (*Gallet, 2011*).

1. Synthèse et sécrétion du ligand

Les ligands Hh sont des morphogènes qui agissent aussi bien à courte qu'à longue distance de leur lieu de sécrétion sous forme d'un gradient de concentration. Les réponses des cellules réceptrices dépendent de la quantité de ligand à laquelle elles sont exposées et la variété des réponses induites (prolifération, migration, différenciation cellulaire) est aussi reliée à la complexité de la cascade de transduction (*Roelink et al., 1995* et pour revue, (*Dessaud et al., 2008; Roelink et al., 1995; Varjosalo and Taipale, 2008*).

1.1. Synthèse

Le ligand Hh est synthétisé sous la forme d'un précurseur d'environ 45 kDa. Après clivage de son peptide signal, il va subir une auto-protéolyse et l'addition d'une molécule de cholestérol sur l'extrémité C-terminale du fragment N-terminal de 19 kDa (Hh-N) ainsi généré (*Lee et al., 1994; Porter et al., 1996a; Porter et al., 1996b*). Cette protéolyse est liée à l'activité intrinsèque (protéine intron qui présente une activité enzymatique lui permettant de faire son propre épissage) de la partie C-terminale du précurseur. L'addition du cholestérol concomitante avec la protéolyse, permet l'association de Hh-N à la membrane plasmique, mais est également impliquée dans les effets à longue distance chez le mammifère comme chez la drosophile (*Gallet and Therond, 2005; Lewis et al., 2001; Zeng et al., 2001*). Le fragment Hh-N subira ensuite, une seconde modification lipidique, l'addition d'un acide gras

(Pepinsky *et al.*, 1998) sur le résidu cystéine amino-terminal grâce à l'activité de l'acyltransférase Skinny hedgehog (aussi appelée sightless, rasp ou central missing; (Buglino and Resh, 2008; Chamoun *et al.*, 2001) donnant ainsi naissance à la forme mature du ligand : Hh-Np (**Figure 1**). Cette dernière modification post-traductionnelle ainsi que l'autoprotéolyse et la dégradation du fragment C-terminal (Hh-C) ont lieu dans le réticulum endoplasmique (RE ; (Chen *et al.*, 2011b).

Ces modifications lipidiques seraient également responsables de la formation d'oligomères dont la structure semblable aux micelles facilite l'action à longue distance des morphogènes (Chen *et al.*, 2004a; Ohlig *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2001). Plus récemment encore, un rôle dans la réception du signal vient de leur être attribué. Le groupement cholestérol permet l'ancrage du ligand à la membrane plasmique. Le palmitate, quant à lui, augmente l'internalisation du ligand. Ces mécanismes participent à part entière à l'amplitude de la réponse au signal au niveau des cellules réceptrices (Grover *et al.*, 2011).

Si l'activité des protéines Hh est essentiellement liée à Hh-Np (Roelink *et al.*, 1995), une activité des protéines Hh non modifiées et de Hh-C a été rapportée dans le tube neural de poulet (Tokhunts *et al.*, 2010) ou dans la rétine de drosophile pour l'attraction des axones en élongation et la maturation des synapses (Chu *et al.*, 2006). Les modifications post-traductionnelles décrites ci-dessus demeurent cependant des étapes clefs et des mutations modifiant la maturation de la protéine Shh, sont à l'origine de l'holoprosencéphalie (HPE), un syndrome en particulier caractérisé par de sévères défauts de développement du cerveau et de la tête (Maity *et al.*, 2005; Traiffort *et al.*, 2004).

1.2. Sécrétion et transport

Bien que le ligand Hh-Np soit attaché à la membrane plasmique, nous venons de voir qu'il est capable d'agir à longue distance. Les mécanismes impliqués dans sa sécrétion comme dans son transport sont encore loin d'être complètement élucidés.

La protéine à douze domaines transmembranaires (TM) Dispatched (Disp) participerait aux deux processus (Callejo *et al.*, 2011; Etheridge *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2002). Sa structure l'apparente non seulement à la famille des protéines de transport contenant un domaine senseur de stérol (SSD pour Sterol Sensing Domain), mais aussi à celle des protéines

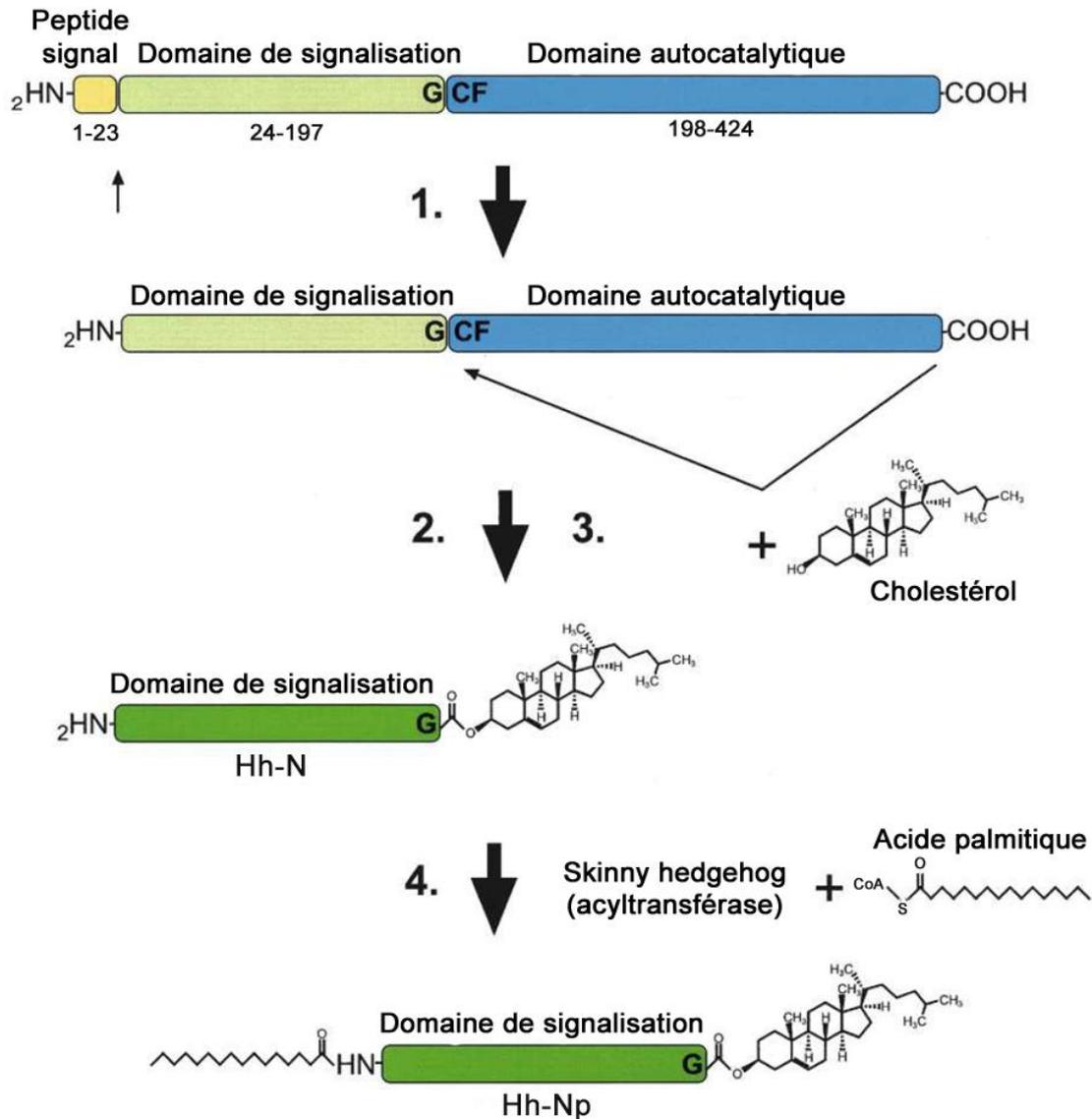


Figure 1 : Schéma de la maturation post-traductionnelle de la protéine Hedgehog.

(1) Le peptide signal est clivé. (2 et 3) Le domaine C-terminal catalyse la réaction de transfert intramolécule d'une molécule de cholestérol en C-terminal du fragment amino-terminal (Hh-N). (4) L'addition d'un acide palmitique sur l'extrémité N-terminale de Hh-N par l'acyltransférase Skinny hedgehog (Skn/rasp) conduit à la forme active Hh-Np. D'après (Varjosalo and Taipale, 2008).

« Résistance, Nodulation, Division » (RND) qui utilise un gradient de protons pour transporter de petites molécules lipophiles à travers les bicouches membranaires. Bien que des mutations des résidus impliqués dans la fonction de transport de Disp empêchent la libération de Hh-Np (*Ma et al., 2002*), une interaction directe entre Hh-Np et Disp n'a pas encore été montrée.

Les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG), des composants majeurs de la matrice extracellulaire ancrés dans la membrane plasmique des cellules via un glycosylphosphatidylinositol (GPI ; (*Steinhauer and Treisman, 2009*), semblent participer au transport de Hh-Np comme l'indique le mutant *tout velu* chez la drosophile (*Bellaïche et al., 1998*) incapable de synthétiser les glypicans Dally et Dally-like (*Han et al., 2004*). Les HSPG favorisent également la fixation du ligand Hh-Np à la surface des cellules réceptrices (*Lum et al., 2003a*). Plus récemment, une étude rapporte qu'ils peuvent être aussi considérés comme des régulateurs négatifs de la voie, puisque les glypicans de vertébrés exprimés dans des cultures de cellules de drosophile, agissent comme dominants négatifs en inhibant la signalisation Hh (*Williams et al., 2010*)).

L'activité à longue distance de Hh-Np pourrait aussi faire intervenir les lipoprotéines de basse densité (LDL) ou lipophorines chez la drosophile. Par un mécanisme encore inconnu à ce jour, Hh-Np serait chargé sur ces particules constituées d'une protéine d'échafaudage apolipoporphine I ou II et d'une monocouche de phospholipides entourée de cholestérols estérifiés et de triglycérides. Dans les larves de drosophile présentant un faible taux de lipophorines, Hh-Np s'accumule à proximité du site de production et est dépourvu d'activité à longue distance (*Panakova et al., 2005*).

La formation d'oligomères Hh-Np permettant de masquer les molécules de cholestérol de la forme active du ligand et donc d'accroître sa solubilité, favoriserait également la libération et l'action à longue distance de Hh-Np. Ces oligomères de 100 à 700 kDa associés à l'activité maximale du ligand (pour revue, (*Eaton, 2008*), ont été bien caractérisés *in vitro* et récemment mis en évidence *in vivo* (*Vyas et al., 2008*). Ils permettraient la formation de vésicules contenant Hh-Np et récemment mises en évidence dans le tube neural de souris (*Chamberlain et al., 2008*) ou dans des cultures de neurones de la rétine ou de l'hippocampe (*Beug et al., 2011*).

Enfin, dans le cerveau de rongeur adulte, le transport axonal antérograde de ShhN depuis le nerf optique jusqu'au collicule supérieur a été révélé après injection intraoculaire de méthionine radiomarquée (Traiffort *et al.*, 2001). L'immunolocalisation de Hh-Np dans les vésicules synaptiques des neurones de la rétine et le cofractionnement de Hh-Np avec des microvésicules semblables à des vésicules synaptiques dans les neurones d'hippocampe suggèrent fortement que la protéine Hh-Np pourrait être sécrétée par des neurones matures (Beug *et al.*, 2011).

2. Réception

La réception du signal Hh est assurée d'une part par des protéines membranaires capables d'interagir avec le ligand, et d'autre part par le récepteur Smoothened (Smo) qui est à l'inverse, incapable de fixer la protéine Hh, mais dont l'activité est régulée par le principal récepteur de Hh, Patched (Ptc ; **Figure 2**).

2.1. Patched

Ptc possède un rôle central dans la signalisation Hh et est associé à la majorité des effets de la voie de signalisation. Il s'agit d'une protéine à douze domaines TM appartenant à la superfamille des transporteurs RND et possédant un domaine SSD au niveau des domaines TM2 à 6 et deux grandes boucles extracellulaires situées entre les domaines TM1 et 2 d'une part, 7 et 8 d'autre part. Récemment, l'expression hétérologue et la purification de la conformation native et stable du récepteur humain dans des cellules de levures a pu être faite et va permettre par la suite, une étude plus approfondie des relations structure-fonction de ce récepteur (Joubert *et al.*, 2009). Alors qu'un seul gène Ptc a été initialement identifié chez la drosophile (Capdevila *et al.*, 1994; Hooper and Scott, 1989; Ingham, 1991), 2 gènes homologues ont été décrits chez les mammifères (Ptc1 et Ptc2; (Carpenter *et al.*, 1998; Ghahramani Seno *et al.*, 2011; Goodrich *et al.*, 1996).

La lignée de souris hétérozygotes Ptc1^{+/-} a permis d'associer une activité Ptc déficitaire à l'apparition de tumeurs telles que les médulloblastomes (MB) au niveau cérébral ou les rhabdomyosarcomes (RMS) au niveau musculaire, mais aussi de défauts développementaux de type polydactylie ou croissance anormale (Goodrich *et al.*, 1997). La

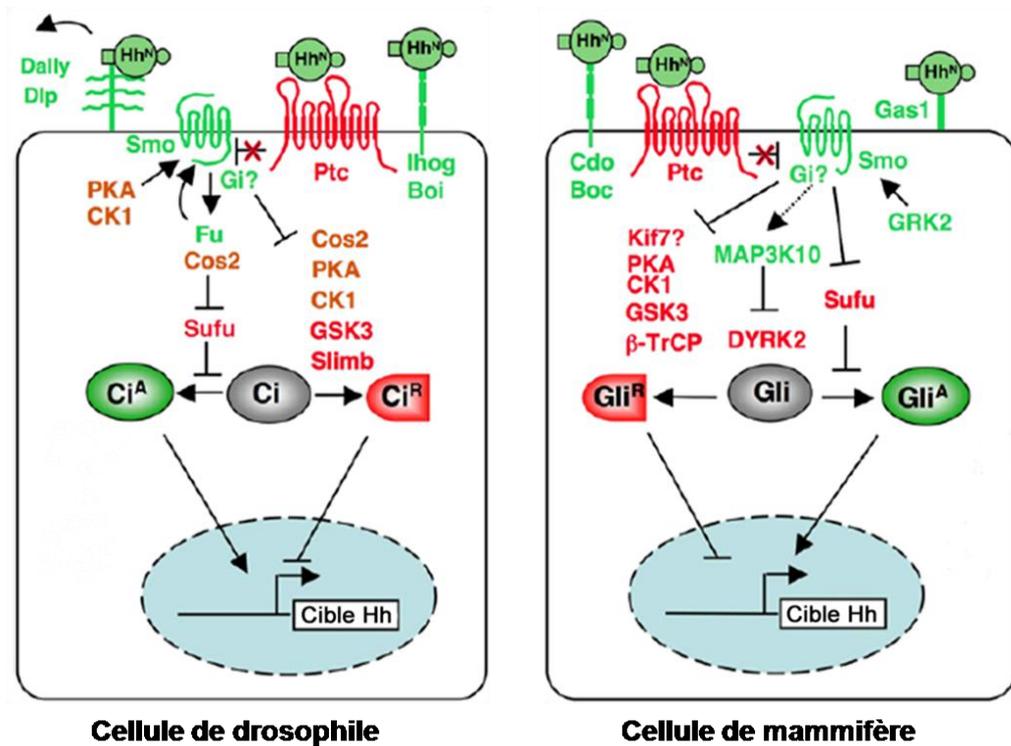


Figure 2 : Réception du signal Hedgehog sur une cellule de drosophile ou de mammifère.

La réception du signal Hedgehog (Hh) est facilitée par Ihog/Boi chez la drosophile et Cdo/Boc/Gas1 chez les mammifères. En l'absence de Hh, Patched (Ptc) bloque l'activation de Smoothened (Smo). La forme longue de Ci/Gli est phosphorylée par de multiples kinases, puis adressée au protéasome après ubiquitinylation via le complexe SCF^{Slimb/β-TRCP} pour générer une forme tronquée répressive (Ci^R/Gli^R). Chez la drosophile, la phosphorylation de Ci requiert la protéine kinésine Cos2, qui agit comme une protéine d'échafaudage pour lier Ci et ses kinases.

Chez la drosophile, la levée d'inhibition de Ptc sur Smo conduit à la phosphorylation de Smo par PKA et CKI, puis à son accumulation à la surface cellulaire et à son activation. Ensuite, Smo recrute Cos2-Fu pour activer Fu et dissocier le complexe Cos2-Ci-kinases, inhibant la phosphorylation de Ci et son traitement.

Chez les mammifères, Sufu est le principal inhibiteur de Gli. DYRK2 phosphoryle Gli2 et contrôle sa dégradation alors que MAP3K10 active Gli2 en inhibant DYKR2. La phosphorylation de Smo nécessite GRK2. Les Gai seraient impliquées dans la signalisation Hh en aval de Smo aussi bien chez la drosophile que chez les vertébrés. D'après (Jiang and Hui, 2008).

mise en évidence de ces tumeurs a permis de caractériser Ptc1 comme un suppresseur de tumeur. La mutation homozygote Ptc1^{-/-} est quant à elle létale au stade embryonnaire E9.5 et s'accompagne de défauts majeurs du développement des systèmes nerveux et cardiovasculaire. A l'inverse, les animaux Ptc2^{-/-} sont viables et ne présentent pas de défaut développemental majeur. Cependant, la combinaison des mutations Ptc1^{+/-} et Ptc2^{-/-} renforce l'incidence du développement des tumeurs. Ptc2 semble donc réguler la tumorigenèse, mais ne la déclenche pas (*Lee et al., 2006*). La majorité des activités de Hh-Np passe par Ptc1, c'est pourquoi il est communément admis que l'abréviation Ptc fait référence à Ptc1.

Hh-Np se lie à Ptc avec une affinité nanomolaire (*Fuse et al., 1999; Marigo et al., 1996; Stone et al., 1996*). Cette liaison met essentiellement en jeu les domaines extracellulaires de la partie N-terminale de Ptc (*Briscoe et al., 2001; Mullor and Guerrero, 2000*). Elle est suivie d'une internalisation du complexe démontrée chez la drosophile (*Bellaïche et al., 1998; Burke et al., 1999*) et dans un modèle d'explants de tube neural de poulet (*Incardona et al., 2000*).

Ptc participe vraisemblablement à la formation du gradient d'activité des protéines Hh qui dépendrait de la quantité de récepteurs Ptc liés au ligand par rapport à la quantité de récepteurs libres (*Casali and Struhl, 2004*) ou encore du nombre absolu de récepteurs Ptc exprimés à la surface de la cellule (*Casali, 2010*). Cette dernière hypothèse ferait intervenir la liaison d'une ubiquitine-ligase sur la partie C-terminale de Ptc indépendamment de la liaison du ligand, permettant sa dégradation et renforçant ainsi la fixation du ligand sur les autres récepteurs Ptc exprimés à la surface des cellules. La seconde activité majeure de Ptc est de réprimer l'activité constitutive de Smo en l'absence de Hh. La liaison de Hh à Ptc lèvera cette activité répressive en mettant vraisemblablement en jeu le domaine SSD de Ptc (cette activité sera détaillée dans le chapitre 3). D'autres activités indépendantes de la répression de Smo sont aussi associées à Ptc ; pour revue, (*Jenkins, 2009*). Ainsi, Ptc interagirait avec la cycline B1 dont il régulerait la localisation subcellulaire et participerait donc à la régulation de l'entrée des cellules en mitose (*Barnes et al., 2001*). Ptc peut également agir comme un récepteur à dépendance induisant une activité pro-apoptotique en l'absence de son ligand Hh et après clivage de son extrémité C-terminale par les caspases (*Thibert et al., 2003*). Ce fragment C-terminal clivé serait transloqué au noyau où il s'accumulerait et modulerait les facteurs de transcription de la voie (*Kagawa et al., 2011*). Enfin, un nouveau site de liaison des ligands Hh identifié sur la partie C-terminale de Ptc n'aurait aucune incidence sur

l'activité de Smo, mais stimulerait des protéines Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) 1 /2 (*Chang et al., 2010*). On peut supposer que la coordination de l'ensemble de ces activités associées à Ptc est nécessaire au développement embryonnaire physiologique.

2.2. Hedgehog Interacting Protein

La protéine Hedgehog Interacting Protein (Hhip) est une protéine TM de type I capable d'interagir avec les trois ligands Shh, Dhh et Ihh avec une affinité de l'ordre du nanomolaire similaire à celle de Ptc pour ces mêmes protéines (*Chuang et al., 2003*). Initialement identifiée chez l'embryon de souris, Hhip ne possède aucun orthologue chez la drosophile. Hhip contient une partie N-terminale comportant un domaine riche en cystéines (CRD pour Cystein Rich Domain), tandis que des motifs de liaison ressemblant à ceux du facteur de croissance épidermique (EGF pour Epidermal Growth Factor) sont situés à proximité de son extrémité C-terminale par laquelle elle s'associe à la surface de la cellule où elle est exprimée (*Bosanac et al., 2009*); pour revue, (*Beachy et al., 2010*). Une forme soluble et active de Hhip a aussi été mise en évidence dans le système nerveux de rongeurs adultes (*Coulombe et al., 2004*). La récente cristallisation de Hhip seule ou complexée avec ses ligands Hh a permis de montrer que les sites d'interaction de Shh avec Hhip ou Ptc sont superposables (*Bishop et al., 2009*).

Comme Ptc, Hhip est transcriptionnellement induit lors de l'activation de la voie Hh et les défauts majeurs observés chez les souris déficientes pour le gène Hhip font considérer cette protéine comme le régulateur physiologique négatif de la signalisation Hh (*Chuang et al., 2003; Chuang and McMahon, 1999*). Les souris déficientes à la fois pour les gènes Ptc et Hhip présentent des anomalies du développement très sévères renforçant l'idée que Ptc partage avec Hhip, son rôle dans le contrôle du développement embryonnaire (*Jeong and McMahon, 2005*). Cependant, à l'inverse de Ptc, l'action de Hhip ne passe pas par une modulation de l'activité de Smo.

2.3. Les membres de la famille des protéines Ig/fibronectines Cdo et Boc

Les protéines Cdo (Cam-related/down-Regulated by oncogenes) et Boc (Brother-of-Cdo) sont, chez les mammifères, les orthologues des protéines de drosophile Ihog et Boi

(Kang *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002); pour revue, (Wilson and Chuang, 2006) initialement décrites pour leurs rôles dans la réception du signal Hh (Lum *et al.*, 2003a) et leurs capacités à fixer les ligands Hh (McLellan *et al.*, 2006); pour revue, (Beachy *et al.*, 2010). Il s'agit de protéines comportant des domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig) et fibronectine de type III (FNIII), ainsi qu'un domaine TM et une partie C-terminale. Les 2 protéines interagissent avec les 3 ligands Hh via leur domaine FNIII (Tenzen *et al.*, 2006); (Kavran *et al.*, 2010) en mettant en jeu un site de liaison au calcium détecté après cristallisation du complexe ligand/récepteur (McLellan *et al.*, 2008). Plus récemment, des études chez la drosophile ont permis de montrer qu'Ihog serait inclus dans un complexe Ptc/Ihog/Hh-N dont la formation serait nécessaire à l'activation de la voie Hh faisant de Ihog et Boi non pas des co-récepteurs de Ptc, mais des composantes indispensables du complexe récepteur et nécessaires à la transduction du signal (Zheng *et al.*, 2010).

Les mutants murins et les études gain ou perte de fonction ont permis de montrer le rôle positif de Cdo et Boc dans la signalisation Hh. Ainsi, les souris mutantes Cdo^{-/-} ont un phénotype comparable à celui observé chez les mutants Shh^{-/-} et rappelant l'HPE humaine (Tenzen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). Si ce phénotype n'est pas observé chez les animaux Boc^{-/-}, la double-mutation Boc^{-/-}/Cdo^{-/-} renforce le phénotype des animaux Cdo^{-/-} suggérant aussi un rôle de Boc dans le développement précoce du tube neural (Allen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Exprimé par les neurones commissuraux, Boc participe notamment au guidage de leurs axones au niveau de la plaque du plancher dans le tube neural. Une hypothèse propose qu'après avoir lié Shh, Boc pourrait transmettre son signal après une interaction directe ou indirecte avec le récepteur Smo (Okada *et al.*, 2006).

2.4. Les autres protéines capables de lier Hh

Gas1 (Growth arrest specific genes 1) est une glycoprotéine à ancre GPI considérée comme un régulateur négatif de la croissance cellulaire ; pour revue, (Martinelli & Fan, 2007b). Initialement caractérisé comme un régulateur négatif de la voie Hh chez la drosophile (pour revue, (Kang *et al.*, 2007), Gas1 s'est récemment révélé être un régulateur positif de cette voie dans le tube neural avec l'existence d'un phénotype compatible avec une réduction de la signalisation Hh chez les mutants Gas1^{-/-} (Allen *et al.*, 2011; Allen *et al.*, 2007). Gas1 coopérerait avec Ptc dans la fixation du ligand Hh (Martinelli and Fan, 2007). Le phénotype

rappelant l'HPE est renforcé chez les doubles mutants $Gas1^{-}/Shh^{-}$ (Seppala et al., 2007). De plus, une mutation faux-sens identifiée dans Gas1 modifierait sa liaison à Shh et conduirait à des anomalies proches de l'HPE (Martinelli and Fan, 2009). Des études très récentes montrent qu'au même titre que Boc ou Cdo, Gas1 est essentiel pour la co-réception du ligand Hh, la différenciation et la maintenance des progéniteurs neuraux du tube neural, mais également la prolifération des précurseurs des cellules granulaires dans le cortex cérébelleux (Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011).

L'importance des HSPG dans la réception des signaux Hh est maintenant bien connue (pour revue, (Gallet, 2011) et un domaine Cardin-Weintraub conservé sur les protéines Hh a été identifié comme responsable de l'interaction Hh/HSPG (Rubin et al., 2002). Dans le cortex cérébelleux, cette interaction serait responsable de réponses spécifiques en particulier de la prolifération des précurseurs des cellules granulaires, alors qu'elle n'influencerait pas la différenciation cellulaire (Chan et al., 2009). Les HSPG facilitent et stabilisent également l'interaction entre Hh et Ptc ou Cdo/Boc prolongeant ainsi la durée de l'activité signalisatrice du morphogène. Chez la drosophile, l'interaction de la protéine Dally-like avec Hh peut alternativement induire (Yan et al., 2010) ou inhiber (Williams et al., 2010) la signalisation Hh. En accord avec cette propriété de régulateur négatif, les animaux déficitaires en glypican 3 présentent une croissance excessive et une prédisposition à développer des cancers (Filmus and Capurro, 2008). Ainsi, la fonction spécifique de chaque HSPG reste à être précisément déterminée.

Enfin, le ligand Shh est capable de se lier à la mégaline (LRP2/Gp330) appartenant à la famille des récepteurs aux LDL et exprimée sur la majorité des cellules épithéliales polarisées (McCarthy et al., 2002) et pour revue, (Fisher and Howie, 2006). La liaison de Shh à la mégaline a été démontrée à l'aide d'un ligand radiomarqué. Bien que des antagonistes de la mégaline inhibent l'internalisation du complexe Shh/mégaline et que des animaux déficients pour la mégaline présentent un phénotype rappelant l'HPE (Willnow et al., 1996), le rôle du récepteur dans la voie de signalisation est encore largement discuté.

3. Le récepteur Smoothened

Le récepteur Smo n'est pas une protéine capable de lier les morphogènes Hh, mais son rôle clef dans la signalisation et son étroite interaction avec le récepteur Ptc font qu'il est, à ce

jour, le récepteur de la voie le plus étudié. Si les souris hétérozygotes $\text{Smo}^{+/-}$ présentent un phénotype normal, les souris homozygotes $\text{Smo}^{-/-}$ présentent des défauts majeurs du développement rappelant les signes cliniques de l'HPE (Zhang *et al.*, 2001).

3.1. Structure du récepteur Smo

Historiquement, la découverte du récepteur Smo a été faite chez la drosophile à la suite d'un criblage génétique destiné à identifier les gènes impliqués dans la segmentation de la larve de l'insecte (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). D'autres études génétiques et le clonage de Smo ont démontré que le récepteur est requis pour l'activation de la signalisation Hh intracellulaire (Alcedo *et al.*, 1996; van den Heuvel and Ingham, 1996; Zhang *et al.*, 2001). Smo est un récepteur à 7 domaines TM, présentant un long domaine N-terminal extracellulaire et un long domaine C-terminal intracellulaire. Cette structure est semblable à celle des membres de la plus grande famille de récepteurs membranaires, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG ; pour revues, (Ayers and Therond, 2010; Kniazeff *et al.*, 2011; Rosenbaum *et al.*, 2009). L'expression hétérologue de la conformation native du récepteur Smo humain dans des cellules de levures a récemment été montrée et s'avère être d'un intérêt majeur pour son étude structurale et à plus long terme pour sa cristallisation (Nehme *et al.*, 2010). Par ailleurs, le couplage de Smo aux protéines G hétérotrimériques qui a déjà fait l'objet de nombreuses études, soulève encore de multiples questions (ce point sera abordé dans le paragraphe 3.3).

La superfamille des RCPG regroupe 5 sous-familles classifiées selon leur séquence protéique et la localisation du site de liaison de l'agoniste endogène sur le récepteur. Smo partage des caractéristiques structurales importantes avec la famille 5 des RCPG, les récepteurs Frizzled (Fz), dont les ligands endogènes sont les morphogènes Wnt (**Figure 3** et pour revue, (Schulte, 2010). Comme les récepteurs Fz, Smo possède un CRD dans sa partie N-terminale et ses domaines TM chez la drosophile présentent 31 % d'identité et 52 % de similarité avec le récepteur Fz. Cependant, contrairement à celui de Fz, le CRD de Smo n'a pas été impliqué dans sa liaison à un ligand endogène (Taipale *et al.*, 2002), mais des mutations ponctuelles et une forme tronquée du CRD empêchent l'activation maximale de la signalisation Hh chez le poisson-zèbre indiquant l'importance de ce domaine également chez les vertébrés (Aanstad *et al.*, 2009). L'extrémité N-terminale de Smo participe à son activité constitutive, mais est également à l'origine de la formation de dimères ou même de

multimères. Chez les mammifères, des formes dimériques et constitutivement actives du récepteur ont aussi été décrites. La liaison du ligand Shh à Ptc provoque un changement conformationnel de Smo, conduisant à un rapprochement du domaine C-terminal des deux composantes du dimère et correspondant à la forme activée du récepteur (*Zhao et al., 2007*).

Le CRD est connecté à l'heptahélice qui constitue le cœur du récepteur mais aussi la cible de la majorité des molécules régulatrices de son activité (*Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002b*). Des mutations des domaines TM telles que la C298Y dans le domaine TM2 ou W388Z dans le TM4 rendent la protéine inactive ou insensible à l'activité répressive de Ptc (*Nakano et al., 2004*). Par ailleurs, une mutation du récepteur Smo humain, W535L, a été identifiée dans une forme sporadique de carcinome basocellulaire (BCC pour Basal Cell-Carcinoma). Ce mutant M2 est une forme activée du récepteur. Située dans le domaine TM7, cette mutation pourrait modifier le couplage du récepteur aux protéines G (*Xie et al., 1998*).

Comme attendu pour un récepteur à 7 domaines TM, les boucles intracytoplasmiques et la partie C-terminale de la protéine font l'objet de modifications post-traductionnelles primordiales pour l'activation du récepteur. L'analyse par spectroscopie de masse du récepteur Smo de drosophile a révélé la présence dans ce domaine de 26 résidus sérine/thréonine phosphorylés en présence du ligand Hh. Ces résidus correspondent aux sites de phosphorylation de la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (PKA), de la caséine kinase 1 (CK1) et de la glycogen synthase kinase 3 (GSK3 ; (*Apionishev et al., 2005; Jia et al., 2004; Zhang et al., 2004*); pour revue, (*Aikin et al., 2008*)). La phosphorylation de l'extrémité C-terminale du récepteur est consécutive à la fixation de Hh sur Ptc et nécessaire à l'activation de Smo (*Jia et al., 2004*). Le blocage de l'activité des kinases PKA/CKI prévient l'accumulation du récepteur Smo à la membrane même en présence du ligand Hh, bloquant ainsi la transduction du signal Hh (*Jia et al., 2004*). De plus, la substitution des sites de phosphorylation par des résidus non-phosphorylables confère à Smo un rôle de dominant-négatif (*Apionishev et al., 2005; Zhang et al., 2004*). L'analyse précise du rôle de ces phosphorylations a été réalisée via des expériences de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer) indiquant que la phosphorylation du domaine C-terminal de Smo induit un changement conformationnel du récepteur nécessaire pour rompre les interactions électrostatiques au niveau du domaine autoinhibiteur sur l'extrémité C-terminale de Smo. Ce domaine est constitué de groupements d'acides aminés arginine chargés positivement qui régulent négativement l'activité de Smo,

empêchent son expression à la surface cellulaire et le conservent sous forme inactive. Le remplacement progressif de ces résidus arginine par un acide aminé neutre, l'alanine, active graduellement le récepteur Smo et permet à nouveau son expression à la membrane plasmique (*Zhao et al., 2007*). L'activité de Smo serait ainsi finement régulée par la neutralisation des arginines du domaine autoinhibiteur grâce aux phosphorylations subies par le récepteur. Ce mécanisme peut être comparé à un véritable rhéostat qui traduirait le gradient d'activité des protéines Hh. Ces résidus arginines sont aussi présents sur le récepteur Smo de mammifères où ils jouent un rôle identique.

Des résultats plus récents vont également dans le sens d'un modèle de phosphorylations séquentielles du récepteur Smo de drosophile qui lui permettent de traduire les effets associés à de faibles variations de concentrations des protéines Hh. Ainsi, la PKA est responsable des premières phosphorylations du récepteur qui sont ensuite renforcées par celles liées à l'activité de la CKI. Les phosphatases PP1 et PP4 déphosphorylent spécifiquement les sites phosphorylés respectivement par la PKA et la CKI (*Su et al., 2011*). Par ailleurs, la déphosphorylation de Smo par la phosphatase PP4 induit la désactivation du récepteur (*Jia et al., 2009a*). D'autres protéines kinases sont connues pour réguler l'activité des récepteurs à 7 domaines TM. C'est le cas de la sérine/thréonine kinase GRK2 (G protein-coupled receptor kinase 2) qui est, elle aussi, impliquée dans la régulation de l'activité de Smo chez les mammifères (*Chen et al., 2004b; Meloni et al., 2006*). GRK2 est une cible transcriptionnelle de la voie Hh positivement régulée lorsque cette voie est active. A l'inverse, la perte de l'expression de GRK2 entraîne une diminution du niveau d'expression des gènes cibles de la voie (*Molnar et al., 2007*). Des expériences de FRET ont permis de montrer une activité régulatrice de GRK2 dépendant de la phosphorylation du récepteur par les kinases PKA et CKI et nécessaire à son interaction avec le récepteur Smo. GRK2 peut aussi former des dimères/oligomères en se liant à l'extrémité C-terminale du récepteur. GRK2 stabiliserait alors la conformation active du récepteur et favoriserait sa dimérisation/oligomérisation. GRK2 régule ainsi le récepteur Smo par des mécanismes à la fois kinase-dépendants et kinase-indépendants (*Chen et al., 2011c*). Chez la drosophile, le domaine C-terminal de Smo se lie à la kinésine Costal (Cos2) qui fait partie d'un complexe de protéines intracellulaires nécessaires à la transmission du signal Hh (*Jia et al., 2003; Lum et al., 2003b; Ogden et al., 2003; Ruel et al., 2003*).

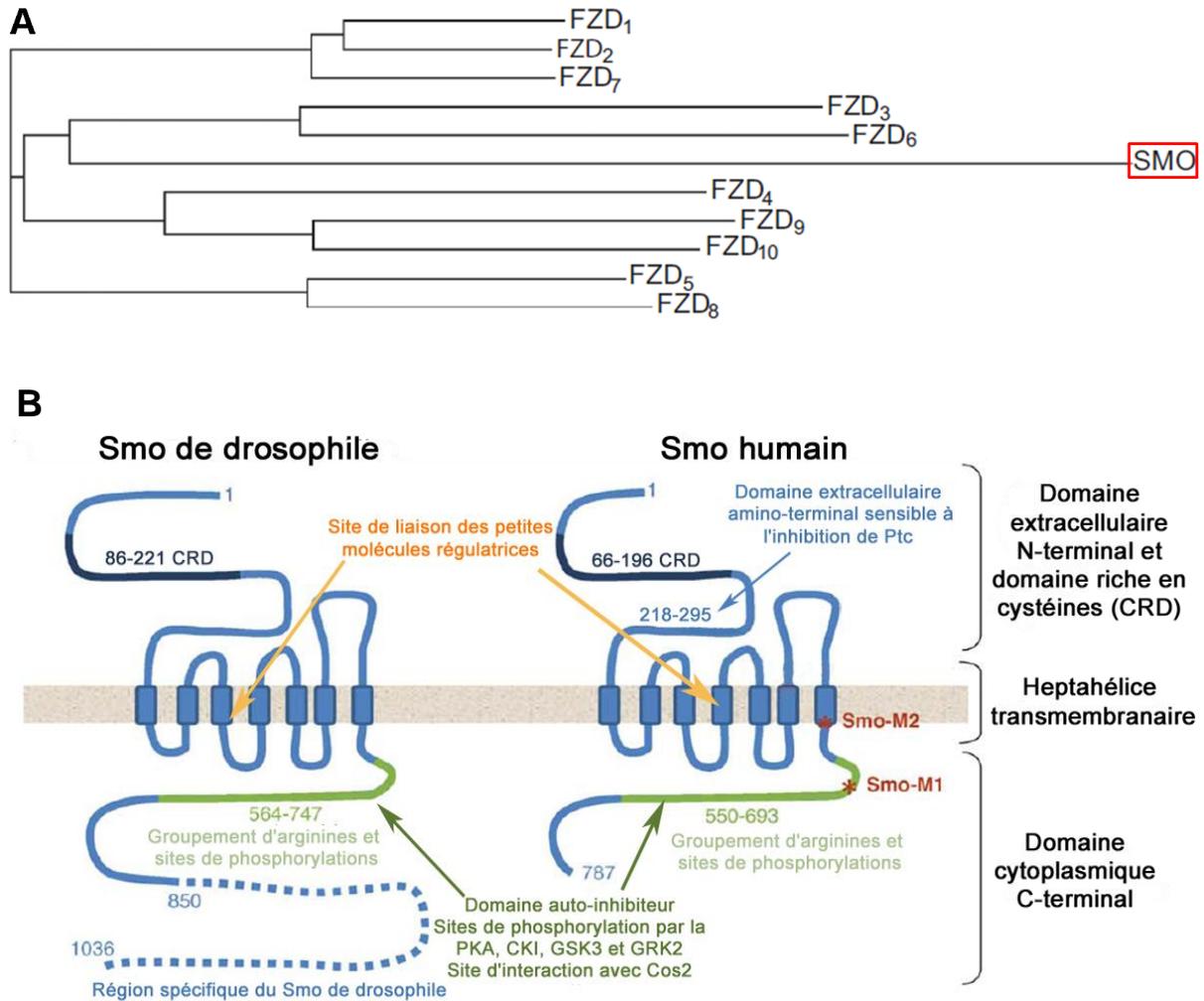


Figure 3 : Phylogénie et structure du récepteur Smoothened (Smo).

(A) Arbre phylogénique de la classe des récepteurs humains Frizzled 1-10 (FZD1-10) et Smo. (B) Schéma de la structure des récepteurs Smo de drosophile et humain. Les nombres indiquent la position des acides aminés. CRD : domaine riche en cystéines. Les étoiles rouges sur le Smo humain indiquent les mutations activatrices M1 et M2 isolées de carcinomes basocellulaires. D'après (Ayers and Therond, 2010; Schulte, 2010).

3.2. Signalisation

3.2.1. Régulation de Smo par le récepteur Patched

L'une des originalités de Smo est d'être un récepteur à 7 domaines TM dont le ligand endogène n'a pas encore été identifié, mais dont l'activité constitutive est bloquée par la protéine Ptc qui maintient Smo dans un état inactif (*Alcedo et al., 1996; Chen and Struhl, 1996*). La localisation de Smo au sein de la cascade de signalisation Hh a été rapidement caractérisée comme épistatique à Ptc (*Chen and Struhl, 1996; Hooper, 1994*). Depuis cette observation, l'identification des mécanismes permettant à Ptc de contrôler l'activité de Smo a suscité l'intérêt de nombreuses équipes de recherche ; pour revue, (*Rohatgi and Scott, 2007*). Un premier modèle proposait que Ptc et Smo pourraient interagir pour former un complexe de récepteurs associés à la membrane (*Murone et al., 1999*). Ce modèle dit « stœchiométrique » à été rapidement abandonné. En effet, une analyse de « cross-linking » entre les 2 protéines n'a pas permis de montrer d'interaction entre les 2 récepteurs (*Taipale et al., 2002*). Enfin, une seule molécule de Ptc est capable d'inhiber l'activité d'un nombre élevé de molécules Smo, ce qui caractérise un mécanisme catalytique et non pas stœchiométrique (*Ingham et al., 2000*). Par ailleurs, dans les disques imaginaux de drosophile, l'absence de coexpression des récepteurs Ptc et Smo suggère que les deux récepteurs pourraient également fonctionner de manière indépendante (*Denef et al., 2000 ; Incardona et al., 2002*).

La similitude entre Ptc et les pompes à petites molécules RND laisse penser que Ptc pourrait transporter et donc modifier la concentration ou la localisation d'une petite molécule second messenger régulant le récepteur Smo (*Taipale et al., 2002*). Une protéine structurellement proche de Ptc est codée par le gène Niemann-Pick C1 (NPC1). Il s'agit d'un autre membre de la famille des transporteurs RND qui comme Ptc, possède un domaine SSD et joue un rôle important dans le métabolisme des stérols et le transport des vésicules stérols-dépendantes (*Martin et al., 2001*). Deux mutations dans le domaine SSD de Ptc ont été identifiées comme responsables du contrôle de la répression de Smo (*Strutt et al., 2001*). De plus, plusieurs observations laissent supposer que les lipides interviennent dans la signalisation Hh ; pour revue, (*Eaton, 2008*). Ainsi, les oxystérols, des dérivés des stérols, sont capables d'induire l'activation de Smo de façon indirecte (*Dwyer et al., 2007*). Un autre dérivé des stérols endogènes, la vitamine D₃, a été proposé comme un régulateur négatif de Smo sur des fibroblastes en culture, mais aussi sur l'embryon de poisson-zèbre (*Bijlsma et al., 2006*). Par ailleurs, chez la drosophile, l'activation du récepteur Smo pourrait dépendre des

niveaux des phospholipides de type phospho-inositol-4-phosphate (PI4P) dont les taux sont augmentés en cas de perte de fonction de Ptc. En accord avec cette hypothèse, la perte de l'enzyme STT4 kinase nécessaire à la synthèse de PI4P entraîne un phénotype similaire à celui observé chez les animaux $Hh^{-/-}$ (Yavari et al., 2010).

D'autres données suggèrent aussi que Ptc pourrait participer à la régulation de la localisation subcellulaire de Smo via le transport de vésicules intracellulaires. En l'absence de son ligand, Ptc prévient le mouvement de Smo depuis ces vésicules jusqu'à la membrane plasmique et réduit également la concentration des protéines Smo dans la cellule, vraisemblablement en induisant son adressage aux lysosomes (Nakano et al., 2004). En accord avec ces observations, l'inactivation de Ptc engendre la translocation de Smo à la membrane plasmique, ce qui est suffisant pour activer la voie Hh (Zhu et al., 2003). Récemment, il a été proposé que Ptc contribuerait à l'efflux de cholestérol des cellules, une activité qui pourrait stabiliser Smo à la surface de la cellule (Bidet et al., 2011). Par ailleurs, Ptc est capable de réguler la dégradation de Smo en modifiant la composition en lipides des endosomes (Khaliullina et al., 2009).

3.2.2. Les facteurs de transcription Ci/Gli et les régulateurs intracellulaires

La fixation de Hh-N sur le récepteur Ptc lève l'inhibition exercée sur Smo, ce qui déclenche une cascade de signalisation intracellulaire complexe mettant notamment en jeu les facteurs de transcription Cubitus interruptus (Ci ; (Forbes et al., 1993) chez la drosophile ou Gli1, 2, 3 chez les vertébrés ; pour revue, (Ruiz i Altaba et al., 2007). Les 3 facteurs de transcription Gli possèdent 5 domaines à doigts de zinc leur permettant de se lier à l'ADN ainsi qu'un domaine transactivateur en C-terminal, mais seuls Gli2 et Gli3 ont un domaine répresseur en N-terminal clivable par autoprotéolyse. Après translocation dans le noyau, les facteurs de transcription se lient via leurs domaines à doigts de zinc à des séquences spécifiques, appelées « élément répondant à Gli » ; pour revue, (Ruiz i Altaba et al., 2007). Alors que des activités inductrices ou répressives de la transcription des gènes cibles sont respectivement associées aux formes non clivées Ci(75) et clivées Ci(55) de Ci, elles se répartissent entre les facteurs Gli1-3 chez les mammifères. Ainsi, l'activation transcriptionnelle est essentiellement liée à l'activité de Gli2, alors que Gli3 est la principale forme Gli associée à une répression transcriptionnelle. En l'absence de signal Hh, Gli2 et Gli3

sont phosphorylés et adressés au protéasome où ils sont clivés pour générer un fragment N-terminal doté d'une activité répressive (Gli3) ou dégradés par protéolyse (Gli2) ; pour revue, (Ruiz i Altaba et al., 2007). En présence de Hh, Gli2 et Gli3 ne sont pas clivés. La forme longue de Gli2 est un activateur transcriptionnel, tandis que la forme longue de Gli3 est très rapidement dégradée par le protéasome (Wen et al., 2010). Le schéma classique selon lequel la balance activateur-répresseur des facteurs de transcription contrôle la réponse des gènes cibles vient d'être revisité grâce à des études de modélisations thermodynamiques montrant que l'affinité des sites de liaison Ci sur les promoteurs des gènes cibles intervient dans la réponse transcriptionnelle finale (Parker et al., 2011). Contrairement à Gli2 et Gli3, Gli1 n'est pas clivé et fonctionne comme un activateur transcriptionnel permettant d'amplifier le niveau de signalisation Hh. Gli1 constitue par ailleurs, une cible transcriptionnelle de la voie Hh utilisée pour suivre le niveau d'activation de cette voie. En accord avec ces observations, l'inactivation de Gli2, contrairement à celle de Gli1, est létale chez l'embryon (Ding et al., 1998). Les animaux mutants pour Gli3 présentent, quant à eux, une expansion dorsale des progéniteurs ventraux du tube neural reflétant l'absence de l'activité répressive liée à Gli3 et donc une extension dorsale de la signalisation Hh (Persson et al., 2002).

Un complexe protéique intracytoplasmique semble intervenir entre la levée de l'activité répressive de Ptc sur Smo et la translocation au noyau des formes Ci/Gli activatrices. Chez la drosophile, il comporte la kinésine Cos2, la sérines/thréonines kinase Fused (Fu) et la protéine Suppressor of Fused (Sufu ; pour revues, (Aikin et al., 2008; Cheng and Yue, 2008). Fu est un régulateur positif de la voie Hh (Alves et al., 1998). Associée de manière stœchiométrique avec Cos2, Fu interagit avec Sufu et contrôle le niveau de phosphorylation de ces 2 protéines ; pour revues, (Aikin et al., 2008; Ayers and Therond, 2010). La kinase Fu est elle-même régulée en réponse à l'activation de la voie Hh. Elle est en particulier phosphorylée par la CKI. Très récemment, il a été proposé que l'interaction entre Smo et Cos2 stimule l'autoactivation de la kinase Fu en la phosphorylant et en l'adressant à la membrane, ce qui met donc en évidence une boucle de rétrocontrôle positif à l'origine de la stabilisation et de l'activation du facteur de transcription Ci (Zhou and Calderon, 2011). En phosphorylant à la fois Ci et Smo, les sérines/thréonines kinases CKI et GSK3 vont aussi participer à la formation des formes activatrices de Ci et aux modifications de conformation de Smo accompagnant la transduction du signal Hh.

Chez les mammifères, ni Cos2 ni Fu ne semblent avoir les rôles pivots qu'ils présentent chez la drosophile (*Chen et al., 2005; Varjosalo et al., 2006*). A l'inverse, Sufu a un rôle important et son interaction avec les facteurs de transcription Gli1-3 a été montrée par des expériences de co-immunoprécipitation (*Humke et al., 2010; Jia et al., 2009b*). Cependant, une étude très récente destinée à analyser l'activité des facteurs Gli chez la drosophile a permis de révéler un niveau de conservation de la voie Hh vraisemblablement plus important qu'initialement déterminé. Ainsi, un homologue de Cos2 pourrait réguler l'activité des protéines Gli chez les vertébrés (*Marks and Kalderon, 2011*).

3.2.3. Le cil primaire

3.2.3.1. Structure

Etant donné l'importance accordée au cil primaire dans la transduction du signal Hh depuis une dizaine d'années (en particulier l'adressage de Smo au cil), il paraît ici nécessaire de décrire cette structure très particulière de la cellule. Il s'agit d'une fine protrusion (1-5 μm de longueur) présente à la surface de la majorité des cellules chez les vertébrés, mais absente sur les cellules de drosophile. Il est constitué d'une membrane ciliaire entourant un axonème composé de neuf paires de microtubules (structure 9+0) contrairement au cil motile qui présente un doublet supplémentaire au centre des neufs paires (structure 9+2). L'axonème est relié au corps basal qui est le centriole mère nécessaire à l'élaboration des pôles mitotiques au cours du cycle cellulaire ; pour revues, (*Gerdes et al., 2009; Kobayashi and Dynlacht, 2011; Louvi and Grove, 2011*). Le cil primaire est une structure transitoire apparaissant en phases G0/G1 du cycle cellulaire lorsque les cellules sont quiescentes et que le centriole mère n'est donc pas requis pour la division cellulaire. Celui-ci peut alors migrer le long de la membrane plasmique et devenir le corps basal au niveau duquel le cil primaire commencera à se former. Pour cette raison, le cil primaire pourrait être considéré comme un frein à la prolifération cellulaire comme cela a été proposé au cours de la corticogenèse (*Li et al., 2011a*). Le corps basal possède également des structures accessoires telles que les fibres de transition, les pieds basaux et les radicules ciliaires qui permettent l'ancrage de la structure dans la membrane cytoplasmique. Le cil primaire est partiellement isolé du reste de la cellule par la zone de transition à sa base qui fonctionne à la fois comme un pore cellulaire et un point d'attache des protéines pénétrant dans le cil. Une barrière de diffusion est présente à la base du cil et empêche la fuite prématurée des protéines qui y sont entrées (*Hu et al., 2010*). Les protéines

sélectionnées pour entrer dans le cil sont transportées le long de l'axonème grâce au système de transport intraflagellaire (IFT) mis en évidence pour la première fois dans les flagelles de *Chlamydomonas* ; pour revue, (*Pedersen and Rosenbaum, 2008*). Ce transport est un processus motile bidirectionnel mettant en jeu de larges complexes protéiques ou particules IFT qui sont transportées le long de l'axonème grâce à un moteur kinésine (Kif3a et Kif3B) pour le transport antérograde du corps basal à la pointe du cil ou un moteur dynéine 1/2 pour le transport rétrograde de l'extrémité du cil au corps basal (**Figure 4**). Les modèles animaux présentant un déficit des mécanismes de transport antérograde ou rétrograde induisent respectivement l'absence de ciliogenèse normale ou la formation de cils courts et bombés (*Lai et al., 2011; Tran et al., 2008*). Par ailleurs, un grand nombre de gènes ciliaires impliqués dans la synthèse et la régulation des IFT ou bien la constitution du corps basal ont été identifiés et sont associés à différentes ciliopathies. La symptomatologie associée à ces pathologies décrites dans le chapitre II, est très variable et reflète la variété des rôles associés au cil primaire: mécanoperception, détection de molécules, photoréception, olfaction, transduction du signal de plusieurs voies de signalisation notamment Hh, Wnt et Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), toutes trois nécessaires pour la croissance et la différenciation des tissus ; pour revue, (*Goetz and Anderson, 2010*).

3.2.3.2. Régulation de la signalisation Sonic Hedgehog dans le cil primaire

La première mise en évidence d'un lien entre la signalisation Hh chez les vertébrés et le cil primaire vient de l'identification de mutants affectant la machinerie IFT notamment IFT172, IFT88, DYNC2H1 (sous-unité du moteur rétrograde dynéine) et Kif3a présentant des défauts rappelant ceux observés en cas de déficit de la signalisation Hh (*Goetz and Anderson, 2010; Huangfu and Anderson, 2005; Huangfu et al., 2003; May et al., 2005*). Si le phénotype observé chez le mutant DYNC2H1 s'est récemment révélé lié à un défaut de l'architecture du cil plus qu'à une dérégulation de la voie Hh (*Ocbina et al., 2011*), les mutants IFT entraînent un défaut de production des facteurs de transcription Gli sous leur forme répressive (GliR) et activatrice (GliA ; (*Davey et al., 2006; Haycraft et al., 2005; Kim et al., 2009; May et al., 2005*). Chez les mammifères et plus récemment chez le poisson-zèbre (*Kim et al., 2010a; Lunt et al., 2009*), la présence non seulement des facteurs de transcription Gli, mais aussi des récepteurs Ptc et Smo (*Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007*) et du régulateur négatif de la voie Sufu (*Jia et al., 2009b*) a été décrite dans le cil primaire. Par ailleurs, la protéine Shh

elle-même a été localisée à proximité du corps basal dans les cellules du tube neural ventral où une importante activité Hh est présente (*Chamberlain et al., 2008*).

Bien que les cellules de drosophile n'aient pas de cil primaire, des protéines indispensables à la signalisation Hh chez la drosophile possèdent, chez les vertébrés, un homologue qui joue un rôle dans le trafic des protéines au cil primaire. C'est le cas de l'homologue de Cos2, Kif7, indispensable à l'ancrage et au mouvement des composantes de la voie Hh au cil (*Liem et al., 2009*), mais aussi de la kinase Fu requise pour la ciliogenèse chez les vertébrés (*Wilson et al., 2009b*) et de la protéine à doigts de zinc Iguana associée à l'architecture du cil chez le poisson-zèbre (*Glazer et al., 2010*). Des travaux récents sur les planaires confortent l'hypothèse que certaines composantes de la voie Hh sont conservées au cours de l'évolution des espèces, mais que leurs rôles seraient plus reliés à l'architecture du cil qu'à la signalisation Hh proprement dite (*Rink et al., 2009*).

Sur le plan mécanistique, la liaison du ligand Hh sur Ptc bloque l'activité du récepteur exprimé dans le cil primaire et induit sa disparition de l'organelle par un mécanisme encore méconnu (*Rohatgi et al., 2007*). Simultanément, Smo s'accumule dans le cil par un mécanisme dépendant de l'inactivation de Ptc puisque la perte de fonction de Ptc induit la relocalisation de Smo dans le cil (*Corbit et al., 2005; Rohatgi et al., 2007*). La translocation de Smo au cil nécessite la β -arrestine 2 qui favorise l'interaction de Smo avec la protéine kinésine Kif3a et régule donc l'entrée du récepteur dans l'organelle (*Kovacs et al., 2008*). Par ailleurs, cette activité de la β -arrestine 2 s'oppose à celle décrite précédemment comme responsable de l'endocytose du récepteur Smo phosphorylé par la kinase GRK2 (*Chen et al., 2004b; Meloni et al., 2006*). Gas8, une sous-unité du complexe régulateur dynéine associée aux microtubules, vient d'être proposée comme un régulateur positif de la voie interagissant avec GRK2 chez le poisson-zèbre. En effet, l'invalidation de Gas8 diminue l'adressage de Smo au cil primaire, alors que sa surexpression engendre une stimulation de l'activité du récepteur dépendant de GRK2 (*Evron et al., 2011*). Comme chez la drosophile, GRK2 ne semble pas être uniquement à l'origine d'une activité kinase chez les vertébrés. Des expériences de co-immunoprécipitation associées à des analyses immunocytologiques montrent que GRK2 induit la conformation active du récepteur phosphorylé et l'adresse au cil primaire, suggérant un rôle de molécule d'échafaudage pour GRK2 (*Chen et al., 2011c*). Enfin, la forme phosphorylée active du récepteur Smo présente dans le cil primaire va induire l'accumulation des formes activatrices des facteurs de transcription Gli dans l'organelle

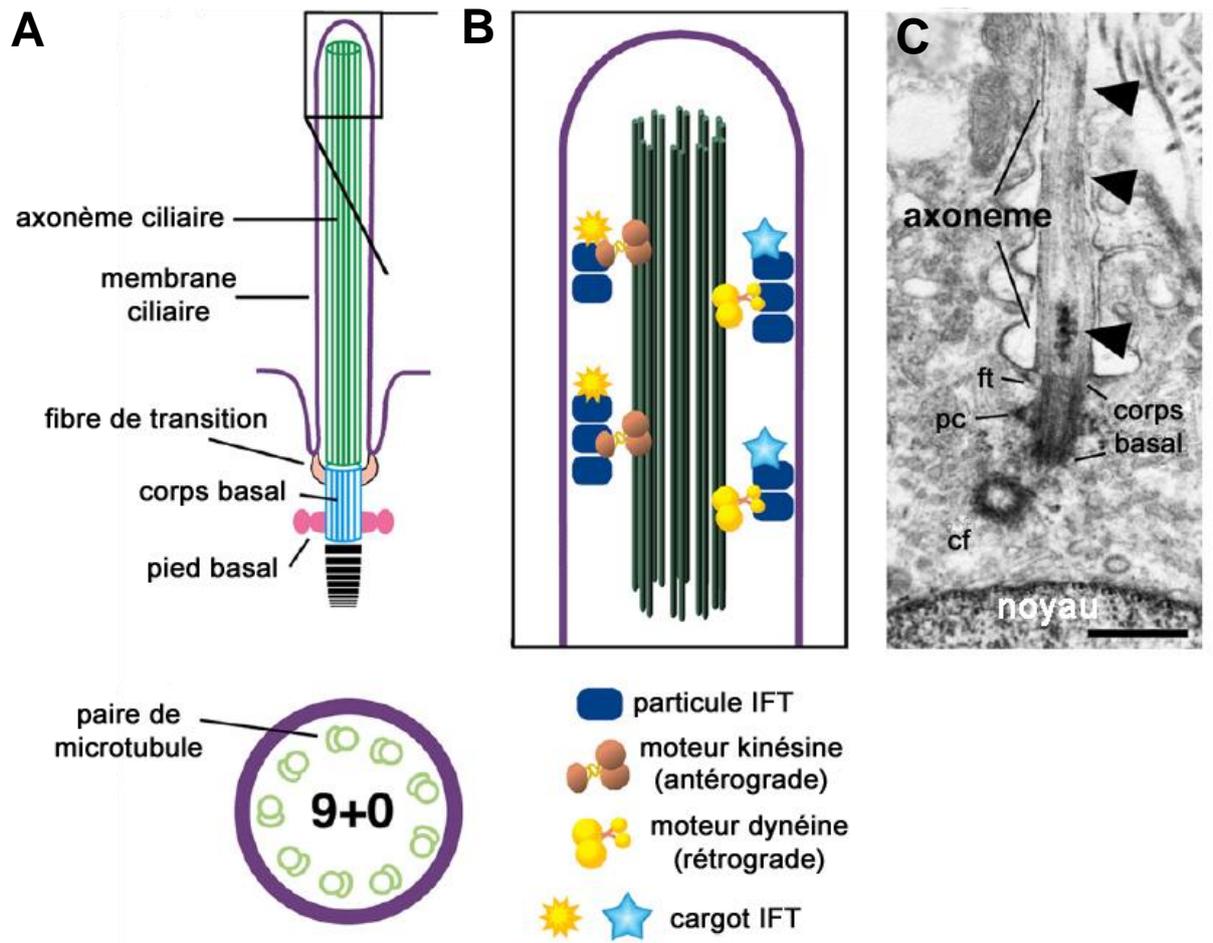


Figure 4 : Structure du cil primaire.

(A) Les principales composantes sont l'axonème ciliaire composé de microtubules (vert), la membrane ciliaire (violet) et le corps basal (bleu). Les fibres de transition (orange) forment une barrière perméable entre le cil et le reste de la cellule. Le pied basal (rose) et les radicules ciliaires (barres noires horizontales) fournissent le support mécanique. Le schéma du bas représente une coupe transversale à travers l'axonème indiquant les neuf paires de microtubules (structure 9+0). (B) Les macromolécules (soleil) importantes pour la ciliogenèse participent à la fixation des particules de transport intraflagellaire (IFT) sur les microtubules et à leur déplacement antérograde vers la pointe du cil via les moteurs kinésines. Les moteurs dynéines permettent de ramener les particules IFT de l'extrémité du cil vers le corps basal. (C) Microscopie électronique d'un cil primaire sur une cellule dans le cerveau de souris adulte. On retrouve l'axonème, le corps basal, les fibres de transition (ft), le pied basal (pb) et le centriole fille (cf). Les pointes de flèches indiquent des particules IFT voyageant le long du cil. La barre d'échelle représente 0,5 μm . D'après (Louvi and Grove, 2011).

(Chen *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2010); **Figure 5**). A l'heure actuelle, la compréhension des mécanismes d'activation de Smo est encore loin d'être complète et de multiples étapes nécessitent d'être éclaircies.

3.3. Smo : un récepteur couplé aux protéines G ?

L'analyse structurale de Smo montre que le récepteur présente d'importantes similitudes avec la classe des récepteurs à 7 domaines TM, les RCPG ; pour revues, (Ayers and Therond, 2010; Kniazeff *et al.*, 2011; Riobo and Manning, 2007). Cette classe de récepteurs permet la transmission de signaux en se couplant à des protéines capables de lier le GTP (Guanosine triphosphate), les protéines G hétérotrimériques, ce qui déclenche ensuite l'activation de seconds messagers (**Figure 6** et pour revue, (Rosenbaum *et al.*, 2009).

Dans plusieurs modèles de cellules de vertébrés, Smo est capable de se coupler à une protéine G. Ainsi, le récepteur Smo humain transfecté dans des mélanophores de Xénopus est capable d'induire une réponse en se couplant à la sous-unité α de la protéine G_i (inhibitrice) comme le montre sa sensibilité à la toxine pertussique (PTX ; (DeCamp *et al.*, 2000). La PTX bloque également la morphogenèse des capillaires induite par l'activation de la signalisation Hh (Kanda *et al.*, 2003). Dans une lignée de cellules de drosophile (Sf9) surexprimant le récepteur Smo de mammifère, l'activation complète des facteurs de transcription Gli met en jeu la protéine G_i (Riobo *et al.*, 2006b). Le récepteur Smo de vertébrés peut également se lier à d'autres protéines G hétérotrimériques telles que G_{12} ou G_{15} (Kasai *et al.*, 2004; Masdeu *et al.*, 2006). Cependant, ces couplages ne sont pas observés dans tous les modèles utilisés. Ainsi, les couplages entre le récepteur Smo et les protéines G_{12} et G_{13} ne sont pas observés dans les cellules NIH3T3. Néanmoins, les sous-unités α des protéines G_{13} , et dans une moindre mesure G_q et G_{12} , sont capables de réguler l'activité des facteurs de transcription Gli, suggérant ainsi un mécanisme de régulation indépendant de Smo (Douglas *et al.*, 2011). Le couplage artificiel du récepteur Smo et de la sous-unité $G_{\alpha_{15}}$ s'est par ailleurs révélé être un très bon outil pour le criblage de petites molécules agonistes ou agonistes inverses de Smo (Masdeu *et al.*, 2006). Chez la drosophile, la recherche d'un couplage de Smo aux protéines G est longtemps restée infructueuse (Lum *et al.*, 2003a). Cependant, récemment et grâce à l'utilisation de dsRNAi sur des cultures de cellules de drosophile, le couplage d'une G_{α_i} a pu être montré comme indispensable à l'activation de la signalisation Hh chez les invertébrés

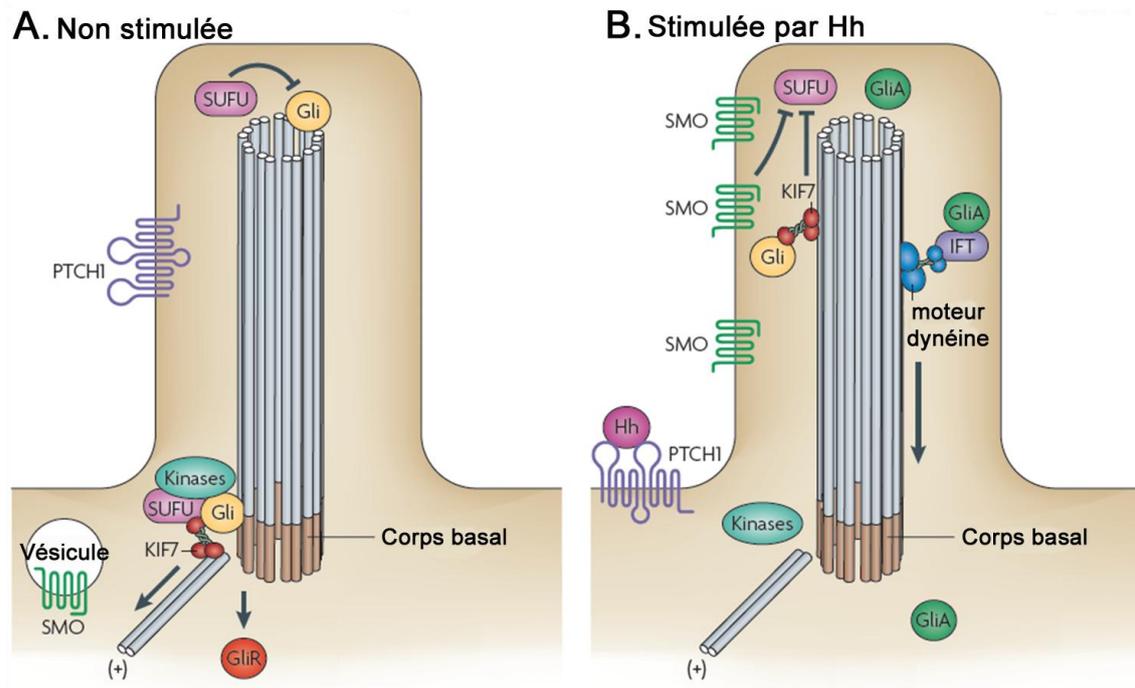


Figure 5 : Localisation subcellulaire des complexes protéiques impliqués dans la signalisation Hedgehog dans le cil primaire.

(A) En l'absence de ligand, Ptc est exprimé dans le cil et empêche l'entrée de Smo dans l'organelle. La kinésine Kif7 se situe à la base du cil, où elle forme un complexe avec les protéines Gli et d'autres composantes de la voie. Kif7 empêche l'accumulation des facteurs Gli dans le cil et favorise leur maturation en GliR. (B) Après activation de la voie, Smo et Kif7 sont transloqués dans le cil favorisant l'accumulation de Gli2 à l'extrémité du cil où Kif7 est capable de bloquer la fonction de Sufu. Les formes activées de Gli (GliA) sont transportées à l'extérieur du cil par un moteur dynéine à l'aide des particules IFT. D'après (*Goetz and Anderson, 2010*).

(Ogden *et al.*, 2008). De plus, *in vivo*, une forme de G α i constitutivement active est capable d'induire de manière ectopique l'activation de la signalisation Hh (Ogden *et al.*, 2008). A l'inverse, chez les vertébrés, l'existence du couplage de Smo à une protéine G reste encore discutable *in vivo*. En effet, bien que l'injection de PTX dans des embryons de poissons-zèbre reproduise un phénotype similaire à l'HPE observée chez des animaux Shh^{-/-} (Hammerschmidt and McMahon, 1998), le résultat reste difficile à interpréter. De plus, l'expression de formes constitutivement actives des protéines G α i₂ et G α i₃ potentialise la prolifération des précurseurs granulaires induite par Shh dans le cervelet de raton (Barzi *et al.*, 2011). A l'inverse, la surexpression d'une protéine G α i ne modifie pas la spécification des cellules induite par la signalisation Hh dans le tube neural de poulet (Low *et al.*, 2008). Les résultats discordants observés dans ces deux études pourraient être liés à la nature de la mutation utilisée (G α iQ205L ou G α iQ204R), puisque le premier mutant n'est pas une forme constitutivement active du récepteur mais seulement une forme permettant de prolonger la période durant laquelle la sous-unité G α i est active. L'ensemble des données concernant le couplage de Smo à une protéine G reste donc ambigu chez les vertébrés.

Les seconds messagers sont de petites molécules intracellulaires produites par des enzymes en réponse à la stimulation du récepteur et qui sont ensuite rapidement dégradées afin d'assurer une réponse de courte durée. La modulation de seconds messagers a été proposée suite à l'activation de Smo. La diminution des taux intracellulaires d'AMPc a été suggérée après recrutement de la protéine G α i par le récepteur Smo de drosophile *in vitro* (Ohlmeyer and Kalderon, 1998) et *in vivo* (Ogden *et al.*, 2008). Chez les vertébrés, des modèles cellulaires variés ont permis de montrer un couplage potentiel de Smo à la protéine G α i avec diminution de production d'AMPc dans des mélanophores de Xénopes (DeCamp *et al.*, 2000). Par ailleurs, G α i est indispensable à Shh pour induire la migration des lignées de fibroblastes en stimulant les petites GTPases Rho, Rac1 et RhoA, via Smo, et par un mécanisme PI3K-dépendant (PI3K pour Phosphoinositide 3 kinase; (Polizio *et al.*, 2011).

D'autres modèles cellulaires ne démontrent pas le couplage effectif à une protéine G hétérotrimérique, mais rapportent des réponses dont l'apparition dans le temps n'est pas compatible avec une activation transcriptionnelle via les facteurs Gli. Ainsi, Shh induit le réarrangement du cytosquelette et la migration des cellules C3H10T1/2 via le métabolisme de l'acide arachidonique (Bijlsma *et al.*, 2006) et stimule l'activité des membres de la famille des Src kinases via Smo pour transmettre ses effets sur le guidage des axones commissuraux

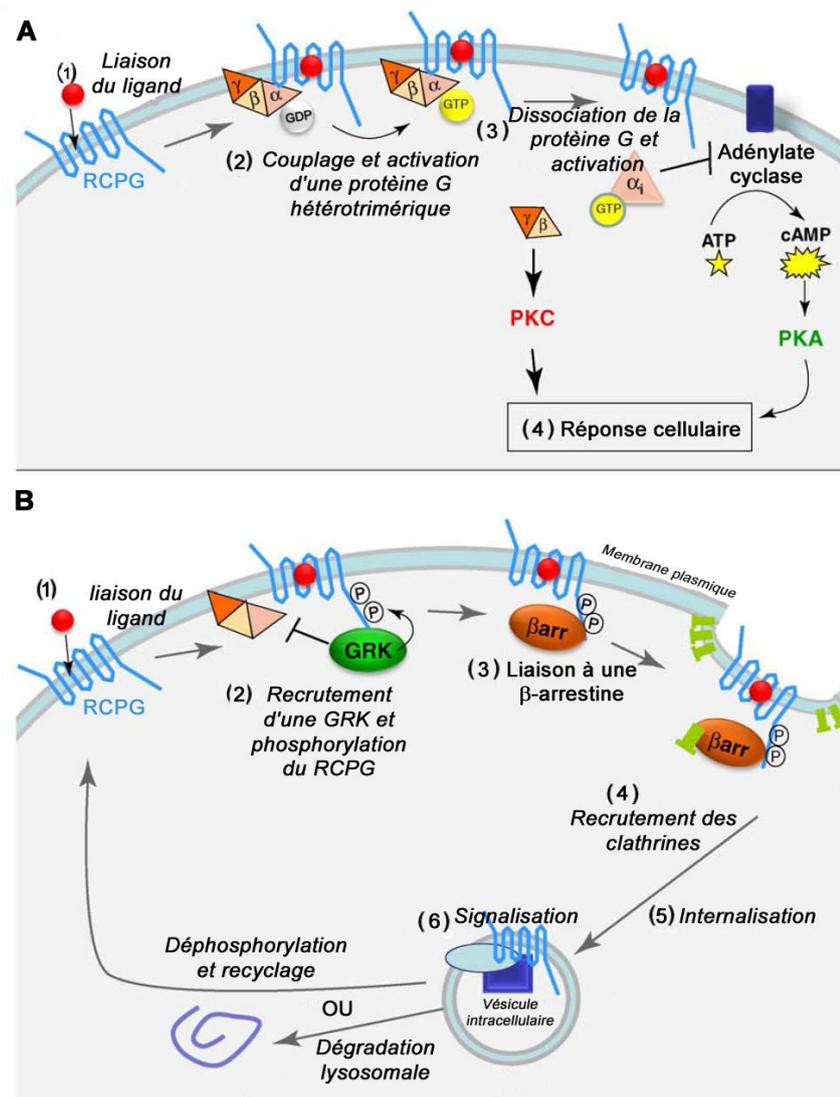


Figure 6 : Signalisation d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG).

(A) Suite à l'activation du récepteur par la liaison d'un ligand (1), le RCPG recrute et active une protéine G hétérotrimérique en catalysant l'échange GDP/GTP au niveau de sa sous-unité α (2). Ceci conduit ensuite à la dissociation de la protéine G (3). Dans le cas de la famille des G_i , la sous-unité $G_{\alpha i}$ réprimera ensuite l'enzyme adénylate cyclase et donc la formation d'AMPc, conduisant à la répression de l'activité enzymatique de la PKA. Les autres sous-unités peuvent également réguler des cascades de signalisations secondaires, comme celle conduisant à l'activation de la PKC qui comme la PKA, régule diverses réponses cellulaires (4). (B) La liaison d'un ligand sur un RCPG et son activation peut également déclencher une voie séparée. Lorsqu'un haut niveau d'activation du récepteur est atteint (1), il se lie à une kinase GRK qui le phosphoryle (2). Ces phosphorylations favorisent la liaison du récepteur à une β -arrestine (β -arr ; 3). Les protéines β -arrestines permettent le recrutement de clathrines (4) qui favoriseront l'internalisation du RCPG (5). Cette internalisation régule alors la signalisation par d'autres voies, ou est à l'origine de la déphosphorylation du récepteur et de son recyclage à la membrane. Enfin, l'internalisation du récepteur peut conduire à l'adressage du RCPG au lysosome où il sera dégradé (6). D'après (Ayers and Therond, 2010).

(*Yam et al., 2009*). Enfin, la stimulation du système PI3K-Akt indispensable à la transmission des effets de Shh sur la spécification/différenciation des cellules dans des explants de tube neural de poulet ou dans des lignées eucaryotes serait associée à la libération des sous-unités $G\beta\gamma$ de la protéine Gi après son couplage à Smo (*Riobo et al., 2006a*); pour revues, (*Ayers and Therond, 2010; Riobo and Manning, 2007*).

L'ensemble de ces données démontre qu'à l'heure actuelle, certaines étapes du mécanisme d'action de la voie de signalisation Hh demeurent obscures (comment l'activité de Smo est réprimée ? Quels sont les événements permettant la relocalisation de Smo au cil primaire ?...). Ce constat renforce l'idée qu'il est important de développer de nouveaux outils pharmacologiques visant en particulier le récepteur Smo étant donné son rôle majeur dans la signalisation. Ceci permettra de mieux appréhender cette voie de transduction et les multiples effets qu'elle contrôle.

II. Physiologie et physiopathologie

Les morphogènes Hh contrôlent de multiples processus développementaux visant l'ensemble des tissus de l'organisme. L'expression de Shh est la plus vaste puisqu'elle est détectée non seulement dans la plupart des tissus périphériques, mais aussi dans le système nerveux central (SNC) en développement et chez l'adulte. A l'inverse, Dhh est exprimé de façon beaucoup plus restreinte dans les gonades ainsi que dans le système nerveux périphérique (SNP). Enfin, Ihh est détecté au niveau intestinal et osseux ; pour revue, (*Varjosalo and Taipale, 2008*). Loin de prétendre à une revue exhaustive de l'ensemble des rôles physiologiques de la voie au cours du développement, je vais ici décrire les principales activités associées à cette signalisation non seulement chez l'embryon, mais aussi dans les tissus adultes vertébrés afin de mieux définir les applications thérapeutiques potentielles de la modulation pharmacologique de l'activité du récepteur Smo.

1. Signalisation Hh au cours du développement et chez l'adulte

1.1. Signalisation Hh et développement du système nerveux

1.1.1. Shh spécifie différents types cellulaires neuraux

La signalisation Shh est indispensable à la mise en place du SNC et son absence chez l'embryon se traduit par un phénotype proche de l'HPE. Exprimé dans la notochorde et la plaque du plancher dès les stades les plus précoces de l'embryogenèse, Shh transmet ses activités selon un gradient de concentration à partir de la région la plus ventrale du tube neural ; pour revues, (*Dessaud et al., 2008; Lupo et al., 2006*). La propagation du signal Shh dans le tube neural résulte non seulement de l'interaction entre le ligand Shh et les différentes protéines TM ou extracellulaires impliquées dans la réception du signal, en particulier, les récepteurs Ptc et Hhip qui modulent l'activité et l'ampleur du signal (*Jeong and McMahon, 2005*), mais aussi de la durée d'exposition des cellules à la concentration de Shh qu'elles perçoivent (*Dessaud et al., 2010; Dessaud et al., 2007*). Le gradient de concentration de Shh a été visualisé grâce à une lignée de souris transgéniques exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le promoteur de Shh. Shh s'est révélé étroitement associé au corps basal du cil primaire (*Chamberlain et al., 2008*).

Grâce à la régulation de l'expression des facteurs de transcription Gli2 et Gli3, différents domaines de progéniteurs neuraux (à l'origine de différentes populations

d'interneurones ventraux et de motoneurones) sont générés le long de l'axe dorso-ventral du tube neural. L'identité et la position de chacun de ces domaines sont définies par l'induction ou la répression d'un ensemble de facteurs de transcription appartenant soit aux protéines à homéodomaines, soit aux protéines de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix ; **Figure 7**); pour revue, (*Dessaud et al., 2008*). Le développement normal du tube neural requiert l'activité ventrale de Shh coordonnée aux activités dorsales d'autres protéines sécrétées appartenant aux familles Wnt et Bone Morphogenetic Protein (BMP). Ainsi, l'expression de Gli3 dans le tube neural dorsal dépend de l'activité de la signalisation Wnt qui contrôle donc l'activité de Shh dans la partie ventrale du tube neural (*Alvarez-Medina et al., 2008*).

Dans le tube neural et le télencéphale, la voie de signalisation Shh est également impliquée dans la spécification des oligodendrocytes, les cellules gliales responsables de la myélinisation des axones ; pour revue, (*Fuccillo et al., 2006*). Après la génération des neurones, au stade embryonnaire E12.5 chez la souris, les précurseurs oligodendrocytaires (OPC pour oligodendrocyte precursor cell) sont générés dans le domaine pMN (progéniteur des motoneurones) du tube neural et l'aire entopédonculaire du télencéphale ventral ; pour revue, (*Fuccillo et al., 2006*). L'induction par Shh des gènes *Olig1* et *Olig2* codant pour des protéines bHLH est l'étape clef de la spécification oligodendrocytaire (*Lu et al., 2000; Zhou et al., 2000*). En accord avec ces données, des lignées de souris permettant l'inactivation conditionnelle de Smo dans les précurseurs neuroépithéliaux exprimant la nestine au stade embryonnaire E12.5 présentent un phénotype caractéristique, notamment une réduction du nombre d'OPC dans la partie ventrale du télencéphale accompagnée d'une réduction du niveau de myélinisation cérébrale (*Machold et al., 2003*).

Bien que l'influence de la signalisation Shh sur le lignage astrocytaire ait été beaucoup moins étudiée, plusieurs travaux ont rapporté le rôle de Shh produit par les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC pour retinal ganglion cell), dans la spécification du lignage astrocytaire du disque optique (*Dakubo et al., 2008; Wallace and Raff, 1999*). De plus, Shh induit la différenciation des cellules de la glie de Bergmann, une population d'astrocytes spécialisés dans la couche des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (*Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999*).

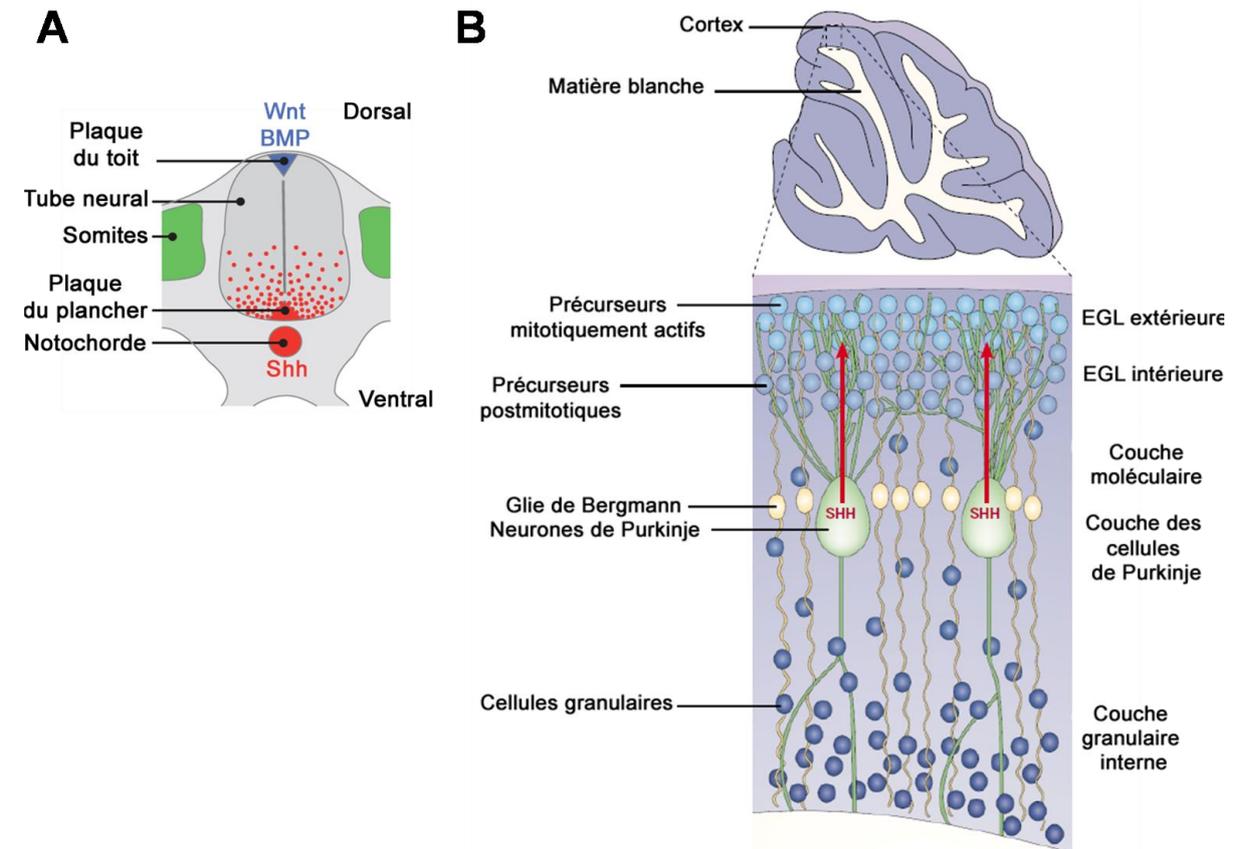


Figure 7 : La voie Hedgehog contrôle la différenciation des précurseurs neuraux du tube neural et la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet.

(A) Schéma d'une coupe transversale d'embryon de vertébrés. Dans la moelle épinière, des neurones fonctionnellement distincts sont générés d'une manière spatialement ségréguée en réponse aux signaux émanant du tube neural. Les signaux clés sont Sonic Hedgehog (Shh) (en rouge) sécrété par la notochorde et la plaque du plancher, et les membres des familles Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Wnt (en bleu) produits dorsalement. La propagation de Shh permet l'établissement d'un gradient d'activité ventro-dorsal (points rouges). D'après (*Dessaud et al., 2008*). (B) Représentation schématique d'un cervelet de souris au cours de la première semaine post-natale montrant la position des cellules dans le cortex cérébelleux (région agrandie). Seuls les neurones granulaires, leurs précurseurs, les neurones de Purkinje et la glie de Bergmann sont représentés. Shh est sécrété par les cellules de Purkinje (flèches rouges) et favorise la prolifération des précurseurs des cellules granulaires. EGL : external granule cell layer pour couche externe granulaire. D'après (*Ruiz i Altaba et al., 2002*).

1.1.2. Shh est un facteur mitogène

Au cours du développement, Shh est en particulier impliqué dans les processus de prolifération des précurseurs des cellules granulaires (GCP pour granule cell precursors) du cervelet (pour revues, (*Butts et al., 2011; Hatten and Roussel, 2011*) et des progéniteurs du néocortex (*Dahmane et al., 2001; Komada et al., 2008*).

Dans le cervelet, la génération des cellules granulaires du cortex cérébelleux est un processus post-natal qui, chez la souris, se situe au cours des 3 premières semaines après la naissance (**Figure 7**). Les GCP sont localisés à P0 (stade post-natal 0) dans la couche granulaire externe (EGL pour external granule cell layer) et vont proliférer sous l'action de Shh. Aisément détectable dans les cellules de Purkinje au-delà de la première semaine post-natale (*Traiffort et al., 1999*), Shh a également été détecté dès le stade embryonnaire E17 dans ces mêmes cellules (*Corrales et al., 2004*). A partir des cellules de Purkinje, la protéine signalerait dans l'EGL et dans les cellules de la glie de Bergmann avoisinantes en accord avec l'expression de Ptc, Smo et des facteurs de transcription Gli1-3 détectée dans ces couches cellulaires (*Corrales et al., 2004; Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Traiffort et al., 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999*). Une autre source de la protéine Shh a été proposée chez la souris. En effet, Shh pourrait être transporté dans le cervelet via le liquide céphalorachidien dès les stades embryonnaires les plus précoces (avant la mise en place des cellules de Purkinje) et constituerait un signal prolifératif majeur pour l'une des zones germinales primitives du cervelet, la zone ventriculaire (*Huang et al., 2010*). Les GCP situés dans l'EGL prolifèrent intensément sous l'influence de Shh, puis quittent le cycle cellulaire et migrent à travers la couche moléculaire le long des prolongements de la glie de Bergmann jusqu'à leur destination finale, la couche granulaire interne ; pour revues, (*Sotelo, 2004*). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de la prolifération induite par la voie Shh mettent en jeu les régulateurs du cycle cellulaire tels que CyclinD1, N-myc, E2f1 et E2f2 qui sont régulés par la signalisation Shh dans les GCP chez la souris (*Kenney et al., 2003; Kenney and Rowitch, 2000; Oliver et al., 2003*) ; **Figure 7**). De plus, des actions synergiques de la voie Shh et de la voie PI3K concourent à l'activation de N-myc (*Kenney et al., 2004*). Le facteur de transcription ici mis en jeu par la signalisation Hh est Gli2 comme le montre la réduction du nombre de GCP chez les souris Gli2^{-/-} (*Corrales et al., 2004*). Par ailleurs, ce processus de prolifération nécessite l'intégrité du cil primaire comme l'indique le modèle d'invalidation du gène Kif3a (*Spassky et al., 2008*). La réponse proliférative est facilitée par l'expression du

facteur de transcription Atoh1 dans les GCP (*Flora et al., 2009; Zhao et al., 2008b*) et le niveau de la signalisation Shh est aussi intimement lié au niveau de foliation du cervelet (*Corrales et al., 2006; Corrales et al., 2004*). Enfin, le régulateur négatif Sufu interviendrait également dans ce processus morphogénétique en régulant l'activité du répresseur Gli3 (*Kim et al., 2011*). Malgré la persistance du mitogène Shh, les GCP sortiraient du cycle cellulaire grâce à l'initiation d'une cascade de signalisation induite par la vitronectine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, qui diminue la réponse des GCP au signal Shh prolifératif et oriente les précurseurs vers la différenciation neuronale (*Pons et al., 2001*).

Shh est également un agent mitogène dans le néocortex. A partir du stade E10.5, les cellules neuroépithéliales donnent naissance aux cellules radiales gliales qui constitueront la population prédominante de progéniteurs du néocortex. Shh est exprimé dans les zones prolifératives et les neurones post-mitotiques du néocortex murin aux stades E13.5 à E15.5 et des études perte de fonction de Shh et Smo démontrent que la voie Hh régule le cycle cellulaire des progéniteurs neuraux du néocortex (*Komada et al., 2008*). Des études *in vitro* indiquent que la signalisation Hh a un rôle mitogène sur ces progéniteurs en mettant en jeu les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 (*Dahmane et al., 2001*). Aux stades périnataux, Shh est toujours exprimé dans le néocortex et Gli1 est détectable dans la zone ventriculaire néocorticale. Au stade P3, Shh induit encore la prolifération des précurseurs exprimant la nestine dans des explants de néocortex murins (*Dahmane et al., 2001*).

1.1.3. Shh participe au guidage axonal

Shh participe au guidage axonal qui permet aux axones en cours d'élongation de se diriger jusqu'à leur cible synaptique. Cette activité a été mise en évidence dans deux régions, la moelle épinière et la rétine. Dans les deux cas, le récepteur Smo paraît être mis en jeu. Ainsi, dans la moelle épinière en développement, l'invalidation spécifique de Smo dans les neurones commissuraux dorsaux chez la souris perturbe la trajectoire des axones en direction de la partie ventrale du tube neural. De plus, un phénotype similaire a été retrouvé chez les souris *Boc^{-/-}*, permettant de proposer Smo et Boc comme des médiateurs potentiels de cette activité chémoattractive de Shh (*Okada et al., 2006*). Plus récemment, Yam et collaborateurs ont montré *in vitro* et *in vivo* que cette activité de Shh ne met pas en jeu les facteurs de transcription Gli, mais une voie de signalisation dite non-canonique dépendant de la famille

des Src kinases (Yam *et al.*, 2009). Par ailleurs, Shh pourrait induire l'activité chémorepulsive des sémaphorines sur les axones commissuraux, en réduisant les taux d'AMPC intracellulaires de façon Smo-dépendante (Parra and Zou, 2010).

Dans le système visuel, les axones des RGC répondent à la signalisation Shh à deux niveaux le long de leur trajectoire : dans la rétine elle-même et au niveau du chiasma optique où se croisent les deux nerfs optiques. La trajectoire des axones va être influencée par deux sources de Shh : les RGC et les cellules de la ligne médiane bordant le chiasma antérieurement et postérieurement. La surexpression de Shh ou l'inhibition de la signalisation Hh par la cycloamine (un antagoniste de Smo), *in vivo* dans la rétine de poulet, aboutit à des anomalies sévères des projections axonales des RGC révélant un effet positif de Shh sur la croissance axonale via le récepteur Smo (Kolpak *et al.*, 2005). A l'inverse, Shh régule négativement la croissance des fibres visuelles au moment de leur croisement dans le chiasma optique. Cet effet passe par une diminution des taux d'AMPC intracellulaires peut-être reliée à l'activité de Smo, mais l'hypothèse reste à être vérifiée (Trousse *et al.*, 2001). Ces réponses feraient intervenir le complexe Ptc-Smo, mais leur rapidité d'apparition suggère là encore un mécanisme intracellulaire non transcriptionnel.

1.1.4 Dhh participe au maintien des nerfs périphériques

Dans le SNP, ce sont les cellules de Schwann, dérivées de la crête neurale qui sont responsables de la myélinisation des nerfs périphériques. Dhh est exprimé dans les cellules de Schwann à partir de P10. Son récepteur, Ptc, est quant à lui, exprimé par les cellules de l'épithélium périneurial. Il s'agit des cellules qui forment une barrière autour du nerf et empêchent son infiltration, préservant ainsi son intégrité. Le récepteur Smo est exprimé du stade E13.5 jusqu'à l'âge adulte dans les nerfs périphériques. L'analyse en PCR semi-quantitative révèle que le niveau d'expression de Smo varie peu contrairement à celui de Ptc qui augmente entre E15.5 et la naissance, puis devient négligeable à l'âge adulte. Aux stades embryonnaires, les animaux Dhh^{-/-} présentent une gaine périneuriale plus fine que celle des animaux sauvages, désorganisée avec apparition d'infiltrations cellulaires dans le nerf (Parmantier *et al.*, 1999). Aux stades post-nataux et adultes, le signal Dhh contrôle l'intégrité du SNP. Ainsi, Dhh joue un rôle important non seulement dans la formation mais aussi dans le maintien des gaines de protections des nerfs périphériques (Sharghi-Namini *et al.*, 2006).

1.2. Signalisation Hh et développement des tissus périphériques

La signalisation Hh est fondamentale pour le développement de nombreux tissus et en particulier pour la morphogenèse des appendices épithéliaux : les épithéliums externes (peau, follicule pileux), la cavité buccale (langue, dents) et les épithéliums internes (intestins, pancréas, rein, poumon, estomac, gonades). L'ensemble de ces données est regroupé dans le **Tableau 1**. Le rôle de la signalisation Hh dans le maintien des cellules souches qui persistent dans la majorité des tissus adultes et participent à la maintenance et à la réparation de ces tissus, a très rapidement permis de suggérer que cette signalisation est à l'origine du développement de nombreuses tumeurs périphériques lorsque la voie se trouve anormalement activée ; pour revue, (*Beachy et al., 2004*).

Je ne détaillerai dans ce paragraphe que le rôle de la signalisation Shh dans le développement de la peau en raison de son lien étroit avec les tumeurs dérivées du follicule pileux que sont les BCC, les tumeurs de la peau les plus fréquemment retrouvées en clinique.

Dans la peau, Shh régule la croissance et la morphogenèse du follicule pileux. En effet, parmi les gènes les plus précocement exprimés dans les placodes (précurseurs des poils matures), Shh joue un rôle crucial dans l'organisation des cellules dermales. Sous l'influence de Shh, ces cellules se différencient en une papille dermale qui par la suite sera associée au follicule pileux ; pour revue, (*Oro and Higgins, 2003*). Les souris *Shh^{-/-}* développent des placodes au stade embryonnaire, mais leur progression est ensuite avortée. Les animaux présentent une pilosité anormalement espacée (*Chiang et al., 1999*). De plus, l'utilisation d'un antagoniste de Smo, la cyclopamine, ainsi que celle de l'anticorps bloquant dirigé contre Shh (5E1) a permis de montrer que la signalisation était normalement requise tout au long du cycle de développement du poil. Des cellules souches contenues dans le renflement du follicule pileux pourraient recevoir des signaux Hh provenant des nerfs sensoriels environnants. Ces cellules souches gagneraient l'épiderme où elles donneraient naissance aux cellules souches épidermales interfolliculaires (*Brownell et al., 2011*). Le rôle du cil primaire dans l'homéostasie de la peau et des follicules pileux a également été mis en évidence. En effet, l'abolition du cil primaire sur les cellules épidermales n'engendre pas de défaut de morphogenèse du poil au cours du développement, mais avec l'âge, une hyperplasie basaloïde apparaît et si l'activité de la signalisation Wnt n'est pas modifiée, celle de la signalisation Shh est réduite chez les animaux mutants (*Croyle et al., 2011*) ; **Figure 8**).

1.3. Rôle de la voie Shh dans le cerveau adulte

1.3.1. Expression des composantes de la voie Hh dans le SNC

Dès 1998, l'identification par notre équipe de cellules exprimant les ARNm de Shh ou ceux des protéines membranaires Ptc, Smo et Hhip dans de nombreuses structures cérébrales chez le rongeur adulte a permis de proposer l'existence de rôles jusqu'alors inconnus pour la signalisation Shh dans le SNC adulte (Traiffort *et al.*, 1998); pour revue, (Traiffort *et al.*, 2010). Contrairement aux orthologues Ihh et Dhh, Shh est fortement exprimé dans le cerveau adulte et la moelle épinière. Les cartes d'expression de Shh, Ptc, Smo et Hhip ont été établies à l'aide de sondes non radiomarquées (Traiffort *et al.*, 1999), puis confirmées par des sondes radiomarquées (Banerjee *et al.*, 2005). Ces études ont montré la coexpression des 3 transcrits Shh, Ptc et Smo dans plusieurs aires cérébrales telles que le cortex cérébelleux, le gyrus denté de l'hippocampe et l'hypothalamus. La présence de ces 3 composantes essentielles de la voie suggérait fortement que la signalisation y est active. Corrales et collaborateurs confirmèrent cette hypothèse en montrant dans le cortex cérébelleux l'expression des facteurs de transcription Gli1-3 (Corrales *et al.*, 2004). Dans la majorité des autres aires cérébrales, on ne retrouve pas la coexpression des 3 composantes majeures. La plupart des cellules Ptc⁺ sont détectées dans des aires dépourvues de transcrits Shh, mais correspondant aux aires de projections des régions exprimant le ligand. C'est le cas des noyaux médian et basomédian de l'amygdale et de ceux du tractus solitaire. Dans d'autres aires cérébrales telles que le noyau facial et le septum médian, le ligand Shh est coexprimé avec le récepteur Ptc, mais le récepteur Smo est absent suggérant l'existence d'une signalisation impliquant Shh et Ptc, mais indépendante de Smo. Dans les organes circumventriculaires et dans le noyau thalamique réticulaire, Smo est exprimé seul suggérant également qu'il pourrait transmettre une signalisation indépendamment de Shh et Ptc. Enfin, le régulateur négatif physiologique de la voie, Hhip, est également exprimé dans des aires de projections des cellules Shh⁺, mais dans des territoires différents de ceux de Ptc suggérant que les activités de ces deux récepteurs ne sont pas redondantes (Coulombe *et al.*, 2004).

L'étude subcellulaire de la localisation des composantes de la voie Hh a d'abord montré que le ligand Shh est associé à des microdomaines de la membrane cellulaire enrichis en sphingolipides et cholestérol, appelés « rafts » (Traiffort *et al.*, 2001). Shh a également été mis en évidence dans les axones des RGC où la protéine est transportée par voie antérograde jusqu'aux collicules supérieurs (Traiffort *et al.*, 2001). Plus récemment, Shh a été colocalisé

Tissus	Morphogènes impliqués	Cellules Hh*	Tissus récepteurs	Rôle de la voie Hh	Phénotype observé chez les mutants Shh, Ihh ou Dhh
SNC et tête	Shh	Primordia fronto-nasaux et mâchoires	Crâne et mâchoire, SNC	Morphogenèse faciale	Cyclopie, proboscis
Gonades	Dhh	Précurseurs de cellules de Sertoli	Cellules de Leydig, mésoenchyme épидидymal	Contrôle du développement testiculaire	Réduction des organes sexuels, infertilité, féminisation
Intestin	Shh, Ihh	Endoderme intestinal	Endoderme intestinal	Croissance des villosités intestinales et duodénales	Réduction du tractus gastro-intestinal
Pancreas	Shh	L'absence de l'expression de la signalisation Hh dans les tissus émergents de l'endoderme intestinal est à l'origine du développement du pancréas			Taille du pancréas et nombre de cellules endocrines augmenté
Poumon	Shh	Epithélium pulmonaire, ramifications	Mésoenchyme pulmonaire	Développement des ramifications et du mésoenchyme	Réduction de l'arbre pulmonaire
Glande mammaire	Dhh, Ihh, Shh	Epithélium glandulaire	Epithélium, canaux	Développement et branchement canalaire	Hypoplasie et dysplasie canalaire
Membres	Shh, Ihh	ZPA	ZPA	Formation de l'axe A/P et croissance des bourgeons de membres	Doigt unique sur membre raccourci
Os	Shh, Ihh	Chondrocytes	Chondrocytes	Induction, prolifération et survie du sclérotome, prolifération et différenciation du squelette endochordal	Hypoplasie osseuse, ostéoarthrite

Tableau 1 : Rôles majeurs de la signalisation Hedgehog dans le développement des tissus périphériques.

ZPA : zone d'activité polarisante ; A/P : antéro-postérieur, SNC : Système nerveux central. Adapté de la revue : (McMahon *et al.*, 2003).

avec des marqueurs de vésicules synaptiques dans les axones des RGC et des neurones hippocampiques en culture. La protéine est détectée à la fois dans le soma, les dendrites, les axones et les terminaisons neuritiques des RGC. De plus, la sécrétion de Shh peut être induite dans des conditions de dépolarisation neuronale suggérant un lien entre l'activité neuronale et la libération de Shh (*Beug et al., 2011*). Le récepteur Smo, quant à lui, a été tout d'abord identifié par microscopie électronique dans les fibres moussues des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe en association avec les vésicules synaptiques (*Masdeu et al., 2007*). Une étude récente visualise Smo dans les dendrites et les épines dendritiques de ces mêmes cellules, alors que Ptc serait majoritairement localisé dans les épines dendritiques. De plus, les protéines Ptc et Smo sont identifiées au niveau du cil primaire dans des cultures de neurones post-mitotiques et au niveau des plexus choroïdes (*Petralia et al., 2011*).

L'utilisation de multiples approches génétiques a permis de montrer que plusieurs populations d'astrocytes du cerveau de rongeur adulte répondent à la protéine Shh sécrétée par les neurones, suggérant un rôle de la signalisation Shh dans la communication neurone/astrocyte. Ainsi, la délétion conditionnelle de Smo dans les astrocytes exprimant la protéine fibrillaire acide de la glie (GFAP pour Glial Fibrillary Acidic Protein) induit une augmentation de l'expression de ce marqueur et du volume de ces cellules reflétant l'apparition d'une astrogliose réactive qui indique un rôle de la signalisation Shh dans la régulation de certaines populations astrocytaires (*Garcia et al., 2010*).

1.3.2. *Hh et la régulation de l'activité électrique des neurones matures*

L'expression de Shh dans de nombreuses aires cérébrales a rapidement laissé penser que la protéine pouvait être impliquée dans des activités différentes de celles classiquement associées à un facteur de croissance. L'une d'entre elles a été mise en évidence dans le noyau ventral du tractus solitaire (vNTS) où Shh possède une activité neuromodulatrice (*Pascual et al., 2005*). Le ligand est exprimé dans le noyau moteur dorsal du vague et les transcrits de Ptc sont retrouvés dans les neurones post-synaptiques du vNTS (*Traiffort et al., 1999*). Des expériences réalisées sur des tranches de tissu cérébral ont montré que, des concentrations subnanomolaires de Shh sont capables en quelques minutes d'inhiber l'activité des neurones du vNTS, puis de déclencher une activité électrique en bouffées, des effets bloqués par l'anticorps monoclonal 5E1 dirigé contre la protéine Shh (*Pascual et al., 2005*). Ces résultats suggèrent que ShhN peut induire la réapparition des activités électriques caractéristiques des

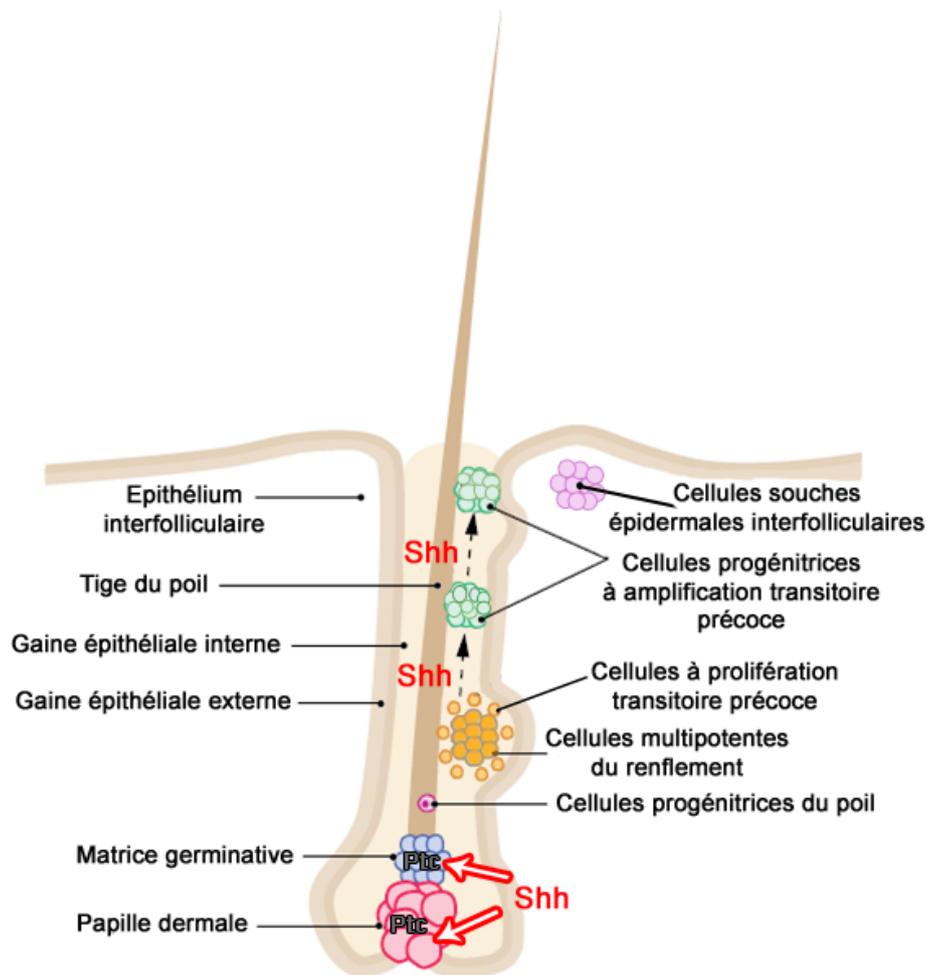


Figure 8 : Signalisation Sonic Hedgehog et cellules souches dans le follicule pileux.

Les cellules de la papille dermale (rose) et de la matrice germinative (bleu) répondent à la voie Sonic Hedgehog (Shh) durant la phase anagène du cycle de formation du poil. La signalisation Shh permet la prolifération des kératinocytes de la matrice et favorise la croissance du follicule pileux par son action sur la papille dermale. Par ailleurs, elle stimule les cellules multipotentes (orange) présentes dans le renflement et favorise la production de cellules progénitrices à amplification transitoire (vert), précurseurs des cellules souches de l'épithélium interfolliculaire (violet). Le récepteur Patched (Ptc) a été mis en évidence sur les cellules de la papille dermale mais aussi sur les cellules de la matrice germinative qui répondent ainsi à la signalisation Shh. Adapté de (*Harris et al., 2010*).

neurones immatures du vNTS et pourrait ainsi être impliqué dans les processus d'acclimatation à l'hypoxie (*Pascual et al., 2005*).

Des résultats comparables avaient précédemment été rapportés dans le noyau subthalamique (*Bezard et al., 2003*), qui comme le vNTS exprime les transcrits de Ptc (*Traiffort et al., 1999*), mais pas ceux de Smo. Ces réponses électrophysiologiques apparaissant dans un délai très court (quelques minutes) après l'application de ShhN, elles ne sont pas reliées au mécanisme transcriptionnel classiquement initié par Ptc et semblent donc ne pas faire appel à la signalisation Hh classique mettant en jeu le récepteur Smo.

1.3.3. Signalisation Shh et régulation des progéniteurs neuraux adultes

1.3.3.1. Shh et la régulation de la prolifération des progéniteurs oligodendrocytaires

Notre équipe a montré que Shh induit la prolifération des OPC dans le cortex cérébral et le corps calleux chez la souris adulte (*Loulier et al., 2006*). En effet, l'injection stéréotaxique intracérébroventriculaire de la protéine recombinante ShhN ou d'un vecteur adénoviral permettant le transfert intracérébral de Shh induit non seulement une augmentation de la transcription de Ptc dans les cellules du lignage oligodendrocytaire exprimant le marqueur Olig1, mais aussi la prolifération des OPC exprimant le protéoglycane NG2 ou le marqueur des oligodendrocytes pré-myélinisants DM20 (*Loulier et al., 2006*). Ces résultats suggèrent donc un rôle de la signalisation Shh dans le maintien du lignage oligodendrocytaire et l'intérêt de moduler la voie Shh dans le cadre de pathologies associées à une démyélinisation telle que la sclérose en plaques.

1.3.3.2. Shh et la zone sous-ventriculaire

La zone sous-ventriculaire (ZSV) qui borde les ventricules latéraux est l'une des deux principales aires de neurogenèse générant de nouveaux neurones tout au long de la vie. Elle est constituée de 3 types cellulaires : les cellules souches de nature astrogliales (cellules de type B) donnant naissance aux cellules transitoires à amplification rapide (cellules de type C) qui sont les progéniteurs des neuroblastes (cellules de type A). Ces derniers migrent le long du trajet de migration rostrale (TMR) pour atteindre finalement le bulbe olfactif (BO) où ils s'intègrent au réseau neuronal local et se différencient en interneurones GABAergiques (pour

revue, (Zhao et al., 2008a) et, comme plus récemment montré, en neurones glutamatergiques (Brill et al., 2009); **Figure 9**).

Dans la ZSV en période post-natale précoce, la majorité des composantes de la voie Hh sont distribuées de manière cellule spécifique. En effet, l'analyse réalisée par RT-PCR sur des ARN issus des 3 types cellulaires révèle que les neuroblastes expriment uniquement Ptc et de faibles niveaux de Gli2, mais pas Shh ni Gli1 ou Gli3. En revanche, les cellules B et C expriment Shh, Gli2, Gli3, Ptc et plus faiblement Gli1 (Palma et al., 2005). Ces profils d'expression sont partiellement conservés chez l'adulte puisque les transcrits Shh, Ptc et Gli3 sont retrouvés dans la ZSV, le TMR et le BO (Papanikolaou et al., 2008). En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant la forme inductible de la recombinaise Cre sous le promoteur Gli1 et la lignée de souris R26R exprimant le rapporteur lacZ sous un promoteur ubiquitaire, Ahn et Joyner ont démontré de façon élégante que les cellules B et C répondent à la signalisation Shh puisqu'elles expriment Gli (Ahn and Joyner, 2005). Plus récemment, notre équipe a mis en évidence l'expression de la β -galactosidase placée sous le contrôle du promoteur Ptc dans les neuroblastes migrants identifiés par l'expression du marqueur PSA-NCAM (polysialylated-neural cell adhesion molecule ; (Angot et al., 2008) et montré par hybridation *in situ* que les transcrits de Ptc et Smo sont exprimés dans le système ZSV-TMR-BO (Angot et al., 2008; Charytoniuk et al., 2002). Enfin, l'expression de la protéine Smo vient d'être montrée sur la majorité des cellules souches présentes dans la ZSV (Ihrle et al., 2011).

Plusieurs études ont permis de caractériser les rôles de la signalisation Hh dans cette aire neurogénique. Chez la souris, l'administration intrapéritonéale de l'antagoniste de Smo, la cyclopamine, pendant 7 jours induit une forte réduction du nombre de cellules en prolifération dans la ZSV suggérant la mise en jeu de Smo dans le processus de prolifération cellulaire (Palma et al., 2005). Cependant, ces résultats n'ont pas été reproduits chez le rat après infusion intracérébroventriculaire de la drogue (Banerjee et al., 2005).

Par ailleurs, l'inactivation conditionnelle de Smo dans les progéniteurs neuraux Nestine⁺ au stade E12.5, puis chez l'adulte montre que la signalisation Hh via Smo est non seulement indispensable à la mise en place de la ZSV (Balordi and Fishell, 2007a), mais aussi au maintien de cette niche neurogénique chez l'adulte (Balordi and Fishell, 2007b). En effet, en l'absence de Smo, la ZSV est incapable de se régénérer après destruction des cellules à

prolifération rapide (type C et A) induite par l'administration d'un antimétabolite. Récemment, notre équipe a montré que Shh possède une activité chémoattractrice sur les neuroblastes migrants *in vitro* et *in vivo*. Shh régule ainsi la sortie des neuroblastes en dehors de la ZSV, contrôlant donc le nombre des neurones générés dans les BO. L'utilisation d'un antagoniste de Smo, le Cur61414, sur des explants de ZSV indique que cette activité chémoattractrice dépend de Smo (Angot *et al.*, 2008). Plus récemment encore, l'implication de la signalisation Shh dans la spécification des précurseurs neuraux nouvellement formés dans la ZSV adulte vient d'être proposée grâce à plusieurs outils génétiques et pharmacologiques (Ihrle *et al.*, 2011). Enfin, il a été rapporté de façon intéressante, que les effets de Shh dans la ZSV reposent sur l'induction de l'un des facteurs de transcription majeurs pour le maintien des précurseurs neuraux, Sox9 (Scott *et al.*, 2010).

1.3.3.3. Shh et la zone sous-granulaire de l'hippocampe

L'organisation de la niche neurogénique de l'hippocampe, la zone sous-granulaire (ZSG), est comparable à celle décrite pour la ZSV (**Figure 9**). Cependant, les neuroblastes nouvellement formés mûrissent et s'intègrent localement dans le réseau neuronal de la couche granulaire du gyrus denté ; pour revue, (Zhao *et al.*, 2008a).

La première démonstration du rôle de Shh dans la régulation des précurseurs neuraux de la ZSG résulte du transfert adénoviral de Shh dans l'hippocampe de rat adulte. Cette surexpression de Shh (Banerjee *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2003), de même que l'administration d'un agoniste de Smo (Machold *et al.*, 2003), augmentent le nombre de cellules en prolifération dans la ZSG. Par ailleurs, l'inactivation conditionnelle de Smo dans les précurseurs neuraux astrogliaux exprimant le marqueur GFAP induit un défaut majeur de la neurogenèse hippocampique avec notamment une atrophie du gyrus denté, une nette réduction de la prolifération cellulaire et la présence de quelques rares neurones nouvellement formés (Han *et al.*, 2008). Ce phénotype est très similaire à celui observé chez des animaux ayant un défaut de ciliogenèse alternativement invalidés pour le gène Kif3a dans les cellules GFAP⁺ (Han *et al.*, 2008) ou présentant une absence d'axonème dans l'hippocampe (Breunig *et al.*, 2008). Récemment, une étude montre que l'ablation du cil primaire dans les cellules GFAP⁺ de l'hippocampe chez des souris adultes engendre des troubles de la mémoire spatiale chez ces animaux suggérant un lien entre certaines atteintes cognitives observées dans les

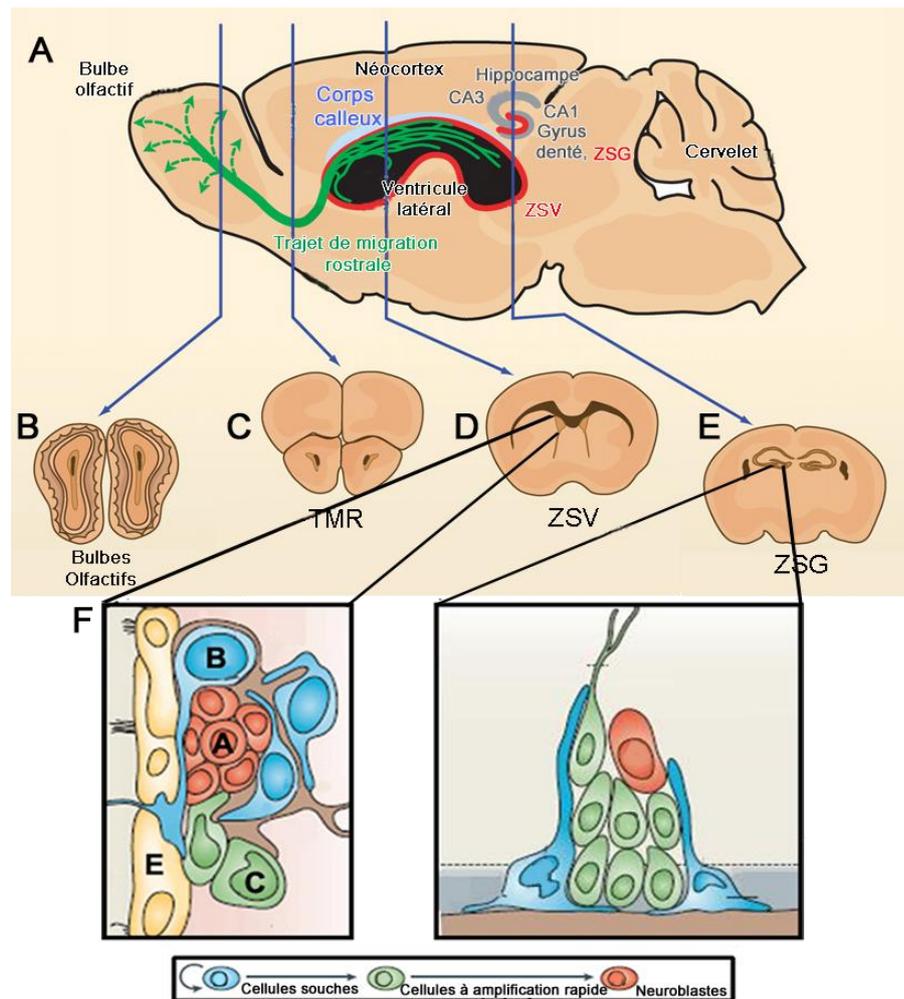


Figure 9 : Aires de neurogenèse dans le cerveau de rongeur adulte.

(A) Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rongeur adulte au niveau des aires de neurogenèse (en rouge) : il s'agit de la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui borde les ventricules latéraux. Les neurones générés dans la ZSV migrent le long du trajet de migration rostrale et s'intègrent dans le bulbe olfactif. Dans le cas de la ZSG, les neuroblastes vont maturer localement dans le gyrus denté et envoyer leur projection axonale dans la couche CA3 de l'hippocampe. (B-E) Vues frontales des aires de neurogenèse. (F) Dans la ZSV, trois types cellulaires coexistent : les cellules souches (cellules B, bleues) qui vont se différencier en cellules à amplification rapide (cellules C, vertes) qui sont les cellules progénitrices des neuroblastes (cellules A, rouges). Les cellules épendymaires (cellules E, jaunes) constituent la paroi des ventricules latéraux. Adapté de (Lledo et al., 2006; Zhao et al., 2008a).

ciliopathies et la ciliogenèse des cellules progénitrices de l'hippocampe adulte (*Amador-Arjona et al., 2011*). Ces observations confirment l'importance du cil primaire pour la signalisation Hh, en particulier dans le contrôle de la neurogenèse adulte.

2. Pathologies

Etant donné l'importance de la signalisation Shh au cours du développement embryonnaire dans l'établissement de nombreux tissus centraux et périphériques, il n'est pas surprenant que des mutations affectant les gènes de la voie soient associées à des malformations congénitales, mais aussi à des processus cancéreux chez l'Homme. La modulation de l'activité de la signalisation Hh a, pour cette raison, très vite été considérée comme une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de ces tumeurs. Je vais discuter ici les connaissances actuelles concernant la signalisation Hh dans le domaine de la cancérogenèse. Dans un deuxième temps, je décrirai brièvement les malformations congénitales liées à cette signalisation ainsi que les potentialités thérapeutiques de la modulation pharmacologique de la voie récemment identifiées dans plusieurs pathologies cérébrales dégénératives et dans les pathologies associées à un dysfonctionnement du cil primaire.

2.1. Cancers

Les activités de prolifération et différenciation cellulaire associées à la voie Shh au cours de l'embryogenèse persistent dans les tissus adultes dans le cadre du contrôle des cellules souches qui se maintiennent dans les tissus et participent aux processus d'homéostasie et de réparation tissulaire ; pour revue, (*Beachy et al., 2004*). Trois catégories de tumeurs associées à la dérégulation de la signalisation Shh ont été proposées : la première est associée à l'existence de mutations sur l'une des composantes de la voie (BCC, MB et RMS); la seconde dépend d'une réactivation aberrante de la voie ; enfin, la dernière met en jeu les cellules souches tumorales qui seraient à l'origine des rechutes observées dans le traitement de certains cancers ; pour revues, (*Barakat et al., 2010; Ng and Curran, 2011; Scales and de Sauvage, 2009*).

2.1.1. Tumeurs liées à des mutations des composantes de la voie Shh

❖ **Carcinome basocellulaire (BCC) :**

C'est une tumeur qui atteint les kératinocytes et constitue le cancer le plus fréquent chez l'Homme. Des métastases associées à cette tumeur ne sont que très rarement retrouvées ; pour revues, (*Epstein, 2008; Teglund and Toftgard, 2010*). Le premier lien établi entre la signalisation Shh et le BCC vient de la découverte que la mutation perte de fonction du gène Ptc est à l'origine d'une pathologie héréditaire, le carcinome basocellulaire névoïde ou syndrome de Gorlin (*Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996*). Si plus de 70 % des BCC sporadiques présentent une mutation dans l'un des 2 allèles de Ptc, les autres cas sont souvent associés à une mutation du gène Smo (*Lam et al., 1999*). Ce syndrome a été découvert par le dentiste R. Gorlin (*Gorlin, 1987*), il y a plus d'un siècle et demi. Cette pathologie est le plus souvent liée à une mutation autosomale dominante du gène Ptc (*Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996*) qui engendre le développement de multiples (de 10 à 1000 selon les cas) BCC dès l'adolescence ou plus rarement dès l'enfance. Les patients présentent une susceptibilité à développer de nombreuses autres tumeurs, en particulier des MB. Ils sont également sujets à des malformations squelettiques et à une hypersensibilité aux radiations ; pour revue, (*Epstein, 2008*).

Le rôle du récepteur Ptc le mieux caractérisé actuellement est celui de suppresseur de tumeur mis en évidence par la découverte de mutations perte de fonction dans le gène Ptc humain du chromosome 9q22 à l'origine du syndrome de Gorlin (*Gailani et al., 1992; Hahn et al., 1996; Unden et al., 1996*). Ce rôle est conservé chez les souris hétérozygotes Ptc^{+/-} (*Goodrich et al., 1997*) où Ptc contrôle l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (*Adolphe et al., 2006*). Les souris Ptc hétérozygotes sont un bon modèle animal du syndrome de Gorlin et présentent plusieurs des aspects phénotypiques de la maladie dont une plus grande susceptibilité au développement de MB. Cependant, le fond génétique de la souris peut influencer l'incidence d'apparition des tumeurs (*Goodrich et al., 1997; Hahn et al., 1998; Wetmore et al., 2000*). Ces souris développent des BCC suite à l'exposition aux ultraviolets (UV) ou aux radiations ionisantes contrairement aux souris contrôles qui ne développent jamais ce type de tumeurs même après exposition à l'agent cancérigène ; pour revue, (*Li et al., 2011b*). Comme l'inactivation complète de Ptc est létale, un modèle d'inactivation conditionnelle dans les kératinocytes a été développé et permet de reproduire les caractéristiques pathologiques des BCC humains (*Ellis et al., 2003*). Par ailleurs, la

surexpression de Shh dans la peau induit un phénotype rappelant le BCC et mime les conséquences des mutations perte de fonction de Ptc observées dans les tumeurs humaines (Fan et al., 1997; Oro et al., 1997). Les mutations gain de fonction de Smo (Lam et al., 1999; Reifemberger et al., 1998; Xie et al., 1998) contribuent aussi au développement de BCC, de même que la dérégulation des facteurs de transcription Gli1 (Dahmane et al., 1997; Nilsson et al., 2000), Gli2 (Grachtchouk et al., 2000; Sheng et al., 2002) ou du régulateur négatif Sufu (Reifemberger et al., 2005).

L'origine cellulaire des BCC est encore largement débattue. Comme nous l'avons vu dans le chapitre consacré au rôle de la signalisation Hh dans le développement cutané, plusieurs types de précurseurs cellulaires interviennent dans le développement du follicule pileux. Un certain nombre de ces précurseurs sont toujours présents dans le tissu adulte. Initialement, les cellules souches contenues dans le renflement du follicule pileux ont été supposées être à l'origine du développement tumoral (Cotsarelis et al., 1990). Depuis, un ensemble de travaux ont suggéré que la cellule « initiatrice » pourrait varier en fonction de la mutation à l'origine de la dérégulation de la voie Hh. Ainsi, les cellules de l'épiderme interfolliculaire seraient impliquées dans des modèles de BCC par surexpression de Smo (mutant SmoM2, (Youssef et al., 2010), tandis que les cellules souches du follicule pileux seraient à l'origine des BCC associés à des mutations de Ptc (Wang et al., 2011) ou de Gli2 (Grachtchouk et al., 2011); **Figure 10**).

Le rôle du cil primaire dans le développement des BCC dépend également de la nature de la mutation à l'origine de la dérégulation de la voie Hh. En effet, la délétion conditionnelle des allèles Kif3a ou Ift188 nécessaires à l'intégrité du cil primaire diminue la formation de BCC chez des animaux surexprimant SmoM2 dans les kératinocytes, mais potentialise la tumorigenèse chez des animaux présentant une mutation activatrice de Gli2 (Wong et al., 2009). Le cil primaire sera donc un élément important à considérer dans le traitement des BCC.

❖ **Médulloblastomes (MB) :**

C'est une tumeur de la région postérieure de l'encéphale constituant la tumeur maligne du SNC la plus classique chez l'enfant bien qu'elle n'affecte qu'une naissance sur 10 000 chaque année en France ; pour revues, (Barakat et al., 2010; Hatten and Roussel, 2011; Ng and Curran, 2011). La majorité des enfants survivent mais ils présentent des troubles

cognitifs et psychosociaux déclenchés par les traitements de chimiothérapie et radiothérapie auxquels ils sont soumis. Une meilleure compréhension des processus tumorigéniques impliqués dans cette pathologie est nécessaire pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Vassal, 2009).

Plus de 30 % des MB présentent une signature Hh avec une dérégulation du niveau d'expression d'au moins un des gènes de la voie. Cependant, parmi ces 30 % seulement 50 % des tumeurs sont associées à une inactivation des gènes Ptc ou Sufu. Bien que moins fréquentes que les mutations de Ptc, certaines mutations activatrices affectant le récepteur Smo humain ont été détectées dans plus de 5 % de MB sporadiques (Kool *et al.*, 2008; Reifenberger *et al.*, 1998; Thompson *et al.*, 2006). Ainsi, certaines tumeurs présentent une activation de la voie Hh sans preuve de mutations sur les composantes Ptc, Smo ou Sufu.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la souris Ptc^{+/-} est un modèle de MB, mais la fréquence d'apparition de ces tumeurs n'est que de 14 % chez ces animaux (Wetmore *et al.*, 2000). Leur incidence atteint 100 % avec un développement beaucoup plus précoce lorsque les animaux sont en plus déficients pour le gène p53 (Berman *et al.*, 2002; Wetmore *et al.*, 2001) ou lorsqu'ils sont irradiés (Pazzaglia *et al.*, 2002). La genèse du MB est vraisemblablement liée à plusieurs événements parmi lesquels on retrouve, la perte de fonction des suppresseurs de tumeurs Ptc et p53, mais aussi l'altération des gènes requis pour la réparation de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (Frappart *et al.*, 2009).

D'autres modèles murins de MB sont constitués de mutations ponctuelles activatrices du gène Smo, initialement décrites dans les BCC (Reifenberger *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1998), ou de formes constitutivement actives de Smo (SmoA1) exprimées sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription Neurod2 (Hallahan *et al.*, 2004). Dans ce dernier modèle, l'incidence d'apparition des MB est de 48 %. En plus de l'induction des gènes classiques de la voie Hh (Gli1 et Nmyc), une induction des gènes de la voie Notch y est détectée ce qui mime de façon intéressante l'induction de ces deux voies observée dans les MB humains. Bien d'autres modèles ont été développés et sont présentés dans le **Tableau 2**. Aucun d'eux n'est cependant capable de refléter la grande diversité des MB humains.

L'étude récente de l'origine cellulaire des MB a permis d'identifier deux sous-groupes potentiels de tumeurs respectivement liées à des mutations des composantes des voies Shh et Wnt (Gibson *et al.*, 2010). Les cellules constituant les MB Hh-dépendants ont un profil

d'expression génique rappelant celui des GCP du cervelet (*Lee et al., 2003*). En accord avec cette observation, l'inactivation conditionnelle de *Ptc* dans les GCP qui expriment le gène *Math1*, un marqueur spécifique de ces cellules, induit l'apparition de MB (*Yang et al., 2008*) suggérant que l'oncogenèse résulte de l'activation de la voie spécifiquement dans les GCP.

Comme dans le cas des BCC, le cil primaire serait également impliqué dans une fraction des MB où les voies *Shh* ou *Wnt* sont activées. Le cil primaire serait donc une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de ces cancers (*Han et al., 2009*). La compréhension de la régulation de ces deux voies de signalisation dans cette organelle est très importante d'un point de vue thérapeutique.

❖ **Rhabdomyosarcomes (RMS):**

Il s'agit du sarcome pédiatrique affectant les tissus mous le plus commun et comptant pour plus de 10 % des tumeurs solides malignes de l'enfant ; pour revue, (*Teglund and Toftgard, 2010*). D'un point de vue morphologique, le RMS présente les caractéristiques des cellules des muscles squelettiques. Cette morphologie est variable en fonction de la localisation de la tumeur et de l'âge du patient. Bien que la majorité des RMS apparaissent de manière sporadique, certains sont associés au syndrome de Gorlin (*Tostar et al., 2006*). Chez la souris, le RMS apparaît également chez les animaux *Ptc* hétérozygotes (*Kappler et al., 2003*). Cependant, comme pour les BCC, le fond génétique de la souris influence l'incidence d'apparition de la tumeur (*Hahn et al., 1998*). La délétion du gène *Trp53* (pour Transformation related p53) augmente aussi le développement des RMS, mais la majorité des animaux *Ptc^{+/-}Trp53^{-/-}* décèdent rapidement suite au développement des MB (*Lee et al., 2007*). Par ailleurs, la délétion d'un allèle du gène *Sufu* n'augmente pas l'incidence des RMS chez les animaux *Ptc^{+/-}* suggérant que, dans ce cancer, il n'y a pas d'effet coopératif entre les deux acteurs de la voie (*Lee et al., 2007*). D'autres modèles murins de RMS ont été proposés tels que les souris *Hhip^{+/-}* ou le modèle conditionnel CAGGS-CreER R26-SmoM2 (*Gerber et al., 2007; Mao et al., 2006*). L'étude de ces souris transgéniques démontre de manière claire que la voie Hh est impliquée dans le développement de certains RMS. Néanmoins, de nouvelles études seront nécessaires afin d'établir si la régulation de la voie Hh doit faire partie du traitement des patients atteints de RMS.

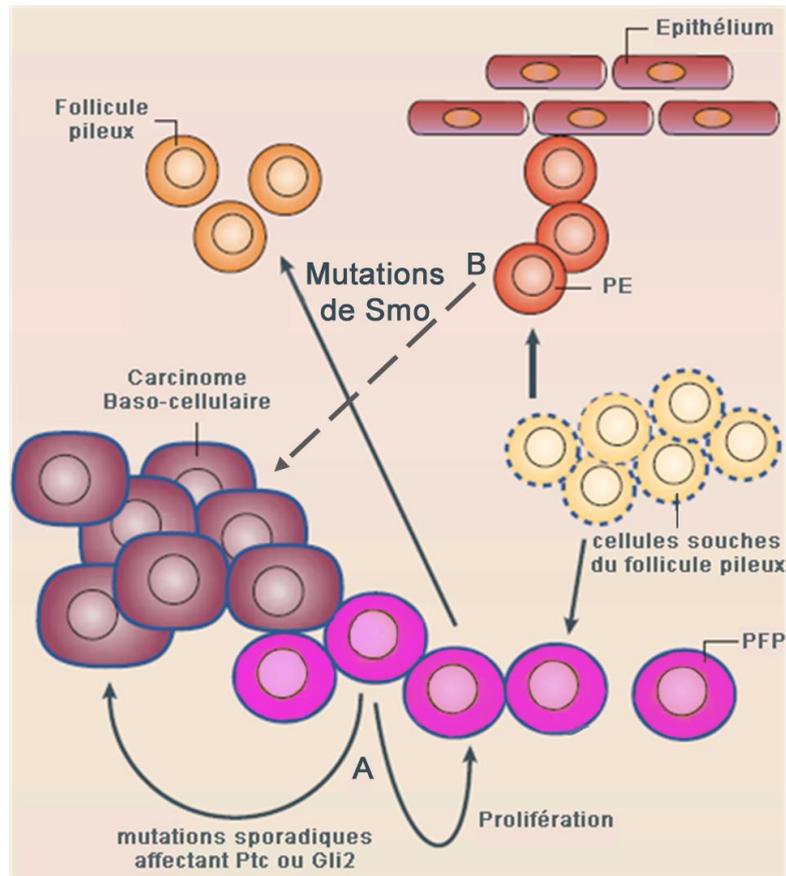


Figure 10 : Voie Sonic Hedgehog et développement de carcinomes basocellulaires.

Les cellules souches ou cellules multipotentes du follicule pileux (jaune) donnent naissance aux progéniteurs épithéliaux (PE, orange foncé) et aux progéniteurs des follicules pileux (PFP, rose). Les PE, après prolifération, vont se différencier en épithélium stratifié. Les PFP vont se différencier en follicule pileux. La prolifération incontrôlée des progéniteurs du follicule pileux liée à des mutations sporadiques du récepteur Patched (Ptc) ou de Gli2 (A, (*Grachtchouk et al., 2011; Wang et al., 2011*)) et celle des progéniteurs épithéliaux liées à des mutations gain de fonction de Smoothened (Smo ; B, (*Youssef et al., 2010*)) sont à l'origine du développement de carcinomes basocellulaires. D'après (*Pasca di Magliano and Hebrok, 2003*).

2.1.2. Tumeurs liées à une activation aberrante de la voie Hh

En dehors de l'existence de mutations sur les composantes de la voie, l'apparition de tumeurs dépendant de la signalisation Hh pourrait être consécutive à sa réactivation incontrôlée au cours d'un processus de réparation des tissus ; pour revue, (*Beachy et al., 2004*). Ainsi, l'analyse d'un grand nombre de tumeurs solides périphériques a permis de mettre en évidence une augmentation du niveau d'expression des gènes cibles de la voie tels que Ptc et Gli ou encore du ligand Shh lui-même. Ces tumeurs sont dites tumeurs dépendant du ligand par opposition à celles dérivant d'une mutation des composantes de la voie Shh et par conséquent indépendantes de la quantité de ligand Hh biodisponible.

Les premières tumeurs de ce type à être identifiées sont les cancers du poumon à petites cellules (SCLC : « Small-cell lung cancer » ; (*Watkins et al., 2003*). 25 % de ces tumeurs ont un niveau d'expression de Shh et Gli1 supérieur à ce qui est déterminé dans des tissus sains. Par ailleurs, la croissance de ces cellules en culture peut être bloquée par un antagoniste du récepteur Smo, la cyclopamine, ou bien par un anticorps dirigé contre le ligand Shh (5E1). En accord avec l'hypothèse d'une réactivation incontrôlée de la voie Hh, l'exposition au naphthalène de tissus respiratoires de souris entraîne une augmentation du taux d'expression de Shh et Gli1 dans les cellules épithéliales du poumon.

Des taux anormalement élevés de Shh, Ptc et Smo ont également été identifiés dans des tumeurs précoces du pancréas chez l'Homme (*Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003*). Un mécanisme comparable a, par la suite, été proposé pour les tumeurs de la prostate (*Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004*), du tractus digestif (*Berman et al., 2003*), du colon (*Varnat et al., 2009*), du sein (*Fiaschi et al., 2009; Kubo et al., 2004*), des ovaires (*Chen et al., 2007*), des mélanocytes (*Stecca et al., 2007*) ou des cellules hématopoïétiques (*Zhao et al., 2009*). Par ailleurs, la voie Shh, lorsqu'elle est suractivée, serait à l'origine de diverses tumeurs du SNC telles que les gliomes proprement dit (*Clement et al., 2007; Monje et al., 2011*), mais aussi les glioblastomes et les astrocytomes (*Bar et al., 2007; Rush et al., 2010*) ou bien les neuroblastomes (*Mao et al., 2009*).

Le développement des métastases pourrait également être sous le contrôle de la voie Shh pour les tumeurs de la prostate (*Karhadkar et al., 2004*), du colon (*Varnat et al., 2009*) ou du pancréas (*Bailey et al., 2009; Feldmann et al., 2007*) comme l'indique l'inhibition pharmacologique de la voie ou l'utilisation de l'anticorps 5E1 neutralisant le ligand Shh. Le

Construction génétique	Mécanisme	Incidence
Ptc^{+/-}	KO conventionnel	14-19 % par 10 mois
Ptc^{+/-}	KO conventionnel; irradiation	100 % par 10 mois
Ptc^{+/-}; p53^{-/-}	KO conventionnel	100 % par 2-3 mois
Ptc^{+/-}; Ptc2^{+/-}	KO conventionnel	17 % par 10 mois
Ptc^{+/-}	KO conditionnel (GFAP-Cre, Math1-Cre)	100 % par 1-3 mois
ND2-SmoA1	TG	94 % par 2 mois
SmoM2	TG conditionnel (GFAP-Cre, Math1-Cre, Olig2-Cre, Tlx-Cre)	100 % par 2-4 mois
Sufu^{+/-}; p53^{-/-}	KO conventionnel	58 % par 10 mois
Shh	RCAS	9 %-34 % par 3 mois
Shh; cmyc/Akt/IGF2	RCAS	23-48 % par 3 mois
Shh; n-myc	RCAS	78 % par 3 mois
Shh; Bcl-2	RCAS	78 % par 3 mois
Rb^{+/-}; p53^{-/-}	KO conditionnel (GFAP-Cre)	25 %-100 % par 2-7 mois
Ink4c^{+/-}; p53^{+/-}	KO conventionnel et conditionnel (Nestin-Cre); irradiation	20-100 % par 5 mois
Ptc^{+/-}; Ink4c^{+/-}	KO conventionnel	40-50 % par 9 mois
Lig4^{+/-}; p53^{+/-}	KO conventionnel	100 % par 2 mois
Brca2^{+/-}; p53^{+/-}	KO conventionnel et conditionnel (Nestin Cre)	72 %-83 % par 4-8 mois
Xrcc4^{+/-}; p53^{-/-}	KO conventionnel et conditionnel (Nestin Cre)	100 % par 6 mois

Tableau 2 : Modèles murins de médulloblastomes.

Le tableau présente les constructions génétiques sur lesquelles reposent les modèles, la modification génétique associée et l'incidence d'apparition des tumeurs. Abréviations: TG= transgénique, KO = knockout, RCAS= Replication-Competent ASLV (pour Avian Sarcoma-Leukosis Virus) long terminal repeat (LTR) with a Splice acceptor, Tlx = Tailless, GFAP = Glial fibrillary acid protein, ND2 = Neurogenic differentiation Factor2, Bcl2 = B-cell lymphoma 2, Rb = Retinoblastoma gene, Ink4c = Inhibitor of cyclinD-associated kinase 4c, Lig4 = DNA ligase 4, Brca2 = Breast cancer 2 susceptibility protein, Xrcc = X-ray repair cross complementing protein. D'après (*Huse and Holland, 2009*).

cil primaire pourrait jouer un rôle important dans ce type de tumeurs. Ptc, Smo ou le facteur de transcription Gli2 sont notamment exprimés dans le cil primaire des cellules cancéreuses pancréatiques (Bailey *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2008).

2.1.3. Modèles d'activation de la voie Shh responsable de la tumorigenèse

Parmi les tumeurs dépendant du ligand Hh, deux catégories peuvent être distinguées selon la nature des cellules sécrétant et répondant respectivement au ligand Hh. On parlera donc de tumeurs autocrines ou paracrines.

❖ **Modèle autocrine :**

Dans ce modèle, la cellule tumorale est à la fois capable de sécréter le ligand Shh et d'y répondre (**Figure 11**). La voie de signalisation Hh stimulerait ainsi la prolifération et la survie des cellules à l'origine de la croissance tumorale ; pour revue, (Scales and de Sauvage, 2009). Ce modèle a été proposé pour les tumeurs dépendant du ligand (notamment certains types de MB) définies par une forte expression de Shh et des composantes de la voie par les cellules tumorales et l'inhibition de la croissance de ces cellules *in vitro* et *in vivo* par un antagoniste de Smo, la cyclopamine (Berman *et al.*, 2002). Les mécanismes d'action mis en jeu dans les effets tumorigéniques de Shh sont le contrôle du cycle cellulaire par la régulation de l'expression des cyclines, mais aussi de l'oncogène N-myc dans le SNC (Kenney *et al.*, 2003). N-myc est un facteur de transcription essentiel pour la prolifération cellulaire et dont l'expression est réduite en présence de cyclopamine dans les cellules issues de MB en culture (Berman *et al.*, 2002). Les formes activatrices des facteurs de transcription Gli induisent l'expression de SNAIL, une protéine à doigts de zinc se liant aux protéines E-cadhérine engendrant ainsi la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, un processus requis pour la migration des cellules tumorales et la formation des métastases. La cyclopamine est, là encore, capable d'inhiber l'induction de l'expression de SNAIL et donc de freiner la capacité des lignées cellulaires prostatiques cancéreuses à métastaser (Karhadkar *et al.*, 2004).

Cependant, ce modèle a depuis été controversé. L'une des premières raisons est que les concentrations micromolaires de cyclopamine requises pour inhiber la prolifération des cellules de MB en culture sont plus de 300 fois supérieures à celles capables d'inhiber la signalisation Shh dans des fibroblastes exprimant un gène rapporteur sous le contrôle du

promoteur Gli (*Romer et al., 2004*). De plus, l'expression des cibles transcriptionnelles de la voie, Gli1 et Ptc, n'est pas diminuée par la cyclopamine, même utilisée à des doses élevées et capables de bloquer la croissance tumorale (*Zhang et al., 2009*). Enfin, dans un large panel de lignées de cellules tumorales pancréatiques, colorectales ou pulmonaires, les CI_{50} (concentration inhibitrice à 50 %) de la cyclopamine et d'un autre antagoniste de Smo (HhAntag) ne sont pas du tout corrélées avec les niveaux d'expression de Gli1 et Ptc dans ces mêmes cellules (*Yauch et al., 2008*). L'ensemble de ces constatations ouvre donc la possibilité d'un second modèle permettant de mieux comprendre le développement tumoral dépendant de la signalisation Hh. Cependant, le modèle autocrine ne doit pas être pour autant exclu. Il vient d'ailleurs d'être à nouveau proposé dans le cas de tumeurs NSCLC (non-Small Cell Lung Carcinomas ; (*Singh et al., 2011*) ou de carcinomes de la prostate (*Tzelepi et al., 2011*). Ainsi, la validité du modèle autocrine dépendrait en particulier des lignées tumorales étudiées et de leur origine humaine ou murine (*Singh et al., 2011*).

❖ **Modèle paracrine :**

Dans ce modèle, la cellule tumorale exprime le ligand Shh mais ce sont les cellules stromales qui expriment le système de réception/transduction du signal (**Figure 11**). L'activation de la voie dans les cellules environnantes va induire la libération de facteurs trophiques qui agiront en retour sur les cellules tumorales favorisant ainsi leur multiplication et/ou différenciation. Dans le modèle paracrine inverse, les cellules stromales sécrètent le ligand qui agit sur les cellules tumorales réceptrices et favorise directement leur expansion; pour revue, (*Scales and de Sauvage, 2009*).

Le modèle paracrine a été proposé pour la première fois dans le cas des tumeurs de la prostate (*Fan et al., 2004*) où les cellules tumorales accroissent leur prolifération si on y surexprime les composantes de la voie Hh et si on les injecte *in vivo* chez l'animal sous forme de xénogreffes. En accord avec ce modèle, l'utilisation d'anticorps neutralisant le ligand Shh ou l'invalidation de Smo dans les cellules du stroma de xénogreffes induisent une forte diminution de l'expression des gènes cibles de la voie et de la croissance tumorale (*Yauch et al., 2008*). Les effets de l'anticorps neutralisant le ligand ont été retrouvés dans un modèle de tumeur pancréatique orthotopique. La détection de Smo dans les cils primaires des cellules du stroma indique que la voie Shh est active dans ces cellules. En revanche, le ligand Shh n'est exprimé que dans les cellules de la tumeur (*Bailey et al., 2009*). Par ailleurs, la surexpression de l'allèle oncogénique de Smo, SmoM2, dans les cellules épithéliales du carcinome

pancréatique n'est pas capable d'activer la signalisation Shh contrairement à son expression dans les cellules du mésenchyme (*Tian et al., 2009*). Le criblage de lignées primaires de cellules stromales issues de tumeurs pancréatiques a mis en évidence l'accumulation de l'expression du récepteur Smo dans ces cellules et renforce l'idée que les cellules stromales sont une cible thérapeutique importante pour le développement d'antagonistes du récepteur Smo (*Walter et al., 2010*).

Ce modèle paracrine vient également d'être proposé dans le développement et les métastases de tumeurs du sein (*O'Toole et al., 2011*). Cependant, le mécanisme du rétrocontrôle exercé par la cellule stromale sur la cellule tumorale n'est pas encore totalement élucidé. En effet, d'autres signalisations telles que celles induites par le facteur de croissance de l'insuline (Igf1 pour Insulin Growth factor type 1) ou les molécules Wnt sont modulées de la même manière que la signalisation Shh dans les modèles de xéno greffes en présence d'un antagoniste de Smo (*Yauch et al., 2008*). Par ailleurs, la signalisation Shh pourrait stimuler la libération de facteurs pro-angiogéniques par les cellules stromales qui favoriseront à leur tour la tumorigenèse (*Yamazaki et al., 2008*). Ces résultats ont été récemment confortés dans des modèles de xéno greffes et d'angiogenèse utilisant à la fois des antagonistes de la voie Shh et des inhibiteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) montrant que la libération du VEGF nécessaire à l'angiogenèse et au développement de la tumeur, dépend de l'activation de la voie Shh (*Chen et al., 2011a*).

La validation du modèle paracrine inverse est plus préliminaire et ne concernerait que les lymphomes à cellules de type B. Dans ce cas, le ligand Shh sécrété par le stroma de la moelle osseuse, est nécessaire à la survie des cellules B cancéreuses en favorisant l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl2 (*Dierks et al., 2007*).

2.1.4. Shh et les cellules souches tumorales

Il existe un dernier modèle selon lequel la signalisation Shh contrôlerait le maintien et le développement d'une sous-population de cellules tumorales, les cellules souches cancéreuses (CSC ; **Figure 11** et pour revues, (*Vescovi et al., 2006; Visvader and Lindeman, 2008*). Ces cellules sont capables d'auto-renouvellement et sont multipotentes, permettant donc de générer tous les types cellulaires retrouvés dans la tumeur. Les CSC ont la particularité d'être résistantes aux radiations et à la chimiothérapie pour plusieurs raisons :

elles se multiplient lentement, elles expriment fortement des protéines transporteurs permettant d'exporter les drogues dans le milieu extracellulaire et elles n'exprimeraient pas les protéines oncogènes cibles des médicaments développés actuellement. Cette dernière caractéristique laisse donc penser que ces cellules seraient à l'origine des rechutes dans les traitements anticancéreux, ce qui en fait une cible thérapeutique majeure.

Dans le cerveau, les CSC ont été proposées dériver des aires de neurogenèse adulte notamment de la ZSV. Ainsi, l'expression de certains gènes exprimés dans les progéniteurs neurax astrocytaires (cellules B) de la ZSV pourrait contrôler la conversion de ces cellules en CSC. La délétion combinée des gènes Rb, p53 et PTEN dans les cellules B de la ZSV donnerait naissance à des tumeurs cérébrales et en particulier des gliomes. A l'inverse, la mutation des mêmes gènes dans des populations d'astrocytes différenciés n'induit pas de tumeur (*Jacques et al., 2010*). La signalisation Shh régule l'expression des gènes nécessaires à la multipotentialité et à l'auto-renouvellement des CSC dérivées de gliomes et exprimant l'antigène CD133 (*Clement et al., 2007*). Les cellules CD133⁺ expriment un taux supérieur à la normale du facteur de transcription Gli1 et sont capables de donner des gliomasphères en culture dont le développement est inhibé en présence de témozolyde (médicament utilisé dans le traitement des gliomes) et de cyclophosphamide (*Bar et al., 2007; Clement et al., 2007*). La multiplication des CSC et la tumorigenèse des gliomes semblent contrôlées par une boucle rétro-inhibitrice entre Gli1 et le suppresseur de tumeurs p53 (*Stecca and Ruiz i Altaba, 2009*). Par ailleurs, dans un modèle de leucémie myéloïde chronique (LMC), les cellules invalidées pour l'expression de Smo perdent leur capacité à développer des tumeurs contrairement à celles exprimant le transgène SmoM2 qui favorise la tumorigenèse. Là encore, la cyclophosphamide, mais aussi l'anticorps anti-Shh, 5E1, inhibent la prolifération des CSC dans le modèle de LMC (*Zhao et al., 2009*).

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

L'importance de la voie Shh dans le contrôle des cellules souches et des CSC souligne l'intérêt du développement de molécules permettant une régulation précise de la signalisation Hh à des fins thérapeutiques.

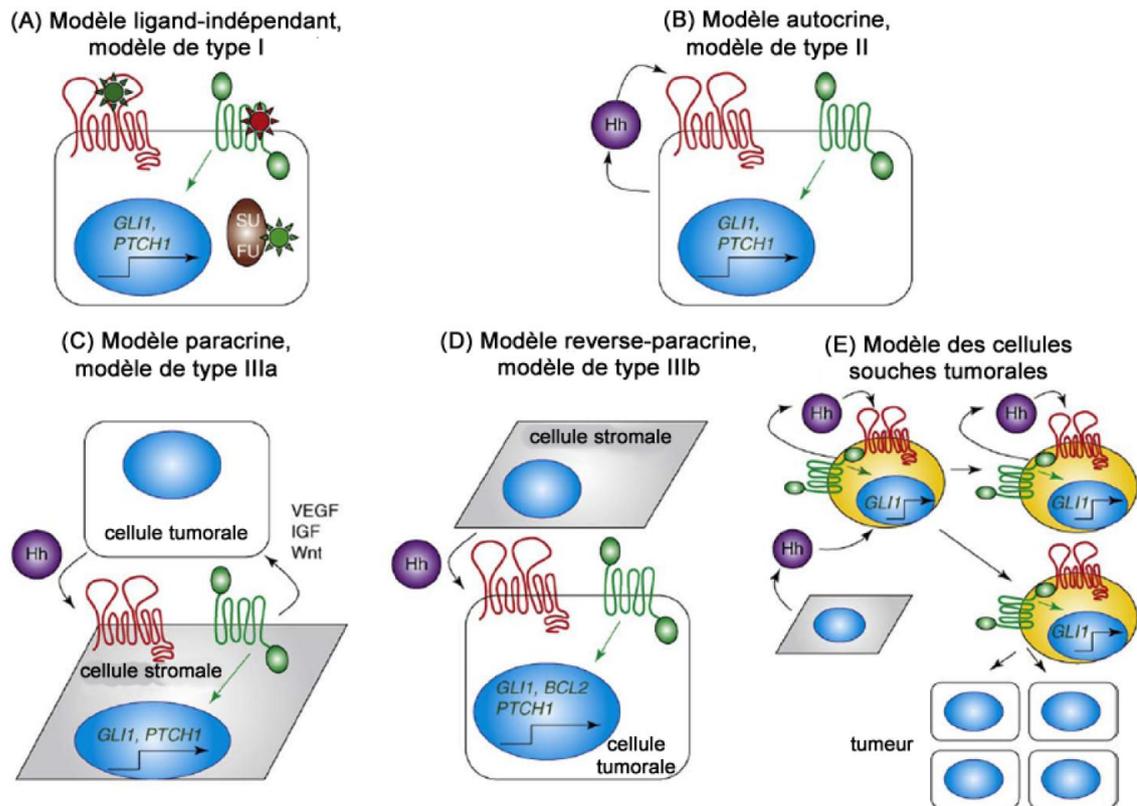


Figure 11 : Les différents modèles impliquant la signalisation Hedgehog dans les cancers.

(A) Les tumeurs de type I, indépendantes du ligand présentent une mutation inactivatrice (étoile verte) sur les régulateurs négatifs (Patched1 (PTCH1) ou Sufu) ou une mutation activatrice (étoile rouge) sur Smoothened (Smo). (B) Les tumeurs de type II ou autocrines sont capables à la fois de sécréter le ligand Hedgehog (Hh) et d'y répondre. (C) Les tumeurs de type IIIa suivent le modèle paracrine dans lequel les cellules tumorales sécrètent le ligand Hh qui se lie au récepteur PTCH1 exprimé à la surface des cellules stromales conduisant à la libération de facteurs trophiques tels que VEGF, IGF ou Wnt qui agiront sur la cellule tumorale en favorisant sa croissance. (D) Les tumeurs de type IIIb suivent le modèle paracrine inverse. Les cellules stromales sécrètent le ligand Hh qui se lie au récepteur PTCH1 exprimé à la surface des cellules tumorales, engendrant l'activation de la voie Hh et donc l'expression des gènes cibles tels que PTCH1, Gli1 ou Bcl2 importants pour la survie et la prolifération des cellules. (E) La signalisation Hh n'est active que dans les cellules présumées souches et appartenant à la tumeur. Légende : PTCH1, en rouge; Smo, en vert; ligand Hh, en violet; Sufu, en marron; noyau, en bleu; cellules souches tumorales, en jaune. D'après (Scales and de Sauvage, 2009).

2.2. Autres pathologies

2.2.1. Malformations congénitales

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

Les autres malformations congénitales sont associées, à l'inverse, à une signalisation Hh déficitaire. La plus fréquente est l'HPE qui se caractérise notamment par des malformations de la tête et du SNC au niveau de la ligne médiane. La symptomatologie très variable peut aller de l'existence d'un prosencéphale n'ayant pas subi la fissure interhémisphérique, d'une cyclopie et d'un proboscis, à des signes cliniques beaucoup moins sévères tels que la fente palatine, l'incisive médiane unique ou le rapprochement excessif des deux yeux ; pour revue, (*Gongal et al., 2011*). Bien que l'HPE soit multigénique, une anomalie de la signalisation Hh est retrouvée dans 50 % des cas. En effet, plus de 60 mutations du gène *Shh* ont été associées à l'HPE, de même que des mutations de *Ptc* et de *Gli2*. L'analyse par mutagenèse dirigée des protéines *ShhN* et *ShhC* a permis de montrer que la majorité des mutations identifiées dans des cas d'HPE induisent une activité réduite du polypeptide biologiquement actif *ShhN* (*Traiffort et al., 2004*) et pour revue, (*Gongal et al., 2011*).

Deux autres syndromes présentent un grand nombre de caractéristiques des pathologies associées à une signalisation Hh anormale au cours de l'embryogenèse. Il s'agit du syndrome VACTERL (Vertebral anomalies, Anal atresia, Cardiac Malformations, Tracheo-Eosophageal fistula, Renal et Limb malformations ; pour revue, (*Shaw-Smith, 2010*) dans lequel des mutations de *Shh* ont été identifiées (*Aguinaga et al., 2010*) et du syndrome de Smith Lemli-Opitz (SLOS pour Smith Lemli-Opitz Syndrom) lié à des mutations du gène codant pour l'enzyme 7-déhydrocholestérol réductase (*Dhcr7*) qui intervient dans la dernière étape de la biosynthèse du cholestérol ; pour revue, (*Porter and Herman, 2011*). Un grand nombre de mécanismes affectant la signalisation *Shh* pourraient être compromis dans ce dernier syndrome étant donné le rôle prépondérant du cholestérol pour la synthèse, le

transport et la réception du ligand de la voie Hh ; pour revue, (Eaton, 2008). Récemment, la démonstration du rôle de Ptc dans la régulation des concentrations intracellulaires de cholestérol est en accord avec les défauts de la signalisation Hh observés dans le syndrome SLOS (Bidet et al., 2011). De plus, les effets des oxystérols et de la vitamine D₃ récemment mis en jeu dans la signalisation Shh ont confirmé l'importance de l'enzyme Dhcr7 dans la régulation de cette voie ; pour revues, (McMahon et al., 2003; Porter and Herman, 2011). Des modèles animaux de SLOS ont permis d'établir une corrélation entre la diminution des taux de stérols cellulaires et la diminution d'activité de la voie Hh, notamment au niveau du récepteur Smo (Cooper et al., 2003). Une mutation sur l'allèle codant pour l'enzyme hydroxystéroïde (17β)-déhydrogénase 7 dans le modèle murin *rudolph* engendre une diminution de l'induction des gènes cibles de la voie Hh à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ce modèle apporte pour la première fois, une preuve génétique de l'implication du métabolisme du cholestérol dans la régulation de la voie Hh au cours du développement et en particulier dans le SNC (Stottmann et al., 2011).

2.2.2. Maladies dégénératives

Un certain nombre de liens ont été établis entre la voie Hh et les pathologies dégénératives. La régulation pharmacologique de la voie pourrait présenter un intérêt thérapeutique même si à l'heure actuelle et contrairement aux domaines des cancers, aucune molécule n'est utilisée dans des protocoles cliniques pour ces pathologies. Contrairement aux modèles d'ostéoarthrite sévère où un blocage pharmacologique de la voie permet de freiner le développement de la maladie (Lin et al., 2009), dans les modèles d'ischémie, c'est le ligand Shh lui-même qui s'est montré capable d'induire une angiogenèse robuste dans les tissus lésés (Pola et al., 2001). Cependant, je me limiterai ici aux données disponibles pour les pathologies cérébrales. Dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire engendrant des troubles moteurs importants), l'injection intrastriatale de ShhN permet d'améliorer les fonctions locomotrices et d'augmenter le nombre de cellules dopaminergiques dans le striatum (Dass et al., 2002; Tsuboi and Shults, 2002). *In vitro*, la protéine Shh est capable d'induire la différenciation de précurseurs neuraux en neurones dopaminergiques, et de prévenir l'apoptose de ces neurones induite par une neurotoxine (Hynes et al., 1995; Miao et al., 1997). D'autre part, Shh est également capable d'induire la différenciation spécifique de

neurones post-mitotiques en neurones cholinergiques *in vitro*, ce qui pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer caractérisée par des troubles cognitifs associés à la perte de neurones cholinergiques (Reilly *et al.*, 2002). Le rôle de la signalisation Shh dans la neurogenèse adulte et en particulier dans l'hippocampe mais aussi l'observation d'une modulation de la transcription de Ptc et de Smo suite aux électrochocs utilisés dans le traitement des syndromes dépressifs sévères suggèrent un intérêt potentiel de la modulation de la voie dans cette pathologie (Banerjee *et al.*, 2005). La signalisation Hh induit par ailleurs un effet neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie cérébrale (Wang *et al.*, 2007). Shh régule enfin la prolifération des OPC dans le cerveau de rongeurs adultes laissant supposer que la modulation de la voie Shh pourrait être une approche à envisager pour le traitement des pathologies démyélinisantes ; pour revue, (Traiffort *et al.*, 2010).

2.2.3. Ciliopathies

L'importance du cil primaire pour la signalisation Hh a récemment permis d'établir des liens entre cette voie et les ciliopathies, un groupe hétérogène de maladies dont les signes cliniques variés peuvent inclure kystes rénaux, dégénérescence de la rétine, polydactylie, retards mentaux, obésité ; pour revues, (Goetz and Anderson, 2010; Hildebrandt *et al.*, 2011). Ainsi, la polydactylie affectant les patients atteints des syndromes de Bardet-Biedl ou de Meckel, et les anomalies du squelette des patients atteints du syndrome Ellis-van Creveld sont attribuées à la dérégulation de la signalisation Hh vraisemblablement et respectivement par perte de l'activité répressive du facteur de transcription Gli3 et invalidation du gène *Ihh* (Ruiz-Perez *et al.*, 2007). La signalisation Hh est également impliquée dans les défauts de développement du crane et de la tête retrouvés dans des modèles murins du syndrome de Meckel (Dowdle *et al.*, 2011; Weatherbee *et al.*, 2009).

De plus, les patients atteints du syndrome de Joubert présentent une ataxie liée à une hypoplasie du cervelet impliquant vraisemblablement la voie Shh (Brancati *et al.*, 2009). Récemment, une analyse protéomique extensive a notamment permis d'identifier un nouveau gène, *Tctn2*, associé au syndrome de Joubert et à une forme sévère de néphropathie tubulointerstitielle chronique. L'invalidation de ce gène chez la souris est associée à des défauts du tube neural et de la signalisation Shh (Sang *et al.*, 2011).

L'invalidation de *Tcnt1*, codant pour une protéine impliquée dans la formation de la zone de transition du cil primaire, est responsable de dérégulation de la voie Hh et conduit au syndrome de Joubert et Meckel. Cette protéine régule la localisation de protéines associées à la membrane du cil et son invalidation s'accompagne d'un défaut d'expression de Smo dans l'organelle (*Garcia-Gonzalo et al., 2011*). De plus, un nouveau locus associé au syndrome de Joubert (JBTS12), révèle des mutations dans le gène de la kinésine Kif7 induisant un défaut d'acétylation de la tubuline et une mauvaise dynamique du réseau de microtubules (*Dafinger et al., 2011*). Les patients porteurs de cette mutation, présentent une polydactylie, des défauts cérébraux et une fente palatine associés à un défaut de clivage du facteur de transcription Gli3 (*Putoux et al., 2011*).

III. Pharmacologie de la voie Hedgehog

Ces dernières années, des avancées majeures ont amélioré notre compréhension du mécanisme d'action de la voie Shh et de ses rôles physiologiques chez l'embryon ou chez l'adulte. Bon nombre d'entre elles ont fait appel à l'utilisation d'outils pharmacologiques ; pour revues, (*Scales and de Sauvage, 2009; Stanton and Peng, 2010*). Cependant, bien des aspects du fonctionnement de cette voie restent à éclaircir. Par ailleurs, la variété et la sévérité des pathologies reliées à des défauts de régulation de cette voie soulignent l'importance du développement de petites molécules permettant de réguler finement son niveau d'activité (*Ng and Curran, 2011*). Des molécules capables d'activer le récepteur Smo ont été développées et sont susceptibles d'avoir un intérêt thérapeutique dans des pathologies où une régénération tissulaire est nécessaire. Cependant, la majorité des molécules disponibles tendent à réduire l'activité constitutive du récepteur Smo afin d'enrayer une hyperactivation de la voie responsable de l'émergence de tumeurs. Certaines de ces molécules sont actuellement testées en clinique dans le traitement de tumeurs périphériques, notamment les BCC, mais aussi dans celui des MB (*Low and de Sauvage, 2010*). Des molécules ayant pour cibles des composantes de la voie en aval (Gli) ou en amont (Shh) de Smo ont aussi été développées, mais à l'heure actuelle, aucune d'entre elles n'est testée en clinique (**Figure 12**).

1. Pharmacologie du récepteur Smo

Smo a été initialement caractérisé comme un récepteur à 7 domaines TM sans ligand endogène identifié, ce qui en fait une cible privilégiée pour le développement de petites molécules capables de réguler l'activité de la voie Hh. A l'heure actuelle, parallèlement au développement de ligands synthétiques, quelques ligands naturels sont proposés moduler l'activité de Smo.

1.1. Agonistes

1.1.1. Molécules activatrices physiologiques

Dans la famille des récepteurs à 7 domaines TM, Smo présente la caractéristique remarquable d'être constitutivement actif et surtout régulé par une protéine à 12 domaines TM, Ptc ; pour revue, (*Rohatgi et al., 2007*). Une des hypothèses permettant d'expliquer le

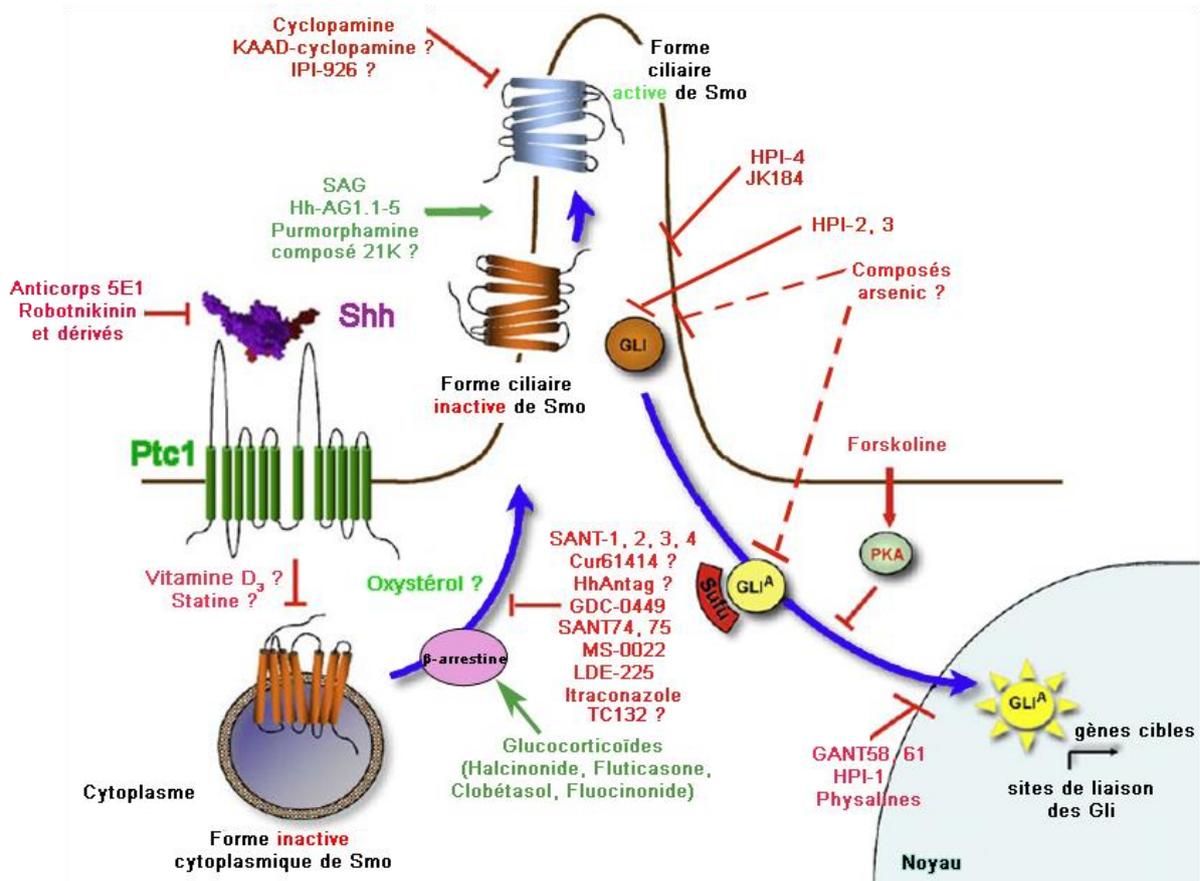


Figure 12 : Site d'action des principales molécules régulatrices de la signalisation Sonic Hedgehog dans le cil primaire.

Les molécules considérées comme des régulateurs positifs sont indiquées en vert, les composés inhibiteurs en rouge. Points d'interrogation ou tirets : mode d'action des composés pas encore clairement défini. D'après (*Mas and Ruiz i Altaba, 2010*).

mécanisme d'inhibition exercé par Ptc sur Smo serait qu'il pourrait réduire la quantité de ligand endogène disponible pour moduler l'activité de Smo. A l'heure actuelle, plusieurs modèles impliquant une régulation de la concentration en cholestérol cellulaire par le récepteur Ptc ont été proposés. En effet, l'homologie de séquence entre Ptc et la protéine NPC1 impliquée dans la liaison et le transport du cholestérol est à l'origine de ces hypothèses. Récemment, la liaison de Ptc au cholestérol a été mise en évidence grâce à des études de résonance des plasmons de surface et Ptc a été proposé réguler l'efflux de cholestérol cellulaire (*Bidet et al., 2011*), un mécanisme différent de la redirection subcellulaire des stocks de cholestérol initialement suggérée (**Figure 13**). Ce second modèle montre également que l'accumulation de cholestérol intracytoplasmique n'est pas corrélée avec l'activation de la signalisation Hh, mais induit cependant l'expression du récepteur Smo à la membrane. Ce résultat est parfaitement en accord avec l'hypothèse récemment émise par Rohatgi et collaborateurs, selon laquelle l'activation de la voie Hh nécessiterait une étape de relocalisation du récepteur Smo dans le cil primaire avant l'étape d'activation proprement dite (*Bidet et al., 2011*). L'identification du ligand naturel de Smo a très vite suscité beaucoup d'intérêt et le cholestérol et ses dérivés, les oxystérols ont rapidement été proposés comme régulateurs de l'activité de la voie Shh (*Cooper et al., 2003; Corcoran and Scott, 2006; Dwyer et al., 2007*). La déplétion cellulaire en stérols rend les cellules moins sensibles au ligand ShhN (*Cooper et al., 2003*). De plus, le cholestérol ainsi que les 20 α , le 22(S), le 24(S) et 25(S)-hydroxycholestérols sont capables d'activer la voie Shh contrairement au 7 β -hydroxycholestérol qui n'induit pas d'augmentation de l'activité de la β -galactosidase placée sous le contrôle du promoteur Ptc dans des cellules PZp53^{MED} (une lignée de cellules médulloblastiques; (*Corcoran and Scott, 2006*). En accord avec cette observation, les 20 α et 22(S)-hydroxycholestérols induisent une augmentation de l'expression des gènes cibles de la voie, Ptc et Gli1, dans des cellules M2-10B4 (une lignée murine de cellules pluripotentes stromales de la moelle osseuse ; (*Dwyer et al., 2007*). Cependant, le mécanisme d'action exact des oxystérols sur l'activation de la voie Shh n'est pas encore totalement élucidé. En effet, les 20 α et 22(S)-hydroxycholestérols ne sont pas capables d'inhiber la liaison du dérivé fluorescent de la cycloamine, le boron-dipyrométhène (BODIPY)-cycloamine (BC; (*Chen et al., 2002a*) dont la liaison au récepteur Smo a été démontrée. Ces deux oxystérols ne se lient donc pas directement au site de liaison de la BC sur le récepteur Smo comme l'indique également leur incapacité à déplacer la concentration efficace de l'antagoniste cycloamine requise pour bloquer l'activité intrinsèque de la signalisation Hh dans des cellules

fibroblastiques embryonnaires de souris (MEF) invalidées pour Ptc (*Dwyer et al., 2007*). S'il n'est pas encore prouvé que les oxystéroïdes se lient directement à Smo, ils pourraient, modifier indirectement sa conformation, le rendant ainsi moins sensible à l'inhibition exercée par Ptc (**Figure 13**).

1.1.2. Agonistes synthétiques

La molécule **SAG (Figure 14)** a été identifiée suite à un criblage de banques de molécules à haut débit (HTS pour High Throughput Screening) sur le modèle cellulaire Shh-light2 dans lequel l'activité d'un rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur Gli reflète le niveau d'activité de la voie Hh (*Frank-Kamenetsky et al., 2002; Taipale et al., 2000*). Dans ce modèle, SAG présente une concentration efficace à 50 % (CE₅₀) de 3 nM. L'utilisation d'une forme radiomarquée à l'¹²⁵I du dérivé photosensible du SAG (PA-SAG) ainsi que différentes formes tronquées du récepteur ont permis de mettre en évidence que le composé se lie directement sur Smo au niveau des domaines TM du récepteur. La molécule est également capable d'inhiber la liaison du ligand BC suggérant qu'elle se fixe au même site que l'antagoniste (*Chen et al., 2002b*). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de dérivés radiomarqués de la cyclopropamine et du SAG lui-même (*Rominger et al., 2009*). Tout comme le ligand Shh, SAG induit la translocation au cil primaire du récepteur Smo (*Rohatgi et al., 2009*). Cependant, ce composé agoniste présente une propriété particulière, puisqu'à des concentrations supérieures à 1 µM, il inhibe la voie Hh. Cette activité inattendue a été suggérée reliée soit à l'existence d'un effet cytotoxique à forte concentration (*Frank-Kamenetsky et al., 2002*), soit à l'interaction du SAG non seulement avec le récepteur mais aussi avec une molécule effectrice non identifiée mais nécessaire à la transduction du signal induite par ce ligand. Cet effet biphasique laisse donc penser que l'utilisation de SAG *in vivo* est vraisemblablement délicate. Cependant, dans un modèle d'explant de tube neural de poulet, des concentrations croissantes de la molécule (0,1 nM - 1 µM) miment de façon dose-dépendante l'effet de l'agoniste naturel, Shh, sur la différenciation des cellules du tube neural (*Frank-Kamenetsky et al., 2002*). Par ailleurs, administré *in vivo* par voie intracérébroventriculaire, SAG augmenterait la survie des neuroblastes nouvellement formés dans le gyrus denté de l'hippocampe suggérant ainsi un intérêt thérapeutique de la molécule jusqu'alors inexploré (*Bragina et al., 2010*).

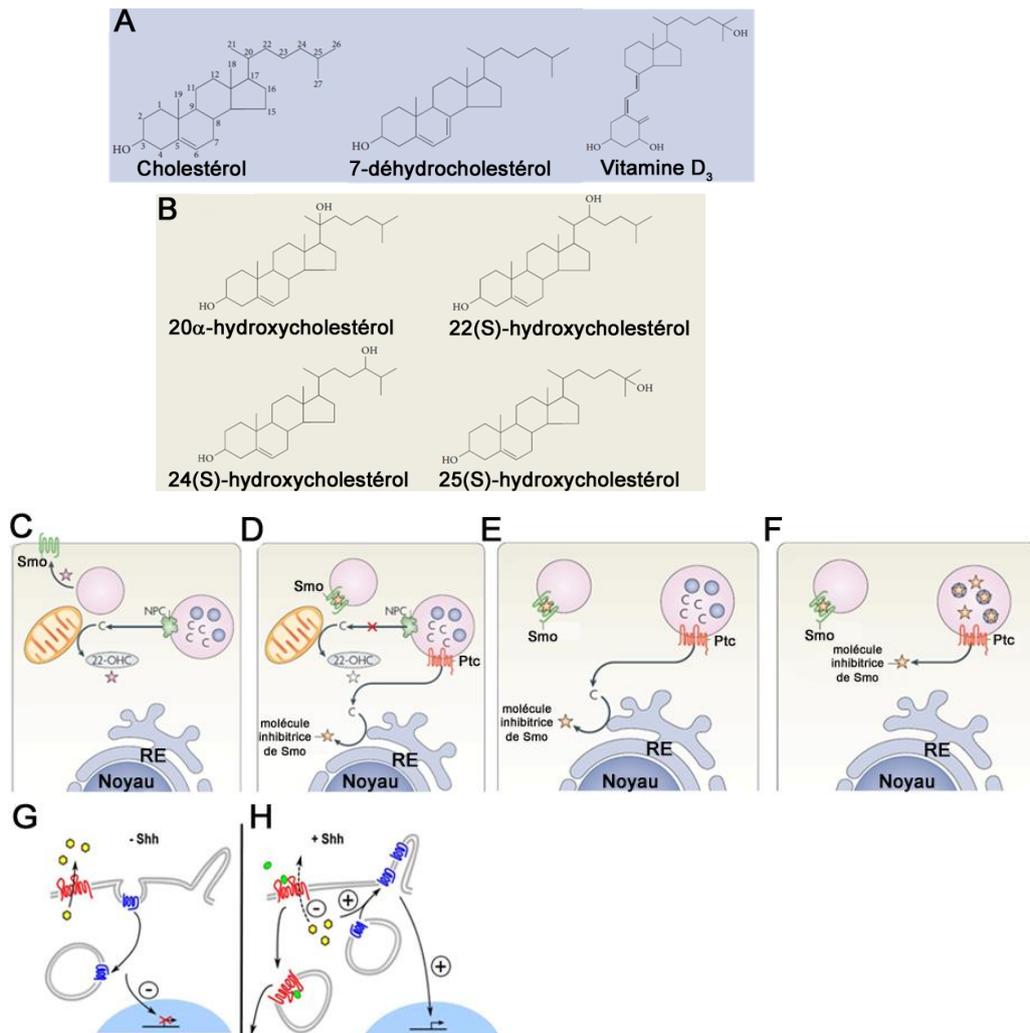


Figure 13 : Structures et mécanisme d'action des molécules dérivées du cholestérol capables d'activer ou d'inhiber la signalisation Hedgehog.

(A) Structures du cholestérol et de son dérivé le 7-déhydrocholestérol, le précurseur de la vitamine D₃. Les chiffres indiquent la position des différents atomes de carbone. (B) Structures des 4 oxystérols activateurs de Smoothened (Smo) également dérivés du cholestérol. (C-D) Modèle d'activation de Smo par les oxystérols cellulaires. Le cholestérol (sphère bleue) est transporté aux sites de synthèse des oxystérols tels que le 22(S)-hydroxycholestérol (22-OHC, étoile violette, C). Cette synthèse n'a lieu qu'en l'absence de Patched (Ptc). Lorsque Ptc est présent, le stock de cholestérol est redirigé vers un autre compartiment cellulaire réduisant la synthèse des oxystérols activateurs de la voie et favorisant la synthèse potentielle d'un inhibiteur de Smo (étoile jaune, D). (E-F) Modèles d'inhibition de l'activité constitutive de Smo par la vitamine D₃. Ptc régule la sécrétion du cholestérol au niveau de sites où des inhibiteurs de Smo sont synthétisés (étoile jaune, E). Ptc agit comme un transporteur et mobilise les molécules inhibitrices de Smo contenues dans des lipoprotéines. Une fois sécrétées, elles inhibent le récepteur Smo (F). (G-H) En l'absence de Shh, Ptc (rouge) est exprimé au niveau de la membrane plasmique et régule l'efflux de cholestérol (hexagone jaune) cellulaire. Smo (bleu) est inactif et retrouvé dans les endosomes cellulaires (G). Lorsque Shh (vert) se lie à Ptc, Ptc est internalisé et inhibe l'efflux de cholestérol. L'accumulation de cholestérol dans la cellule favorise l'expression de Smo dans le cil primaire (H). RE : réticulum endoplasmique. NPC : Niemann-Pick de type C. D'après (Eaton, 2008).

D'autres molécules appartenant à la même série chimique, **Hh-Ag1.1-Hh-Ag1.5 (Figure 14)** induisent une augmentation de l'activité Gli-luciférase et la transcription de Gli1 et Ptc dans des cellules Shh-Light2 (*Frank-Kamenetsky et al., 2002*). Parmi ces molécules, Hh-Ag1.5 est le composé présentant la meilleure affinité, 1000 fois supérieure à celle de Hh-Ag1.1. Les composés Hh-Ag1.2 et Hh-Ag1.3 (SAG) sont les moins toxiques. La molécule Hh-Ag1.1 (CE₅₀: 3 µM) est capable d'induire une augmentation de la prolifération des GCP et de moduler l'expression des facteurs de transcription normalement induits par Shh dans un modèle d'explant de tube neural de poulet. Ce composé entre en compétition avec la liaison de molécules antagonistes de Smo telles que la cyclopamine dans un modèle cellulaire exprimant le rapporteur Gli-luciférase. Enfin, son administration par voie orale engendre une augmentation de l'expression de la β-galactosidase dans des embryons Ptc^{lacZ/+} reflétant une activation endogène de la voie Shh. Hh-Ag1.1 peut aussi compenser les défauts de la ligne médiane observés chez des animaux Shh^{-/-} ou Smo^{-/-}. Suite à cette étude complète et prometteuse, seule une publication a rapporté l'utilisation *in vivo* d'un agoniste de Smo chez l'adulte (*Machold et al., 2003*). Des études de structure-activité ont permis la synthèse de dérivés de ces molécules possédant un noyau chlorobenzothiophéne et une structure biaryl (**Figure 14**). Le plus affiné d'entre eux présente une affinité subnanomolaire sur le test d'inhibition de la Gli-luciférase. Il a également été testé sur le plan pharmacocinétique et les résultats sont encourageants puisque la molécule semble passer la barrière hématoencéphalique (*Brunton et al., 2009*).

La **Purmorphamine (Figure 14)**, un dérivé purinergique découvert par HTS d'une banque de molécules hétérocycliques, est le second agoniste de référence du récepteur Smo. Ce composé induit la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes dans un test *in vitro* mettant en jeu différentes voies de signalisation dont la voie Shh (*Wu et al., 2002*). Cette molécule ostéogénique s'est ensuite révélée capable d'induire la transcription des gènes cibles de la voie Hh, Gli1 et Ptc, confirmant son rôle de molécule agoniste de cette signalisation (*Wu et al., 2004*). La Purmorphamine inhibe la liaison de la BC sur le récepteur Smo et perd totalement son effet activateur de la signalisation Hh sur des cellules MEF Smo^{-/-}, alors que cet effet est toujours présent sur des cellules MEF Ptc^{-/-} (CE₅₀: 1 µM ; (*Sinha and Chen, 2006*). Cependant, à l'heure actuelle aucune étude n'a rapporté un effet de ce composé sur la signalisation Shh *in vivo*.

Enfin, le criblage de molécules approuvées par la FDA (Food and Drug

Administration) et utilisées en clinique a permis d'identifier **4 glucocorticoïdes fluorés de synthèse (halcinonide, fluticasone, clobétasol et fluocinonide ; Figure 14)** comme des molécules agonistes de la voie Shh et plus particulièrement du récepteur Smo. Ces 4 composés sont capables de stabiliser la β -arrestine favorisant donc l'internalisation de Smo, mais aussi d'induire l'activité Gli-luciférase (CE_{50} : 0,2 - 1,8 nM) et la prolifération des GCP, et de potentialiser l'effet prolifératif de Shh sur ces cellules. Cependant, ils n'inhibent que partiellement la liaison de la BC sur le récepteur Smo suggérant que les sites d'interaction de ces molécules et de la BC ne sont vraisemblablement pas identiques (*Wang et al., 2010*). Il conviendrait donc de mieux caractériser leur mécanisme d'action sur la signalisation Hh pour envisager ensuite leur utilisation comme régulateur positif de la voie Hh.

Le faible nombre de molécules agonistes développées et surtout leur indisponibilité en clinique montrent l'intérêt d'identifier de nouvelles séries de molécules douées de propriétés agonistes de la signalisation Hh qui non seulement serviront d'outils pharmacologiques pour disséquer les rôles et mécanismes de la voie Hh, mais pourront aussi constituer de nouvelles approches thérapeutiques potentielles de pathologies où l'activation du signal Hh serait bénéfique.

1.2. Antagonistes

Le développement de molécules inhibitrices de la signalisation Hh a suscité beaucoup plus d'intérêt que celui des molécules agonistes. Pour cette raison, de nombreux antagonistes ont émergé au cours des 7 dernières années. Ils constituent une nouvelle approche thérapeutique des cancers associés à la dérégulation de la voie Hh et la majorité ont pour cible le récepteur Smo (**Figures 12 et tableau 3**).

1.2.1. Antagonistes d'origine naturelle

- ❖ **Cyclopamine** (11-déoxojervine) et **Jervine** (**Figure 15**) sont des alcaloïdes naturels extraits du vérâtre (*Veratrum Californicum*). Ce sont les premières molécules antagonistes de la voie qui ont été décrites. Leur découverte vient de l'observation faite par des fermiers américains qui, dans les années 50, avaient remarqué que les veaux nés d'une mère ayant ingéré cette plante présentaient des défauts sévères du développement du crâne et de la tête

associés parfois à une cyclopie. La cyclopamine et la jervine, possèdent des propriétés tératogènes rappelant le syndrome SLOS chez l'humain. Pour cette raison et parce que leur structure était proche de celle du cholestérol, ces alcaloïdes ont d'abord été considérés comme des inhibiteurs de la biosynthèse du cholestérol (pour revue, (Heretsch et al., 2010), mais en 1998, les travaux de P. Beachy ont permis de démontrer que la cyclopamine est un inhibiteur de la signalisation Hh (Cooper et al., 1998; Incardona et al., 1998). En effet, elle induit l'expression de marqueurs dorsaux (Pax7) et réprime celle de marqueurs ventraux (Isl1 et HNF3 β) dans des explants de tube neural de poulet, des effets opposés à ceux de Shh dans ce modèle. L'interaction directe entre la cyclopamine et le récepteur Smo a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation d'un dérivé de photo-affinité de la cyclopamine (PA-cyclopamine) et de cellules transfectées par la forme humaine du récepteur Smo (Chen et al., 2002a). L'utilisation du dérivé fluorescent de la cyclopamine, la BC, a permis de montrer que la molécule se lie spécifiquement au niveau des domaines TM du récepteur Smo, mais son affinité pour Smo reste faible (0,3 μ M ; (Chen et al., 2002a). Cependant, l'affinité du dérivé fluorescent BC est de 5 nM comme l'a montré les expériences de liaison du dérivé sur la forme humaine du récepteur exprimée dans les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Nehmé et al., 2010). Sur le plan mécanistique, la cyclopamine empêcherait la conversion de la forme inactive du récepteur en sa forme active (Taipale et al., 2000; Zhao et al., 2007). Comparée aux autres antagonistes de Smo que nous allons décrire, la cyclopamine est la seule à induire la translocation du récepteur Smo dans le cil primaire des cellules de mammifères (Rohatgi et al., 2009; Wang et al., 2009). Etant le premier antagoniste de Smo à avoir été caractérisé, la cyclopamine a été largement utilisée *in vivo*. De nombreuses études ont rapporté son effet inhibiteur sur divers modèles de tumeurs du SNC (Berman et al., 2002; Clement et al., 2007; Romer et al., 2004), de la prostate (Karhadkar et al., 2004), du colon (Varnat et al., 2009) ou de la peau (Stecca et al., 2007). Pourtant, la spécificité de ses effets a été largement remise en question et des effets « hors cibles » ont été suggérés dans certains modèles de tumeurs (Yauch et al., 2008; Zhang et al., 2009); pour revue, (Scales and de Sauvage, 2009). De plus, une analyse chromatographique du plasma de souris traitées par la cyclopamine a révélé en milieu acide, sa conversion en 2 isoformes (cyclopamine (S) et cyclopamine (X)) inactives sur Smo (Wilson et al., 2010). La faible affinité et la faible solubilité de la cyclopamine, la difficulté de son extraction, de sa purification ou de sa synthèse, ainsi que les résultats très controversés concernant son activité *in vivo* ont incité plusieurs équipes à identifier des molécules dérivées de la structure de la cyclopamine, mais de meilleure affinité, plus stables

et plus solubles. La synthèse de la cyclopamine et de ses dérivés n'a été réalisée que très récemment (*Heretsch et al., 2009*) et son étude combinée à des études computationnelles, a permis la synthèse d'un dérivé plus puissant et plus stable, l'exo-cyclopamine (*Heretsch et al., 2011*). Récemment, la synthèse d'un substitut de la cyclopamine, le desmethylveramiline vient également d'être rapportée. L'activité *in vitro* du composé sur la signalisation Hh est comparable à celle de la cyclopamine (*Guerlet et al., 2011*).

❖ La **KAAD-cyclopamine (Figure 15)** est un composé semi-synthétique dérivé de la cyclopamine qui présente une affinité 10 à 20 fois meilleure que celle de la cyclopamine avec une CI_{50} de 20 nM sur le test mettant en jeu l'activité du rapporteur Gli-luciférase. Le dérivé présente également des effets cytotoxiques plus faibles (*Taipale et al., 2000*). Cependant, aucun résultat *in vivo* n'a été rapporté jusqu'à aujourd'hui avec ce composé.

❖ Les dérivés **IPI-269609 et IPI-926 (Figure 15)** ont été développés par le laboratoire Infinity afin de répondre à l'instabilité en milieu acide et à la faible solubilité en milieu aqueux de la cyclopamine (*Tremblay et al., 2008*). Ils présentent une modification du cycle D initialement instable en milieu acide, ainsi que l'addition d'une cétone ou d'un groupement sulfonamide sur le cycle A qui accroît la solubilité. IPI-269609 a été utilisé *in vitro* et *in vivo* pour bloquer la signalisation Shh. Le composé inhibe l'expression du rapporteur Gli-luciférase, diminue l'expression des gènes cibles Ptc et Gli1 et empêche la migration cellulaire préalablement induite par Shh. De plus, il est efficace dans un modèle de xénogreffes de tumeurs pancréatiques humaines et empêche le développement des métastases (*Feldmann et al., 2008*). Des études de relations structure-activité ont permis d'améliorer encore l'affinité de ce composé ainsi que sa solubilité et de conduire à IPI-926, une sulfonamide ayant une affinité de 5 nM pour la voie Shh (*Tremblay et al., 2009*). Ce composé présente une meilleure stabilité métabolique et il induit une régression complète du développement de la tumeur dans un modèle d'allogreffes de MB après traitement des animaux par voie orale. Utilisé dans un modèle de cancer pancréatique hautement invasif et létal, IPI-926 augmente la survie des animaux en bloquant la signalisation Shh dans le stroma environnant les cellules tumorales. Cet effet est retrouvé lorsque le composé est administré de manière combinée à la gemcitabine dans un modèle animal de tumeur résistante à ce produit. IPI-926 favoriserait également la néovascularisation de la tumeur facilitant ainsi la distribution de la gemcitabine aux cellules tumorales (*Olive et al., 2009*). A l'heure actuelle,

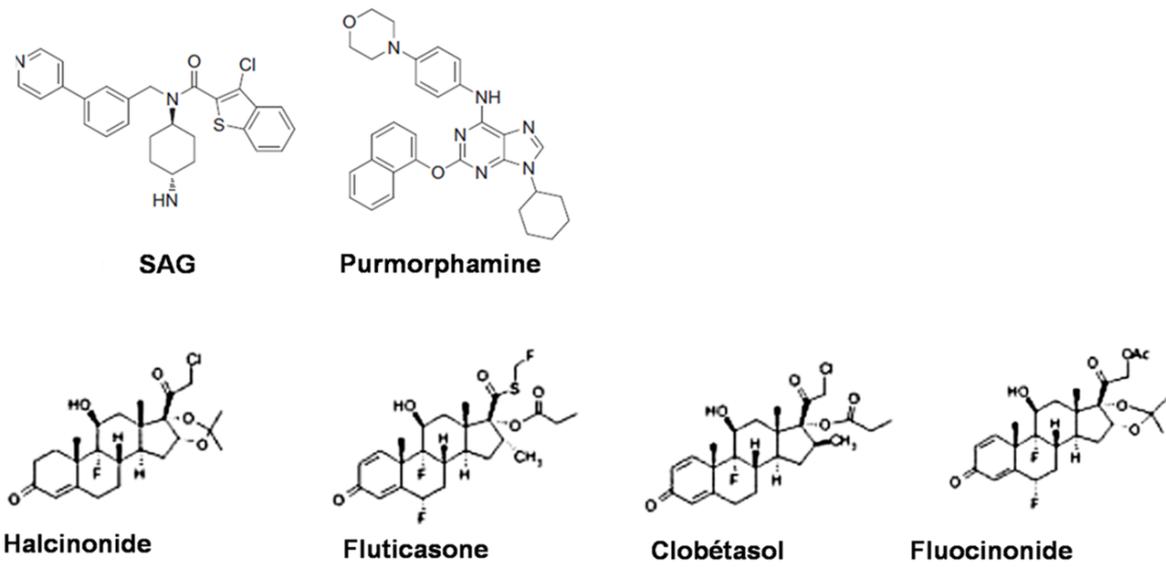


Figure 14 : Structures chimiques des principaux agonistes synthétiques de Smoothened.

Structures obtenues d'après (Brunton *et al.*, 2009; Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002; Heretsch *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010).

IPI-926 est testé dans des essais cliniques de phase 1/2 destinés au traitement de tumeurs solides (**Tableau 3** et pour revue, (*Low and de Sauvage, 2010*).

1.2.2. Régulateur physiologique

La **vitamine-D₃** est une hormone stéroïde impliquée dans la maintenance de l'homéostasie calcique ainsi que dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaire de nombreux tissus ; pour revue, (*Eaton, 2008*). Elle dérive du 7-déhydrocholestérol qui est un précurseur du cholestérol. Ce précurseur est retrouvé de manière abondante dans la peau et sera converti en vitamine D₃ suite à une exposition aux UV chez les mammifères. Bijlsma et collaborateurs ont proposé un rôle surprenant de la vitamine D₃ sur la voie Shh. Dans le milieu de culture de cellules transfectées avec des quantités croissantes d'ADN Ptc, des concentrations croissantes de 3β-hydroxystéroïde (précurseur de la vitamine D₃) ont été détectées suggérant un lien entre le récepteur et le stéroïde. De plus, la vitamine D₃ est un inhibiteur efficace de l'activation du rapporteur Gli-luciférase dans des cellules murines C3H10T1/2 ou MEF Ptc^{-/-}. L'utilisation de vitamine D₃ radiomarquée a permis de mettre en évidence sa fixation au même site que la cyclopamine sur le récepteur Smo humain exprimé dans une lignée de levure. Par ailleurs, le traitement d'embryons de poisson-zèbre avec le précurseur de la vitamine D₃ induit un phénotype similaire à celui observé chez des animaux Smo^{-/-} (*Bijlsma et al., 2006*). L'ensemble de ces données nécessite d'être confirmée dans d'autres systèmes (**Figure 13**). De façon intéressante, la vitamine D₃ inhibe la croissance de nombreuses tumeurs dans lesquelles la voie Hh est active *in vitro*, mais aussi *in vivo* comme observé dans un modèle d'adénocarcinome pancréatique (*Bruggemann et al., 2010*). De même, la vitamine D₃ réduit le niveau d'expression de Gli1 et la prolifération de cellules issues de BCC *in vitro* et *in vivo*. Son administration topique dans un modèle murin de BCC diminue également le nombre de cellules en prolifération. Ces résultats ont ainsi permis de suggérer que la vitamine D₃ pourrait être une approche thérapeutique potentielle des BCC (*Tang et al., 2011a*).

1.2.3. Antagonistes de synthèse

La majorité des antagonistes de la voie décrits à ce jour sont des molécules de synthèse dont la cible est le récepteur Smo (**Figures 12**; pour revues, (*Heretsch et al., 2010*;

Mas and Ruiz i Altaba, 2010; Peukert and Miller-Moslin, 2010; Stanton et al., 2009; Tremblay et al., 2010).

La première petite molécule de synthèse inhibitrice de la voie Shh a été décrite par le laboratoire Curis en 2003 (**Figure 16**). Le **Cur61414**, une amiproline issue d'un HTS d'une banque de plus de 100 000 molécules organiques, est 5 fois plus efficace que la Jervine pour inhiber la signalisation Hh (CI₅₀ : 100 nM). Il a été utilisé dans plusieurs modèles *in vitro* de BCC inhibant la prolifération et induisant l'apoptose des cellules issues de souris Ptc hétérozygotes (*Williams et al., 2003*). Des essais cliniques de phases 1/2 ont alors été mis en place pour le traitement topique de BCC humains, puis très rapidement arrêtés devant l'absence d'efficacité clinique et l'incapacité du produit à diminuer le niveau d'expression de Gli1 dans les tissus atteints. Les résultats d'une étude récente comparant l'effet d'une formulation topique de Cur61414 dans un modèle murin de BCC et dans des essais cliniques de phase 1 chez des patients atteints de BCC nodulaires ou superficiels confirment cette observation. Dans le modèle murin, Cur61414 diminue les niveaux d'expression des gènes cibles de la voie, le volume tumoral et la prolifération des cellules du BCC contrairement à ce qui est observé chez les patients (*Tang et al., 2011b*). Cette différence d'efficacité du composé est proposée être liée à une moins bonne pénétration de la molécule par voie topique chez l'Homme que chez l'animal ainsi qu'à une clairance plus rapide.

Le laboratoire Curis, en collaboration avec une équipe de St Jude's Children's Research Hospital, a développé une autre molécule efficace *in vivo*, l'antagoniste **HhAntag691** (ou HhAntag ; **Figure 16**), un inhibiteur puissant de la signalisation Hh, capable d'empêcher la croissance des MB dans un modèle murin Ptc^{+/-}p53^{-/-} après son administration orale quotidienne (*Romer et al., 2004*). Ces résultats seront remis en question quelques années plus tard par l'étude de Yauch et collaborateurs montrant que les effets de la cyclopatamine et de cet antagoniste seraient des effets non spécifiques (*Yauch et al., 2008*).

- ❖ **Molécules testées en cliniques** : Une série de molécules benzimidazoles à laquelle appartient le composé HhAntag a été optimisée grâce à des études de structure-activité et a conduit à la 2-pyridyl amide appelée **GDC-0449** (Vismodegib ; **Figure 16**). C'est à ce jour, l'antagoniste de Smo le plus avancé dans les essais cliniques (*Robarge et al., 2009*). *In vitro*, ce composé soluble et stable inhibe à très haute affinité l'activité Gli-luciférase induite par la protéine Shh dans la lignée Shh-Light2 (CI₅₀ : 13 nM). Sur des lignées cellulaires d'adénocarcinomes du

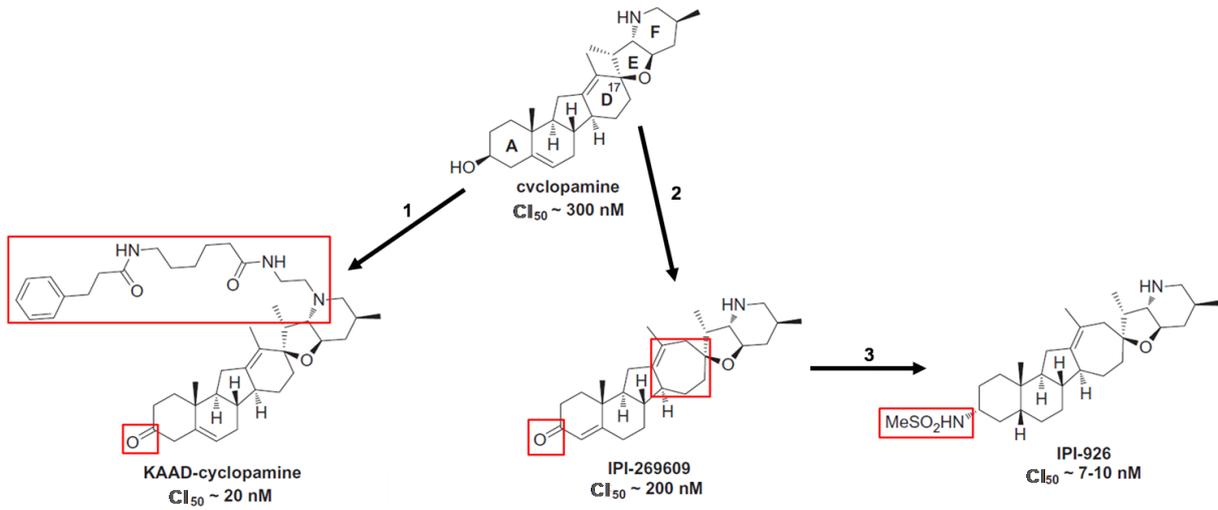


Figure 15 : Structures et affinités de la cyclopamine et de ses dérivés.

La cyclopamine est constituée de 5 cycles notés de A à F. L'addition d'une cétone en position 3 et d'un groupement N-aminoéthyl-aminocaproyl-dihydrocinnamoyl sur la cyclopamine (cadres rouges) conduit à la KAAD-cyclopamine (1). La dérivation du cycle D de la cyclopamine et l'addition d'une cétone en position 3 (cadres rouges) conduit au composé IPI-269609 (2). La modification de la chaîne latérale du cycle A de l'IPI-269609 (cadre rouge) conduit au composé IPI-926 (3). D'après (*Heretsch et al., 2010*).

poumon, il induit une réduction spécifique de la prolifération des CSC à l'origine de l'expansion de la tumeur, mais épargne les cellules non-souches qui n'expriment pas le récepteur Smo (*Tian et al., 2011*). L'administration orale quotidienne d'une faible dose (12,5 mg/kg) de GDC-0449 dans un modèle murin d'allogreffes de MB issus de souris *Ptc^{+/-}*, aboutit à une réduction complète de la masse tumorale. La gamme des doses utilisables chez l'animal est très étroite, car de très faibles variations peuvent conduire à d'importants changements de l'activité antitumorale du composé dans des modèles de tumeurs dépendant ou non du ligand (*Wong et al., 2011*).

Le GDC-0449 a rapidement progressé dans les essais cliniques. Sa caractérisation pharmacocinétique chez l'Homme a révélé que la molécule se lie fortement aux protéines plasmatiques et que sa demi-vie est près de 200 fois supérieure à celle observée chez le rat (*Giannetti et al., 2011*). Des résultats très encourageants ont été obtenus dans des cas de BCC localisés ou métastatiques (*Von Hoff et al., 2009*). Chez 33 patients recevant une dose orale journalière de 150 à 540 mg de GDC-0449 pendant près de 10 mois, 2 rémissions complètes, 16 réponses partielles et 11 absences d'évolution de la maladie ont été observées. Aucun effet toxique directement lié à l'administration du produit n'a été rapporté. Depuis cette étude, le traitement d'un patient atteint d'une forme de BCC présentant de nombreux kystes odontogéniques dans la mâchoire avec risque d'atteinte osseuse, s'est montré particulièrement efficace et a permis au patient d'éviter la résection chirurgicale (*Goldberg et al., 2011*).

L'administration orale du composé chez un patient atteint d'une forme métastatique de MB résistant aux traitements classiques a tout d'abord conduit à une rapide régression de la tumeur et à une importante diminution des symptômes. Cependant, après 3 mois de traitement, le patient a rechuté et est finalement décédé (*Rudin et al., 2009*). Dans le tissu tumoral de ce patient, une mutation ponctuelle a été détectée sur le récepteur Smo (Smo-D473H ; (*Yauch et al., 2009*). Le composé est actuellement en phase 2 dans des essais cliniques incluant notamment des patients atteints de formes inopérables de BCC (métastatiques ou très avancées), de cancers colorectaux et ovariens (**Tableau 3**). Une seconde génération de composés 2-pyridyl biphényl amide a été synthétisée. Ces composés analogues au GDC-0449 présentent des groupements polaires en position para sur le cycle amide qui optimisent leur efficacité et améliorent leurs paramètres pharmacocinétiques chez le rat. Deux de ces nouveaux composés sont plus efficaces que GDC-0449 pour inhiber le développement des tumeurs dans un modèle murin d'allogreffes de MB. Cependant, comme

GDC-0449, ces composés perdent leur activité de manière significative ou complète sur le récepteur Smo présentant la mutation ponctuelle Smo-D473H (*Castanedo et al., 2010*).

La molécule **LDE-225** développée par la société Novartis est également incluse dans des essais cliniques à l'heure actuelle (**Figure 16** et **Tableau 3**). Il s'agit d'un composé de type pyridine-biphényl-carboxamide dérivé de la classe des phtalazines qui présente une affinité de l'ordre du nanomolaire pour inhiber l'activité du rapporteur Gli-luciférase et la liaison du ligand BC sur les récepteurs Smo humain et murin (CI₅₀ : 8 nM). La sélectivité du composé a été testée sur un large panel de récepteurs, canaux ioniques, transporteurs, kinases et protéases ce qui a permis de conclure à une bonne sélectivité de la drogue. Il présente une bonne biodisponibilité et une faible clairance chez le rat, le chat, le chien et l'Homme. LDE-225 réduit le développement de la tumeur dans un modèle d'allogreffes de MB murin lorsqu'il est administré par voie orale (40 mg/kg/jour), diminue les taux d'expression du gène Gli1 dans la tumeur permettant de relier l'effet du composé sur la croissance tumorale à son action *in vitro* sur la signalisation Shh (*Pan S, 2010*). LDE-225 inhibe la formation de tumeur ou induit une régression tumorale importante dans des cultures d'échantillons de peau issus d'animaux Ptc^{+/-} (*Skvara et al., 2011*). L'ensemble de ces propriétés fait du LDE-225 un candidat potentiel pour le traitement de cancers Hh-dépendants et il est actuellement inclus dans des essais cliniques pour le traitement de tumeurs solides avancées et pour des BCC chez des patients atteints du syndrome de Gorlin ; pour revue, (*Peukert and Miller-Moslin, 2010*). L'analyse en double aveugle de plusieurs patients présentant des BCC traités localement par deux applications quotidiennes de LDE-225 révèle que le traitement est bien toléré et efficace puisque sur 13 BCC traités, 3 ont été totalement éradiqués, 9 partiellement éradiqués et seulement 1 n'a pas répondu au traitement (*Skvara et al., 2011*).

❖ **SANT et dérivés** : sous cette dénomination, les premiers composés **SANT-1, 2, 3 et 4** sont issus du criblage d'une banque de plus de 10 000 petites molécules en utilisant le test cellulaire basé sur le rapporteur Gli-luciférase. Ces 4 composés présentent des CI₅₀ comprises entre 20 et 200 nM (*Chen et al., 2002b*) ; **Figure 16**). Ces molécules se fixent au site de liaison de la BC sur le récepteur Smo puisqu'elles inhibent la liaison du ligand fluorescent. Cependant, leur mécanisme d'action diffère, notamment SANT-1 et 3 n'inhibent cette liaison que partiellement. De même SANT-3 ne bloque que partiellement l'activité constitutive du mutant oncogénique SmoA1. Contrairement à la cyclopamine, SANT-1 et 2 bloquent l'activité du récepteur Smo en empêchant sa translocation au cil primaire (*Rohatgi et al.,*

2009). Les antagonistes SANT-1 et 2 inhibent de façon allostérique la liaison du radioligand [³H]SAG1-3, mais de façon compétitive celle du radioligand [³H]cyclopamine suggérant donc des spécificités d'interaction de ces 2 composés avec Smo. Le déplacement compétitif de la [³H]cyclopamine par SANT-1 ne reflète pas le déplacement partiel observé précédemment pour la BC suggérant de potentielles différences d'interaction de la [³H]cyclopamine et de la BC avec Smo (Rominger *et al.*, 2009). Les composés SANT n'ont été utilisés que dans un nombre limité de modèles animaux *in vivo*. SANT-1 contrairement à SANT-2 s'est ainsi montré efficace pour empêcher le développement pileux chez la souris (Li *et al.*, 2010). Le remplacement de la fonction hydrazone du SANT-1 par une amine a conduit à une série d'aminométhylpyrazoles présentant des affinités comprises entre 100 et 200 nM pour le récepteur Smo. Ces dérivés de SANT-1 sont également capables d'inhiber le développement pileux de manière comparable au composé de référence utilisé pour les pathologies liées à un dérèglement de la pilosité, l'eflornithine. Par ailleurs, aucun effet n'a été obtenu *in vivo* en utilisant un dérivé de SANT-2 (**TC-132**) dans un modèle d'induction d'une cyclopie chez des embryons de médaka (Buttner *et al.*, 2009)).

❖ **Dérivés du composé SAG** : Malgré leur dénomination, **SANT-74** et **SANT-75** ne sont pas dérivés de l'une des molécules SANT décrites ci-dessus. Ce sont des dérivés de l'agoniste SAG dont le groupement aminométhyl a été remplacé par un groupement aminopropyl. Ils sont issus du criblage d'une banque de 61 molécules analogues au SAG à l'aide d'un modèle *in vivo* d'embryon de poisson-zèbre Gli:GFP. Dans ce modèle, basé sur des mesures de FRET, SANT-74 et SANT-75 ont des CI₅₀ respectives de 70 et 20 nM. Ils empêchent la conversion de la forme inactive du récepteur Smo en sa forme active et induisent les défauts développementaux caractéristiques d'un blocage de la voie Shh (Yang *et al.*, 2009) ; **Figure 16**).

❖ **Les phtalazines** : Les laboratoires Novartis ont développé une famille d'antagonistes de nature aminobenzylphtalazine issue d'un HTS, puis optimisée par des études de structure-activité conduisant à la découverte d'un composé présentant une affinité de l'ordre du nanomolaire pour le récepteur Smo, une bonne biodisponibilité et la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique chez la souris. Le traitement d'un modèle murin de MB par cet antagoniste révèle une diminution dose-dépendante de la masse tumorale (Miller-Moslin *et al.*, 2009). Le laboratoire AMGEN a également développé une série de phtalazines efficaces

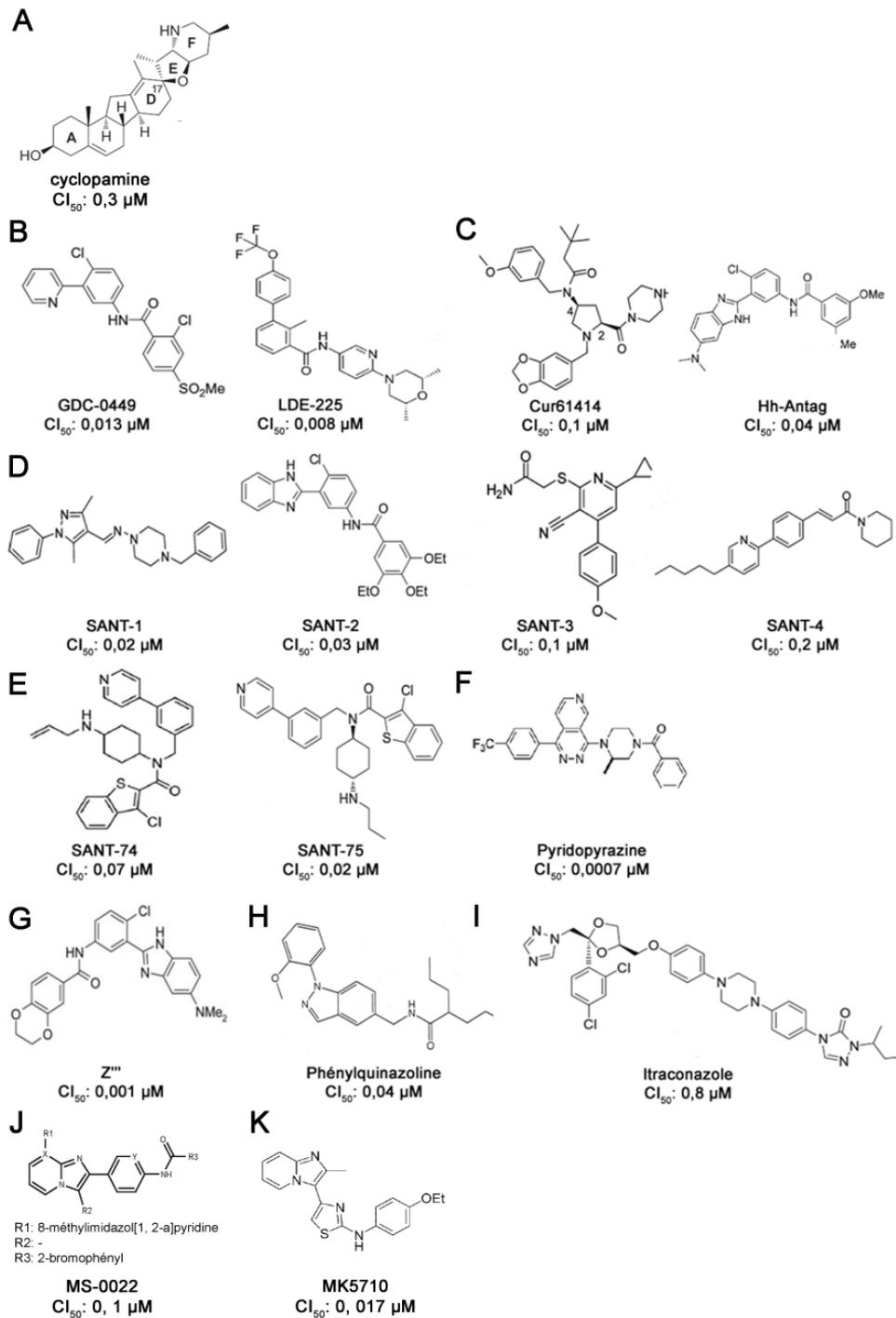


Figure 16 : Structures et activités des principaux antagonistes de synthèse de Smoothed.

(A) cyclopamine, (B) molécules utilisées en clinique, (C) composés développés par les laboratoires Curis efficaces *in vivo*, (D) composés SANT, (E) dérivés de la structure SAG, (F) phtalazines, (G) Z''''', (H) phénylquinazoline M25, (I) itraconazole, (J) MS-0022, (K) MK5710. D'après (Borzillo and Lippa, 2005; Brunton et al., 2008; Buttner et al., 2009; Castanedo et al., 2010; Dessole et al., 2009; Heretsch et al., 2010; Kaizerman et al., 2010; Lucas et al., 2010; Mahindroo et al., 2009; Malancona et al., 2011; Miller-Moslin et al., 2009; Peukert and Miller-Moslin, 2010; Strand et al., 2011).

sur les récepteurs Smo murin ou humain avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. Le composé le plus puissant et biodisponible par voie orale est pourvu d'une activité inhibitrice sur un modèle murin de MB (*Lucas et al., 2010*). L'optimisation structurale de cette série de composé par la modification des phtalazines et pyridopyrazidines (**Figure 16**) a permis d'améliorer fortement le profil pharmacocinétique de ces molécules (*Kaizerman et al., 2010*).

❖ **Autres molécules** : De nombreuses autres petites molécules de structures chimiques variées ont été rapportées comme étant de puissants inhibiteurs de la signalisation Hh *in vitro* comme le composé carboxamide **Z''''**, longtemps considéré comme un antagoniste de référence ; pour revue, (*Borzillo and Lippa, 2005*). Les laboratoires Novartis ont aussi proposé une collection de composés **ortho-biphényl-carboxamide** présentant des affinités de l'ordre du nanomolaire pour bloquer à la fois les récepteurs Smo humain et murin (*Peukert et al., 2009*). Les laboratoires Curis ont décrit une nouvelle famille de petites molécules antagonistes de la voie Hh de type **phénylquinazoline urée** dont le meilleur composé présente une affinité de 70 nM pour l'inhibition de l'activité du rapporteur Gli-luciférase (**Figure 16**; (*Brunton et al., 2008*). Par ailleurs, des molécules de type **aryl-indazol-méthylamide** sont également de bons antagonistes de Smo (*Dessole et al., 2009*). Avec une affinité également de l'ordre du nanomolaire et leur capacité à réduire la croissance de MB dans des modèles murins, ces composés semblent également intéressants à des fins thérapeutiques.

Une des molécules les plus récemment publiées à ce jour associe une activité inhibitrice sur Smo et sur un régulateur en aval dans la cascade de signalisation. La structure du **MS-0022** présente un noyau phényl-amide-phényl (**Figure 16**) commun à plusieurs antagonistes de Smo tels que GDC-0449, SANT-2 ou HhAntag. Ce composé bloque l'activité Gli-luciférase induite par Shh sur les cellules Shh-light2 avec une affinité de 100 nM, inhibe la liaison de la BC indiquant son interaction avec le récepteur Smo et empêche la translocation de Smo au cil primaire comme le font les composés GDC-0449 ou SANT-1. De plus, l'utilisation de cellules MEF Sufu^{-/-} a permis de montrer que, contrairement au GDC-0449 ou à la cyclopamine, le composé peut également bloquer l'activité Gli-luciférase dans ces cellules suggérant un rôle en aval du régulateur négatif Sufu. Il inhibe la croissance de plusieurs lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de xénogreffes dans lequel il réduit significativement l'expression de Gli1 dans les cellules stromales entourant la tumeur. Sa double activité sur Smo et une cible à identifier en aval du récepteur, en fait une molécule originale pour le traitement de cancers Hh-dépendants (*Strand et al., 2011*).

Enfin, très récemment, les laboratoires Merck ont rapporté une nouvelle classe d'antagonistes de Smo, présentant un noyau pirazine. La molécule la plus puissante de cette série, **MK-5710 (Figure 16)**, inhibe la signalisation Hh dans le test utilisant le rapporteur Gli-luciférase avec une affinité de 17 nM (*Malancona et al., 2011*). Ce composé inhibe également la liaison de la BC sur le récepteur Smo humain avec une affinité de 13 nM. Chez le rat, le composé présente une forte biodisponibilité et une faible clairance. Il inhibe le développement de tumeurs dans un modèle d'allogreffes de MB chez la souris lorsqu'il est administré par voie orale à raison de 40 à 160 mg/kg/jour. Sa sélectivité a été analysée à la concentration de 10 µM sur un panel de 150 enzymes et récepteurs (*Kinzel et al., 2011*).

❖ **Molécules approuvées par la FDA** : Le criblage d'une vaste banque de molécules approuvées par la FDA ou ayant atteint la phase 1 des essais cliniques, a permis de montrer que l'**itraconazole**, une petite molécule normalement utilisée comme antifongique et dont la structure comporte un noyau triazolé, est capable d'inhiber la signalisation Hh avec une CI_{50} de 800 nM sur le test mettant en jeu le rapporteur Gli-luciférase (*Kim et al., 2010c*) ; **Figure 16**. L'utilisation de cellules délétées pour le gène *Ptc* révèle que l'itraconazole agit en aval de *Ptc*. Le composé est connu pour être un inhibiteur d'une enzyme impliquée dans la biosynthèse du cholestérol. Des antifongiques de la même série chimique que l'itraconazole et possédant aussi cette activité inhibitrice de la biosynthèse du cholestérol se sont révélés incapables de bloquer la voie Hh. Cette observation a permis d'exclure que l'effet observé sur la signalisation Hh est la conséquence du blocage de la synthèse des stérols. La capacité du composé à bloquer l'activité de la voie Hh induite par la surexpression du récepteur Smo et son incapacité à inhiber une réponse induite par le mutant oncogénique SmoA1 suggèrent que la molécule se comporte comme un agoniste inverse. Comme le composé SANT-2, l'itraconazole empêche l'accumulation du récepteur Smo dans le cil primaire. Le composé réduit significativement le développement de BCC dans un modèle murin. L'ensemble de ces résultats suggère que ce composé mériterait d'être testé en clinique seul ou en association avec d'autres thérapies anticancéreuses chez des patients atteints de tumeurs Hh-dépendantes.

2. Pharmacologie des autres composantes de la voie Hh

Bien que la première cible pour le développement de molécules régulatrices de la voie Hh ait été le récepteur Smo, d'autres études ont permis de développer des molécules bloquant

le ligand Shh lui-même, le récepteur Ptc ou bien les facteurs de transcription Gli. Cependant, à l'heure actuelle, l'étude de ces molécules est encore au stade préclinique ; pour revue, (*Heretsch et al., 2010*); **Figures 12**).

2.1. Cibles pharmacologiques en amont de Smo

Le blocage de la signalisation Hh en amont de Smo peut être obtenu par le blocage du ligand Shh. Un anticorps murin spécifiquement dirigé contre la protéine ShhN et appelé **5E1** s'est très tôt révélé être un très bon outil pharmacologique (*Ericson et al., 1996; Frank-Kamenetsky et al., 2002*). Cet anticorps présente, *in vivo* sur des modèles de tumeurs dépendant du ligand, une activité qui peut être comparée à celle induite par les antagonistes de Smo (*Yauch et al., 2008*). Des études biochimiques, biophysiques et une analyse cristallographique d'un anticorps chimère murin:humain 5E1 a révélé que l'anticorps se fixe au niveau d'un site pseudo-actif de Shh qui se superpose en partie avec le site de liaison de l'antagoniste naturel de Shh, la protéine Hhip (*Maun et al., 2010*).

Par ailleurs, une banque de 10 000 petites molécules naturelles ou synthétiques a été criblée en vue de détecter des molécules susceptibles d'interagir avec le ligand Shh. Un macrocycle, la **Robotnikinin**, a été identifié (**Figure 17**). Sa liaison au ligand Shh a d'abord été démontrée par mesure de la résonance des plasmons de surface. Cette molécule est capable de bloquer la signalisation Shh dans des lignées cellulaires, des cultures primaires de kératinocytes humains et un modèle synthétique de peau humaine. Son activité reste modérée mais elle ne présente aucune cytotoxicité dans les tests utilisés (*Stanton et al., 2009*). Dans cette série chimique, des molécules analogues ont été développées sans pour autant accroître l'activité biologique qui demeure de l'ordre du micromolaire et limite pour le moment l'intérêt thérapeutique de cette famille de molécules (*Peng et al., 2009*).

Comme nous l'avons précédemment mentionné, la biosynthèse du cholestérol est intimement liée à la régulation de la voie Shh en raison de son rôle indispensable à différentes étapes clef de cette signalisation ; pour revue, (*Eaton, 2008*). C'est pourquoi les **statines**, de petites molécules inhibitrices de la réductase responsable de la conversion du 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA en mévalonate (l'étape limitante de la biosynthèse du cholestérol), sont considérées comme des molécules susceptibles de réguler négativement la voie Hh en favorisant l'effet inhibiteur de Ptc sur Smo (*Cooper et al., 2003*). Par ailleurs, une molécule

Composé	Source	Nombre d'essais clinique	Tumeurs ciblées	Type d'essai clinique
GDC-0449	Genentech	28	BCC avancé SNBC Sein CCR Gastrique GBM MB Ovariennne Pancréatique SCLC	I/II
LDE-225	Novartis	5	Tumeurs solides BCC SNBC	I/II
BMS-833923 (XL139)	BMS/Exelixis	5	Tumeurs solides Gastrique Myélome SCLC	I/II
IPI-926	Infinity Pharm	2	Tumeurs solides	I/II
PF-04449913	Pfizer	2	LMC	I
LEQ506	Novartis	1	Tumeurs solides MB avancé et réfractaire BCC métastatique	I
TAK-441	Millennium	1	BCC Tumeurs malignes non hématopoïétiques avancées	I

Tableau 3 : Inhibiteurs de la signalisation Hedgehog développés en clinique.

BCC : Basal cell carcinoma, SNBC : Syndrome névoïde basocellulaire, CCR : cancer colorectal, GBM : Glioblastome multiforme, MB : médulloblastome, SCLC : Small cell lung cancer, LMC : Leucémie myéloïde chronique. D'après (*Low & de Sauvage, 2011 ; Ng & Curran, 2011*) et ClinicalTrials.gov.

synthétique de structure dérivée d'une classe d'inhibiteurs des facteurs de transcription Gli décrite dans le paragraphe III.2.2 s'est révélée présenter des similitudes structurales et fonctionnelles avec un composé inhibiteur de l'enzyme Dhcr7 impliquée dans le développement du syndrome SLOS. En accord avec cette observation, la surexpression cellulaire de Dhcr7 réduit le niveau d'activation de la voie Hh de façon dépendante ou indépendante de Smo. De plus, il a été suggéré que les anti-psychotiques Clozapine, Halopéridol et Chlorpromazine ainsi que l'antidépresseur Imipramine capables de réguler le niveau d'expression de Dhcr7 pourraient, via ce mécanisme, être des modulateurs de la voie Hh *in vitro* et *in vivo* (Lauth et al., 2010).

Par ailleurs, une régulation de la signalisation Hh médiée par l'inhibition spécifique du récepteur Ptc a été montrée grâce au développement d'un anticorps spécifiquement dirigé contre Ptc. L'incubation de lignées humaines de carcinomes pancréatiques avec cet anticorps a montré à la fois une réduction de l'expression des gènes cibles de la voie mesurée par RT-PCR et une diminution de la prolifération des cellules. Si ces premiers résultats ont permis de proposer Ptc comme une nouvelle cible à envisager pour la régulation de la signalisation Hh, ils n'ont toutefois pas été confirmés depuis (Nakamura et al., 2007).

2.2. Cibles pharmacologiques en aval de Smo

Le développement de composés capables de réguler l'activité de protéines situées en aval de Smo dans la cascade de signalisation Hh pourrait être une alternative aux antagonistes de Smo dans le cas de tumeurs liées à des mutations des composantes de la voie en aval de Smo ou encore à des mutations de Smo résistantes aux antagonistes disponibles (**Figures 12**).

2.2.1. L'adénylate cyclase

D'origine végétale, la **forskoline** est un puissant activateur de l'adénylate cyclase qui induit une augmentation des taux d'AMPC capables d'activer la PKA, l'un des régulateurs négatifs de la signalisation Hh (Fan et al., 1995; Hynes et al., 1995; Lipinski et al., 2006; Noveen et al., 1996); **Figure 17**). Étant donné le rôle majeur de l'adénylate cyclase dans de très nombreux processus physiologiques, l'utilisation *in vivo* de la forskoline en tant qu'inhibiteur spécifique de la signalisation Shh ne peut être envisagée. Cependant, cette

molécule reste utile dans la compréhension des mécanismes régulant la signalisation Hh *in vitro*. Une étude récente vient d'ailleurs de rapporter que la forskoline est capable de bloquer la prolifération de cellules issues de RMS humains *in vitro* et empêche aussi le développement de xénogreffes de RMS humains *in vivo* (Yamanaka et al., 2011); **Figure 17**).

2.2.2. Les facteurs de transcription Gli

Comme pour les inhibiteurs de Smo, de petites molécules de synthèse antagonistes des facteurs de transcription Gli ont été identifiées par HTS de banques de molécules (**Figure 17**). **GANT58** et **GANT61** présentent une CI_{50} d'environ 5 μ M sur le test cellulaire mettant en jeu l'activation du rapporteur Gli-luciférase (Lauth et al., 2007). Ils agiraient au niveau nucléaire où ils inhiberaient les fonctions transcriptionnelles des Gli. GANT61 interfère notamment dans la liaison de Gli1 à l'ADN. Son administration sous-cutanée (25 mg/kg/jour pendant 18 jours) dans un modèle murin de xénogreffes de cancer de la prostate induit une régression significative du volume tumoral accompagnée d'une diminution de la transcription du gène cible Ptc. GANT61 réduit également la croissance de lignées de cellules humaines de RMS par inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose (Kawabata et al., 2011; Tostar et al., 2010). Cependant, à l'heure actuelle, ces composés n'ont pas encore été testés en clinique.

Par ailleurs, 4 petites molécules (**HPI1-4**) ont été récemment identifiées par HTS ciblant les molécules agissant en aval de Smo (**Figure 17**). L'activité de ces composés reste faible puisque HPI1, le plus puissant, présente une CI_{50} de 1,5 μ M. Ces composés n'inhibent pas la liaison de la BC et l'utilisation de constructions FLAG-Gli1 ou FLAG-Gli2 a permis de montrer qu'ils modulent la régulation, la stabilité, la localisation et la fonction des facteurs de transcription Gli. Cependant, leur mode d'action spécifique diffère. Ainsi, HPI1 régule les formes longues et activatrices de Gli1 et Gli2 suggérant qu'il agit indépendamment du cil primaire. En revanche, les HPI2 et HPI3 bloquent la conversion de la forme longue de Gli2 en sa forme activatrice. Enfin, HPI4 interfère avec la ciliogenèse et inhibe donc indirectement l'activation des facteurs de transcription Gli normalement exprimés dans cette structure (Hyman et al., 2009). Si les multiples modes d'action décrits pour ces 4 composés sont intéressants pour la compréhension de la signalisation, leur utilisation en clinique n'est pas pour le moment envisagée.

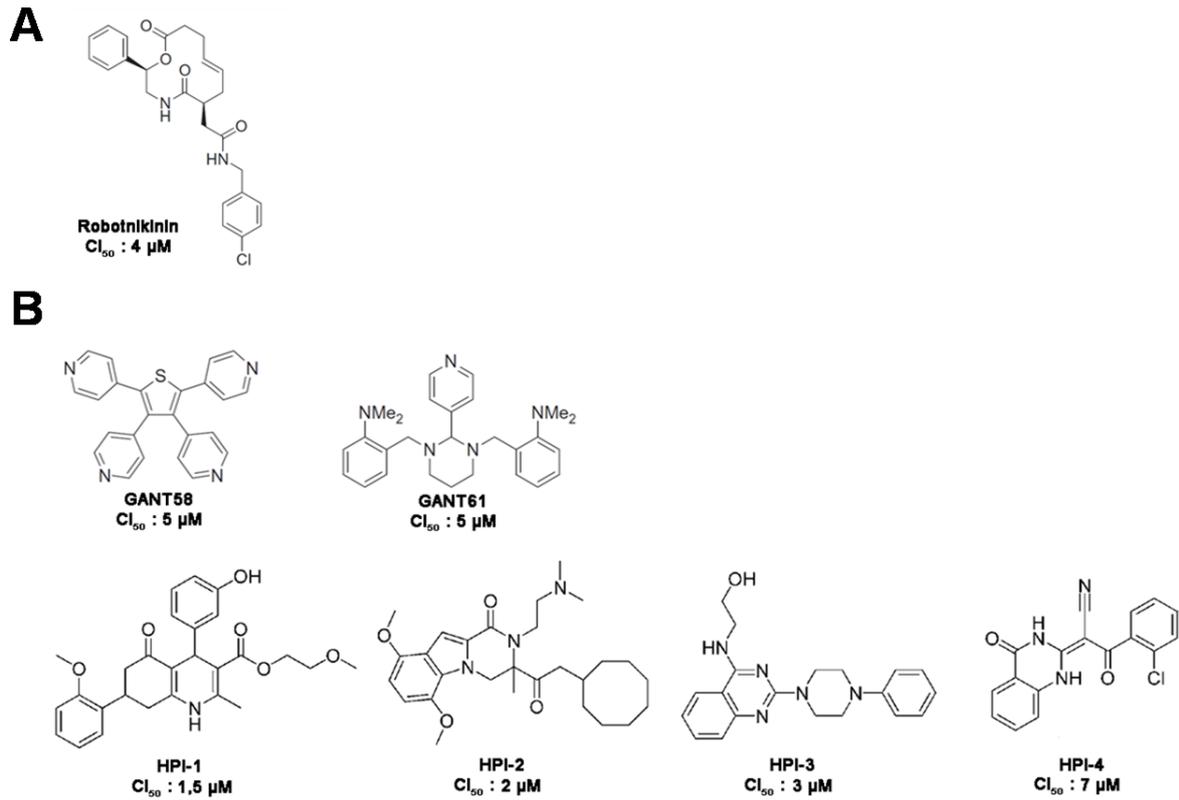


Figure 17 : Structures et affinités des principaux antagonistes de la voie Hedgehog dont la cible n'est pas le récepteur Smoothened.

(A) Structure et affinité de la Robotnikinin, un antagoniste de synthèse du ligand Sonic Hedgehog. (B) Structures et affinités des principales molécules présentant une activité antagoniste sur les facteurs de transcription Gli (GANT58, 61 et HPI1-3) ou inhibant la formation du cil primaire (HPI-4). D'après (Heretsch *et al.*, 2010; Peukert and Miller-Moslin, 2010).

2.2.3. Cibles non identifiées

De nombreuses molécules naturelles ont été récemment identifiées comme des composés capables d'inhiber l'activité du facteur de transcription Gli1 ; pour revue (*Mas & Ruiz i Altaba, 2010*). Les physalines sont les plus actives, en particulier, la **physaline F** qui bloque l'activité de Gli1 avec une affinité de 0,66 μM (**Figure 17**(*Hosoya et al., 2008; Rifai et al., 2011*)). Cependant, le test permettant de mesurer l'activité des composés sur l'activation transcriptionnelle de Gli n'est pas suffisant pour déterminer précisément le mode d'action de ces composés. Les physalines sont également cytotoxiques pour le développement de lignées de cellules cancéreuses du pancréas PANC1 qui surexpriment les acteurs de la voie Hh.

Les dérivés de l'arsenic induisent, au cours du développement embryonnaire, des anomalies comparables à celles générées par une signalisation Hh déficitaire (*Machado et al., 1999*). Cette révélation a suscité la recherche d'un potentiel rôle régulateur de ces composés sur la voie Hh (*Kim et al., 2010b*). De manière intéressante, **les dérivés de l'arsenic (arsenic trioxyde (ATO), arsénite sodium et oxyde phénylarsine)** sont capables d'inhiber l'activité des facteurs de transcription Gli sur le test utilisant le rapporteur Gli-luciférase avec une CI_{50} de 0,7 μM et notamment l'accumulation du facteur de transcription Gli2 dans le cil primaire. En accord avec ce résultat, ces composés bloquent l'activation de la voie induite par la forme constitutivement active du récepteur Smo ou par l'invalidation du régulateur négatif Sufu. De plus, ATO inhibe le développement de MB dans un modèle murin d'allogreffes dérivées d'animaux $\text{Ptc}^{+/-}\text{p53}^{-/-}$ (*Kim et al., 2010b*). Ces résultats ont été confirmés, dans une seconde étude qui propose l'existence d'une interaction directe entre ATO et le facteur de transcription Gli1 et montre qu'ATO abolit à la fois le développement de cellules issues de sarcomes humains dans un modèle de xéno-greffes ainsi que celui de MB dans un modèle murin (*Beauchamp et al., 2011*). Si le mécanisme d'action des dérivés de l'arsenic sur la voie Hh mérite d'être clarifié, ils n'en demeurent pas moins une alternative à considérer pour le traitement des cancers Hh-dépendants ne répondant pas aux antagonistes de Smo. De plus, ATO a déjà été utilisé dans le traitement de leucémies promyélocyaires aiguës (à ce jour, il a été inclus dans 92 études cliniques terminées ou encore en cours (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=As2O3>); (*Soignet et al., 2001*); pour revue, (*Emadi and Gore, 2010*)).

La diversité des effets engendrés par ces petites molécules est intéressante puisqu'elle permet d'accroître le nombre de cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de

tumeurs Hh-dépendantes. Cependant, Smo demeure la cible privilégiée des molécules développées à l'heure actuelle comme le sont un grand nombre des protéines appartenant à la superfamille des récepteurs à 7 domaines TM.

IV. Présentation du sujet de thèse

A partir de ce contexte bibliographique et des avancées majeures de notre équipe concernant l'étude pharmacologique du récepteur Smo ainsi que la compréhension des mécanismes de régulation de la voie signalisation Shh au sein du SNC de rongeur adulte, mon travail de thèse s'est articulé autour de 3 axes principaux :

1) La découverte de nouvelles séries chimiques de molécules régulatrices de la voie de signalisation Shh grâce au développement d'un modèle pharmacophorique des interactions de Smo avec des molécules précédemment identifiées comme capables de bloquer son activité. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec deux équipes chimistes, respectivement dirigées par le Pr. M. Taddei (Université de Sienne, Italie) et le Dr. A. Mann (Université de Strasbourg) mais aussi avec un bioinformaticien, le Dr. F. Manetti (Université de Sienne, Italie).

2) L'amélioration des propriétés pharmacologiques des têtes de listes des nouvelles séries chimiques identifiées conduisant à une molécule de haute affinité, le MRT-83, obtenue à l'aide de l'étude des relations structure-activité menée en collaboration avec les équipes de chimistes.

3) La caractérisation du mécanisme d'action *in vitro* et *in vivo* du composé MRT-83.

L'objectif de ce projet est le développement de nouveaux outils pharmacologiques destinés à améliorer notre compréhension des mécanismes de régulation de la voie Shh. Il a fait appel à des approches multiples parmi lesquelles des cultures de lignées de cellules transfectées, des cultures primaires de neurones granulaires du cervelet isolés de rats post-nataux précoces, des tests biochimiques, des expériences d'incorporation de thymidine tritiée, mais aussi des techniques d'immunocytofluorescence permettant de déterminer l'affinité des composés pour Smo et de caractériser leurs effets sur le trafic subcellulaire du récepteur notamment son adressage au cil primaire. La caractérisation *in vivo* du composé MRT-83 sur la signalisation Shh a par ailleurs requis des techniques d'injections stéréotaxiques intracérébrales chez le rongeur, puis une analyse immunohistochimique.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résumé de l'article *Manetti et al, 2010, Mol. Pharmacol.*

Le récepteur à 7 domaines TM Smo est l'un des éléments clef de la transduction intracellulaire des signaux associés à l'activation de la signalisation Hh. Des dérégulations dans le contrôle de cette voie de signalisation sont à l'origine de l'émergence d'un grand nombre de cancers atteignant le SNC, comme dans le cas des MB, mais aussi les tissus périphériques comme dans celui des BCC. Smo représente donc une cible thérapeutique intéressante ; pour revue, (*Ng and Curran, 2011*). Sa structure apparentée à celle des RCPG permet aisément d'envisager la régulation de ce récepteur par de petites molécules (*Ayers and Therond, 2010*). Comme nous l'avons précédemment mentionné au cours de l'introduction, des molécules antagonistes de Smo appartenant à différentes séries chimiques ont été identifiées. Parmi elles, seul un nombre restreint a atteint le stade des essais cliniques. Par ailleurs, certaines limitations à leur utilisation se sont progressivement révélées. Ainsi, l'antagoniste de référence, la cyclopamine, un alcaloïde naturel capable d'inhiber la signalisation Hh avec des affinités de l'ordre du micromolaire *in vitro* et utilisée *in vivo* sur des modèles d'allogreffes de tumeurs, a vu ses effets controversés (*Berman et al., 2002; Chen et al., 2002a; Taipale et al., 2000*). En effet, les fortes concentrations requises pour induire un effet antiprolifératif sur un large panel de lignées de cellules cancéreuses se sont avérées ne pas être en adéquation avec l'affinité du composé *in vitro* sur la voie Hh suggérant fortement que la molécule présente des effets non spécifiques (*Yauch et al., 2008*). Un autre antagoniste de Smo, la molécule de synthèse GDC-0449, testée en clinique dans des cas de BCC ou de MB (*Rudin et al., 2009; Von Hoff et al., 2009*) a rapidement montré son efficacité clinique. Cependant, après avoir entraîné une régression rapide des métastases chez un patient atteint de MB, le GDC-0449 a conduit à l'apparition d'une résistance aboutissant à une rechute fatale (*Yauch et al., 2009*).

Dans ce contexte, le développement de nouvelles molécules de structures chimiques différentes est nécessaire afin de pouvoir envisager l'utilisation de nouveaux composés en clinique, mais aussi de clarifier la physiopathologie des tumeurs associées à la dérégulation de la signalisation Hh. En collaboration avec un bioinformaticien, nous avons tout d'abord généré et validé un modèle pharmacophorique des antagonistes connus de Smo. Un tel modèle n'avait encore jamais été proposé. Il a permis le criblage virtuel d'une banque de plus

de 400 000 molécules dont 20 ont été finalement sélectionnées. Ce modèle repose sur les structures de plusieurs antagonistes de référence dont la cyclopamine, le Cur61414 et le Z'''' sélectionnés pour leur affinité pour Smo et leur diversité structurale.

Les données pharmacologiques pour ces différentes molécules n'étant pas toujours concordantes dans la littérature, nous avons analysé leur activité inhibitrice dans plusieurs tests cellulaires où l'état d'activation de la signalisation Hh peut être déterminé. Deux tests cellulaires ont été principalement utilisés. Le premier repose sur la mesure de l'activité d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur Gli dans la lignée cellulaire murine NIH3T3. La capacité des molécules antagonistes à inhiber l'activation du gène rapporteur préalablement induite par la forme myristoilée de la protéine ShhN a été mesurée et a conduit à des affinités de 0,3 ; 0,14 et 0,09 μM respectivement pour la cyclopamine, le Cur61414 et le Z'''''. Le second test repose sur la détermination de la différenciation des cellules murines mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes. Cette réponse faisant intervenir l'activation de la voie Hh, est mesurée par le niveau d'activité de l'enzyme phosphatase alcaline dans les cellules. Dans ce test, la cyclopamine, le Cur61414 et le Z'''' inhibent la différenciation induite par 0,1 μM de l'agoniste synthétique SAG avec des CI_{50} respectivement de 0,6 ; 0,3 ; 0,03 μM .

Le modèle pharmacophorique que nous avons développé pour ces molécules est constitué de 3 groupements accepteurs d'hydrogène et de 3 régions hydrophobes. Les antagonistes de référence s'adaptent à ce modèle. Le criblage virtuel de la banque de molécules commercialisée par la société Asinex à l'aide de ce modèle pharmacophorique a permis d'identifier 525 composés dont la structure comprenait les 6 régions essentielles du pharmacophore. Après l'inspection visuelle de ces composés et la prise en compte de leurs propriétés physico-chimiques, 20 ont été finalement retenus et testés dans les 2 tests cellulaires décrits ci-dessus. L'acylthiourée MRT-10 présentant une affinité similaire à celle de la cyclopamine (CI_{50} : 0,3 et 0,6 μM respectivement sur les tests d'activation du rapporteur Gli-luciférase et de différenciation ostéoblastique) a finalement été sélectionné comme tête de file d'une nouvelle série chimique d'antagonistes de Smo.

La capacité du MRT-10 à moduler le couplage du récepteur Smo à la sous-unité α de la protéine G_{15} dans des cellules HEK293 indique que ce composé, comme les composés de référence Cur61414, cyclopamine ou Z''''', est capable de bloquer l'activité constitutive du récepteur Smo de souris. De plus, la liaison de MRT-10 à ce récepteur est démontrée par la

capacité de MRT-10 à déplacer le ligand fluorescent BODIPY-cyclopamine fixé au récepteur Smo murin surexprimé dans des cellules HEK293. Le composé MRT-10 inhibe la liaison du ligand fluorescent de manière dose-dépendante avec une CI_{50} de 0,5 μ M, une valeur corrélée avec les valeurs précédemment obtenues dans les 2 tests cellulaires classiquement utilisés.

La synthèse de l'acylurée correspondant au MRT-10, le MRT-14, nous a permis d'améliorer l'affinité du composé. En effet, MRT-14 présente une affinité 4 fois supérieure à celle de l'acylthiourée MRT-10 avec une CI_{50} de 0,16 μ M dans le test utilisant le rapporteur Gli-luciférase. Des valeurs comparables sont aussi déterminées dans les tests reposant sur la différenciation des cellules C3H10T1/2, le couplage de la protéine $G\alpha_{15}$ ou la liaison du ligand fluorescent BODIPY-cyclopamine. MRT-14 est un antagoniste de Smo aussi puissant que le composé Cur61414 puisque les CI_{50} capables d'inhiber la liaison de la BODIPY-cyclopamine sur le récepteur Smo murin sont respectivement de 0,08 et 0,12 μ M pour le Cur61414 et le MRT-14. Nous montrons également que les molécules MRT-10 et MRT-14 s'adaptent parfaitement au modèle pharmacophorique, ce qui permet la validation de ce modèle.

Par ailleurs, nous avons procédé à un second criblage ciblé visant à déterminer d'autres molécules présentant le groupement phénylthiourée présent sur le MRT-10. Parmi les 30 composés isolés de ce second criblage, 5 nouveaux composés ont été identifiés capables d'inhiber l'activation de la voie Hh sur les tests Gli-luciférase et de différenciation ostéoblastique avec des affinités de l'ordre du micromolaire. Cependant, ces molécules ne se sont pas révélées plus puissantes que MRT-14.

L'ensemble de ces résultats démontre que le criblage virtuel de banques de molécules à l'aide d'un modèle pharmacophorique est une approche appropriée à la découverte de nouvelles familles de petites molécules capables de moduler l'activité du récepteur Smo. Elle pourrait tout à fait s'adapter à l'identification de molécules agonistes du récepteur et s'étendre à d'autres RCPG. Les deux composés MRT-10 et MRT-14 semblent être de bons candidats pour la caractérisation pharmacologique de la voie Hh. Leurs affinités comparables à celles des antagonistes de référence cyclopamine et Cur61414 suggèrent que ces composés ou leurs dérivés sont potentiellement intéressants à des fins thérapeutiques.

Virtual Screening-Based Discovery and Mechanistic Characterization of the Acylthiourea MRT-10 Family as Smoothened Antagonists[§]

Fabrizio Manetti, Helene Faure, Hermine Roudaut, Tatiana Gorojankina, Elisabeth Traiffort, Angele Schoenfelder, Andre Mann, Antonio Solinas, Maurizio Taddei, and Martial Ruat

Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena, Siena, Italy (F.M., A.S., M.T.); Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche-3294, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2118, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology Team, Gif-sur-Yvette, France (H.F., H.R., T.G., E.T., M.R.); and Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche-7200, Université de Strasbourg, Illkirch, France (A.S., A.M.)

Received March 26, 2010; accepted July 27, 2010

ABSTRACT

The seven-transmembrane receptor Smoothened (Smo) is the major component involved in signal transduction of the Hedgehog (Hh) morphogens. Smo inhibitors represent a promising alternative for the treatment of several types of cancers linked to abnormal Hh signaling. Here, on the basis of experimental data, we generated and validated a pharmacophoric model for Smo inhibitors constituted by three hydrogen bond acceptor groups and three hydrophobic regions. We used this model for the virtual screening of a library of commercially available compounds. Visual and structural criteria allowed the selection of 20 top scoring ligands, and an acylthiourea, *N*-(3-benzamidophenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (MRT-10), was identified and characterized as a Smo antagonist. The cor-

responding acylurea, *N*-(3-benzamidophenylcarbamoyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (MRT-14), was synthesized and shown to display, in various Hh assays, an inhibitory potency comparable to or greater than that of reference Smo antagonists cyclopamine and *N*-((3*S*,5*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-(piperazine-1-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(3-methoxybenzyl)-3,3-dimethylbutanamide (Cur61414). Focused virtual screening of the same library further identified five additional related antagonists. MRT-10 and MRT-14 constitute the first members of novel families of Smo antagonists. The described virtual screening approach is aimed at identifying novel modulators of Smo and of other G-protein coupled receptors.

Introduction

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is involved in tissue growth and repair in the embryo and the adult. Synthesized as large precursor proteins, Hh ligands undergo autoproteolysis and lipid modifications of their biologically active aminoterminal domain. This soluble fragment mediates its action via a receptor complex containing two transmembrane proteins: Patched (Ptc) displaying a transporter-like structure and Smoothened (Smo) presumably belonging to the G protein-coupled receptor (GPCR) superfamily. The repres-

This work was supported by La Ligue contre le Cancer (Comité des Yvelines); l'Institut National du Cancer; l'Association pour la Recherche contre le Cancer [Grant 3850], l'Association Française contre les Myopathies [Grant 12181]; the French Agence Nationale de la Recherche [Grant 07-physio-010-04]; and The Neuropole de Recherche Francilien [Doctoral Fellowship 248890].

F.M. and H.F. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/mol.110.065102.

[§] The online version of this article (available at <http://molpharm.aspetjournals.org>) contains supplemental material.

ABBREVIATIONS: Hh, Hedgehog; Ptc, Patched; GPCR, G protein-coupled receptor; Smo, Smoothened; BCC, basal cell carcinoma; Cur61414, *N*-((3*S*,5*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-(piperazine-1-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(3-methoxybenzyl)-3,3-dimethylbutanamide; Z''''', *N*-(4-chloro-3-(6-(dimethylamino)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine-6-carboxamide; SAG, Smoothened agonist; DMSO, dimethyl sulfoxide; HEK, human embryonic kidney; IP, inositol phosphates; ShhN, N-terminal fragment of human Sonic hedgehog; AP, alkaline phosphatase; PBS, phosphate-buffered saline; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; BC, Bodipy-cyclopamine; HBA, hydrogen-bond acceptor; HY, hydrophobic; MRT-24, *N*-(3-benzamidophenylcarbamothioyl)-3,4-dimethoxybenzamide; MRT-29, 4-methoxy-*N*-(3-(2-methylbenzamido)phenylcarbamothioyl)-3-nitrobenzamide; MRT-31, *N*-(3-(3-biphenylcarbonylthioureido)phenyl)furan-2-carboxamide; MRT-39, *N*-(3-(3-(3,4-dimethoxybenzoyl)thioureido)phenyl)furan-2-carboxamide; MRT-42, *N*-(5-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylphenylcarbamothioyl)-3,4-dimethoxybenzamide.

sion exerted by Ptc on Smo is relieved when Hh binds Ptc, which leads to a complex signaling cascade involving the transcription factors of the Gli family and to the activation of target genes, including Ptc and Gli themselves (Ruiz i Altaba et al., 2007; Hausmann et al., 2009; Simpson et al., 2009). Smo trafficking to the primary cilia from cytoplasmic vesicles has been proposed to be a key step for Hh transduction. Ptc is proposed to be localized to the cilia in the absence of its ligand and to inhibit signaling by excluding Smo. Thus, Smo translocation to the primary cilia upon Hh signaling might be followed by a second step leading to its activation, which has led to the proposition of a two-step mechanism of action for the activation process (Gerdes et al., 2009; Rohatgi et al., 2009; Wang et al., 2009b). Because Smo has been exclusively associated with synaptic vesicles in mossy fiber boutons in the hippocampus (Masdeu et al., 2007), it would be also important to determine whether this two-step mechanism of action is also observed for Smo transduction of Hh signaling in nerve brain terminal (Traiffort et al., 2010).

Dysregulation of the Hh pathway has been associated with several types of cancers. The inactivating mutations of Ptc observed in patients with Gorlin's syndrome have been linked to a higher incidence of basal cell carcinoma (BCC), medulloblastoma, and rhabdomyosarcomas. Oncogenic mutations of Smo have also been identified in both BCC and medulloblastoma (Scales and de Sauvage, 2009). These tumors are considered to be independent of Hh ligands because the pathway is constitutively activated. However, several types of cancers are considered to be dependent on the overproduction of Hh ligands. This is the case for those occurring from the gastrointestinal tract, lung, colon, pancreas, breast, and prostate and for melanoma (Mahindroo et al., 2009; Scales and de Sauvage, 2009).

Smo has been proposed as a molecular target for the action of antagonists aimed at blocking the Hh pathway and Smo inhibitors are candidate drugs for the treatment of cancers associated with dysfunction of Hh signaling. The natural and teratogenic compound cyclopamine blocks Hh signaling by directly binding Smo and slows down the growth of these tumors in various animal models (Taipale et al., 2000; Scales and de Sauvage, 2009; Simpson et al., 2009). When applied *in vivo*, cyclopamine also blocks stem cell proliferation in the mouse adult brain subventricular zone (Palma et al., 2005). However, it was recently proposed that cyclopamine and possibly another unrelated Smo antagonist may have non-specific effects on cell growth by acting on off-targets. They may mediate their effects on tumor growth by acting on the Hh pathway expressed in the stroma surrounding the tumor and not on the cells belonging to the tumor itself (Yauch et al., 2008; Tian et al., 2009). Cyclopamine has been tested for treating BCC in humans, and more potent and soluble derivatives are under development. *N*-((3*S*,5*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-(piperazine-1-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(3-methoxybenzyl)-3,3-dimethylbutanamide (Cur61414) has also shown efficacy for treating BCC-like lesions in a mouse model but not in humans (Williams et al., 2003; Scales and de Sauvage, 2009). More recent clinical trials have been conducted with a novel small molecule Smo inhibitor for treating metastatic BCC and one case of medulloblastoma (Rudin et al., 2009; Von Hoff et al., 2009). However, in the latter, despite a rapid regression of the tumor and associated symptoms, resistance to the treatment occurred. A

Smo mutation altering its ability to respond to the inhibitor was proposed to be responsible for the observed resistance (Yauch et al., 2009). Hh blockade by a Smo antagonist has also been suggested to be a therapeutic approach to inhibit articular cartilage degeneration (Lin et al., 2009).

Therefore, the discovery of novel molecules aimed at inhibiting Smo has therapeutic interest and should help to further characterize the potential roles of Smo both *in vitro* and *in vivo*. Molecules with diverse structural features have been identified from high-throughput screening as Hh pathway inhibitors, and several of them target Smo (Mahindroo et al., 2009; Scales and de Sauvage, 2009). Such an approach requires intense screening efforts and is highly expensive. Virtual screening has become a major focus for the discovery of novel modulators of GPCRs. Because no three-dimensional structure of Smo has been reported so far, neither from experimental sources (i.e., NMR or X-ray crystallographic studies) nor from theoretical approaches (i.e., homology modeling and molecular dynamics simulations), we undertook a ligand-based virtual screening for new Smo antagonists. We first constructed and validated a Smo pharmacophore. Then, we applied a virtual screening procedure to select 20 compounds from the Asinex database. This approach resulted in the identification of MRT-10, a Smo antagonist displaying a unique acylthiourea scaffold. Finally, MRT-14, the corresponding acylurea derivative of MRT-10, was synthesized. In Hh cell-based assays, MRT-14 exhibited greater potency than MRT-10 comparable with that of reference Smo antagonists.

Materials and Methods

Drugs. Cyclopamine and Bodipy-cyclopamine were from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). SAG, Cur61414, and *N*-(4-chloro-3-(6-(dimethylamino)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)phenyl)-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine-6-carboxamide (*Z'*) were synthesized as described previously (Martínez et al., 2006; Masdeu et al., 2006). ShhN was provided by Dr. D. Baker (Biogen Idec, Boston, MA). Other compounds selected from the virtual screening were from ASINEX (Rijswijk, The Netherlands), and their structures are shown in Table 2 and Supplemental Table 2. The structure of MRT-10 was confirmed by synthesis, and its biological activity evaluated on Hh assays was comparable with the purchased sample. Cur61414, SAG, and cyclopamine were dissolved in ethanol at a concentration of 10 mM. All other tested compounds were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM.

Preparation of *N*-(3-Benzamidophenylcarbamoethyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (MRT-10). A mixture of 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride and NH₄SCN in acetone was heated under reflux for 30 min. Then *N*-(3-aminophenyl)benzamide was added for 1 h. The reaction was poured into crushed ice with stirring; the solid collected and crystallized in hot MeOH gave MRT-10 (m.p. 164°C). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.69 (1 H, brd s), 9.03 (1 H, brd s), 8.24 (1 H, m), 7.93–7.89 (3 H, m) 7.63–7.42 (6 H, m), 7.10 (2 H, s), 3.96 (9 H, s). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ 179.9, 168.3, 166.5, 153.4, 142.5, 140.4, 139.1, 135.6, 132.5, 129.6, 129.2, 128.5, 127.5, 120.3, 119.1, 116.9, 107.2, 61.1, 57.1. C₂₄H₂₃N₃O₅S (molecular weight, 465) [electrospray/mass spectrometry] *m/z* 466 [M + H]⁺.

Preparation of *N*-(3-Benzamidophenylcarbamoethyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (MRT-14). A mixture of 3,4,5-trimethoxybenzamide and oxalyl chloride in CH₂Cl₂ was refluxed for 16 h. The solvent was removed *in vacuo*, by adding toluene. Then, the crude acyl-isocyanate was dissolved in CH₃CN and *N*-(3-aminophenyl)benzamide was added. The reaction mixture was refluxed and the

resulting solid was filtered and crystallized in hot MeOH to yield MRT-14 as a white solid (m.p. 192°C). ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d6) δ 11.02 (2 H, m), 10.33 (1 H, brd s), 8.09–7.97 (3 H, m), 7.61–7.33 (8 H, m), 3.96 (9 H, s). C₂₄H₂₃N₃O₆ (molecular weight, 449) [electrospray/mass spectrometry] *m/z* 450 [M + 1]⁺.

Structural Characterization of Compounds. The ¹H NMR (200 or 300 MHz), and ¹³C NMR (50 or 75 MHz) spectra were performed in CDCl₃ or DMSO (d6). The chemical shifts are given in parts per million with respect to CDCl₃ as the reference resonance. The melting points were performed on a Gallenkamp apparatus and were uncorrected.

Plasmids. The plasmids pRK5, pRK5-G₁₅, and pRK5-SP-myc-Smo encoding the mouse Smo sequence have been described previously (Masdeu et al., 2006) and are referred to in the text as pRK5, G₁₅, and mouse Smo, respectively.

Cell Culture and Transfection. HEK293 and C3H10T1/2 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The Shh-light2 cells (from Prof. P.A. Beachy, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA) were cultured in the same medium supplemented with 400 μg/ml G-418 (Geneticin) and 150 μg/ml Zeocin (Invitrogen). HEK293 cells were transiently transfected by electroporation using 4 μg of mouse Smo and 6 μg of pRK5 for Bodipy-cyclopamine binding and immunofluorescence or with 4 μg of mouse Smo supplemented with 4 μg of G₁₅ and 2 μg of pRK5 for [³H]inositol phosphates ([³H]IP) formation. Controls with G₁₅ or mouse Smo alone were performed in parallel experiments. The electroporated cells were distributed into six-well plates containing glass coverslips coated with 0.05 mg/ml poly-D-lysine (BD Bioscience, Le Pont De Claix, France) for Bodipy-cyclopamine binding and immunofluorescence experiments or 24-well plates for [³H]IP analysis. These cell-based assays were performed 48 h after cell transfection.

Gli-Dependent Luciferase Reporter Assay. Shh-light2 cells stably incorporating the Gli-luc reporter and the pRL-TK *Renilla reniformis* control described in (Taipale et al., 2000) were incubated for 40 h with ShhN (5 nM) and the studied compounds. Determination of luciferase activities was carried out using the Dual-Luciferase assay according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). All presented data are firefly luciferase activity reported to the *R. reniformis* control activity. The MRT compounds did not modify significantly the *R. reniformis* activity at 3 μM.

Alkaline Phosphatase Assay. C3H10T1/2 cells were incubated for 6 days in the presence of SAG (0.1 μM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described previously (Coulombe et al., 2004).

[³H]IP Formation. Measurement of [³H]IP accumulation was performed as described previously (Masdeu et al., 2006). Data are expressed as percentage Smo-induced IP response in the presence of G₁₅ over the IP basal level. The latter corresponds to the inhibition of the Smo-induced IP response by 30 μM Cur61414. This response was not significantly different from the IP response observed in the presence of G₁₅ alone. The [³H]IP accumulation in G₁₅-transfected cells was not affected by 30 μM MRT-10 or Cur61414.

Bodipy-Cyclopamine Binding. The protocol was adapted from Chen et al. (2002a). Mouse Smo-transfected cells were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, washed in PBS supplemented with 0.5% fetal calf serum and incubated for 2 h at 37°C in the same medium supplemented with Bodipy-cyclopamine (5 nM) and the studied compounds. After two washes in PBS-fetal calf serum, the cells were analyzed under a DMRXA2 fluorescence microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a Photometric Cool-Snap camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany) using Vectashield as mounting medium and DAPI for staining of the cell nuclei (Vector Laboratories, Paris, France). Bodipy (green) and DAPI (blue) signals were ana-

lyzed in three to four representative fields per coverslip (black and white photographs with 20× magnification, 1000 cells/field). Using Simple-PCI software (Hamamatsu Corporation, Massy, France), the fluorescence intensity of transfected cells determined in presence of BC (5 nM) alone or in the presence of the drugs, over the basal fluorescence measured in the absence of BC was quantified (Supplemental Table 3) and divided by the area occupied by the nuclei (DAPI staining) in the field. Data were expressed as percentage fluorescence intensity observed with BC alone.

Pharmacophore Determination and Virtual Screening. The chemical structures of diverse potent Hh inhibitors (Cur61414, Z''', and related molecules shown in Supplemental Fig. 1) were used to generate the pharmacophoric model by means of the software Catalyst (Accelrys Inc., San Diego, CA). For this purpose, HipHop (common feature hypothesis generation), which is able to generate pharmacophoric models only by identification of the common chemical features shared by the molecules and their relative alignment to the common feature set (Barnum et al., 1996), was applied. Then, a conformational search was performed on each compound to build a representative family of conformational models to be used in turn for pharmacophore generation. Conformers were generated by application of the poling algorithm, and the best quality conformational analysis was implemented in the software Catalyst. Conformational diversity was emphasized by selection of the conformers that fell within a 20 kcal/mol range above the lowest-energy conformation. All the conformers of each compound were employed to derive a set of 10 pharmacophoric hypotheses (Supplemental Table 1). To enhance the probability of finding significant models, we have applied the following rules: 1) selection of the most potent molecules (Supplemental Fig. 1) to be included in the set, because the software pays particular attention to these molecules in the generation of the chemical feature space, and 2) maximization of the kinds (chemical groups) and relative positions (substitution pattern) of the chemical features (chemical groups) shared by the molecules, because the program recognizes the molecules as collections of chemical features, not as assemblies of atoms or bonds. The best-scored six-feature pharmacophore hypothesis was then used as a three-dimensional query to perform a database search to find structural motifs that fulfill the functional and spatial constraints imposed by the model. The Asinex Gold and Platinum Collection (<http://www.asinex.com/prod/gold.html>), containing approximately 400,000 compounds, was analyzed. The structure of compounds simultaneously mapping all the pharmacophore features with a fit value of 5.00 or higher (the maximum fit allowed by a six-feature pharmacophoric model is 6.00) were retained. The resulting library, composed of 525 entries, was further pruned to 20 entries on the basis of the fit value and the uniqueness of the molecular structure (Supplemental Table 2); i.e., among entries belonging to the same structural class, only the best scored compound was kept. These compounds were submitted to biological tests resulting in MRT-10 as a good hit compound. From its molecular structure, two substructures were designed (Supplemental Fig. 4). They have the ureido moiety and the central phenyl ring as common features, but differ in the presence of a terminal 6–5 heterocyclic moiety instead of a methoxyphenyl ring. They were used to perform two additional database searches.

Data Analysis. All experiments were carried out at least three times in triplicate or quadruplicate. Means and S.E.M. were calculated using Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, WA). Curves were analyzed using Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA). Data were fitted to sigmoidal dose-response curve (variable slope). The IC₅₀ and Hill coefficient were calculated for each experiment, and the mean ± S.E.M. are reported.

Results

Drug Discovery Approach. Several inhibitors of the Hh signaling pathway identified to date bind to the GPCR Smo at the level of its heptahelical domain. These include the

steroidal alkaloid extracted from corn lilies called cyclopamine, which is teratogenic, Cur61414, and several synthetic compounds widely used for blocking the Hh pathway both in vitro and in vivo (Scales and de Sauvage, 2009). Therefore, to allow the development of new Hh modulators, we have delineated a pharmacophore for Smo antagonists based on the structure of Cur61414, Z''', and several related molecules (Fig. 1 and Supplemental Fig. 1) for which the structures were available (Taipale et al., 2000; Chen et al., 2002b; Williams et al., 2003; Borzillo and Lippa, 2005). These molecules were selected for their potency as Smo antagonists and for the diversity of their chemical structures.

Owing to the lack of consistency in the reported biological data related to experimental variability in the biological responses analyzed by various laboratories, we felt it necessary to reinvestigate the antagonist properties of the lead molecules using established Hh cell-based assays under in-house homogenous conditions (Table 1, Fig. 2). The potency of cyclopamine, Cur61414, and Z''' was determined in Shh-light2 cells, which is an NIH3T3 cell line with a Gli-dependent firefly luciferase reporter widely used for identifying Hh inhibitors (Taipale et al., 2000). These cells were stimulated for 40 h with N-myristoylated Shh (ShhN) in the presence or absence of these drugs in parallel experiments. We also evaluated their ability to inhibit SAG (0.1 μ M)-induced differentiation of the mesenchymal pluripotent C3H10T1/2 cells into alkaline phosphatase-positive osteoblasts, a response that involves activation of Smo (Hyman et al., 2009). Z''' was found to be the most potent molecule in these assays (Table 1).

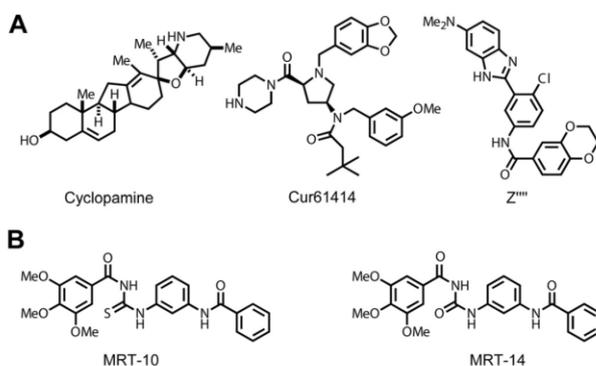


Fig. 1. Chemical structures of reference Smo antagonists (A). Structures of MRT-10 compound, identified from virtual screening, and MRT-14, its acylurea derivative (B).

TABLE 1

Compared activities of MRT-10, MRT-14, and reference Smo antagonists in different cell-based assays

IC₅₀ and Hill coefficient (*n*_H) values of the compounds were determined on Gli-dependent luciferase reporter activity induced by ShhN (5 nM) in Shh-light2 cells; AP activity induced by SAG (0.1 μ M) in C3H10T1/2 cells; constitutive activity of mouse Smo coexpressed with the α subunit of G₁₅ determined by IP accumulation in HEK293 cells; and BC binding to HEK293 cells transiently expressing mouse Smo. Data are the means \pm S.E.M. of two to five independent experiments.

Compounds	Shh-light2		C3H10T1/2		[³ H]IP		BC Binding	
	IC ₅₀	<i>n</i> _H	IC ₅₀	<i>n</i> _H	IC ₅₀	<i>n</i> _H	IC ₅₀	<i>n</i> _H
	μ M		μ M		μ M		μ M	
Cyclopamine	0.3 \pm 0.05	1.6 \pm 0.4	0.62 \pm 0.03	1.3 \pm 0.1	0.25 \pm 0.06	1.2 \pm 0.3	0.05 \pm 0.01	0.8 \pm 0.1
Cur61414	0.14 \pm 0.04	2.0 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	0.33 \pm 0.07	1.1 \pm 0.3	0.08 \pm 0.02	1.0 \pm 0.1
Z'''	0.09 \pm 0.05	1.8 \pm 0.1	0.029 \pm 0.007	1.1 \pm 0.1	0.12 \pm 0.01	1.0 \pm 0.1	0.011 \pm 0.001	1.4 \pm 0.3
MRT-10	0.64 \pm 0.15	2.0 \pm 0.4	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.2	2.5 \pm 1.1	0.9 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.3
MRT-14	0.16 \pm 0.07	2.1 \pm 0.3	0.13 \pm 0.05	1.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	0.12 \pm 0.03	1.3 \pm 0.3

Modeling and Virtual Library Screening. The best conformer analysis implemented in the Catalyst program was applied to each compound for collecting conformers with a range of 20 kcal/mol with respect to the global minimum that was used for building the best pharmacophoric model. This model was built up by three hydrogen bond acceptor (HBA1–3) groups and three hydrophobic (HY1–3) regions. Analysis of the superposition pattern of Z''' showed a perfect fit between the inhibitor and the pharmacophoric model (Fig. 3). For example, one of the dioxane oxygens of Z''' fills HBA1 perfectly; the oxygen atoms of the carbonyl moiety match HBA2, and one of the benzimidazole nitrogen atoms corresponds to the HBA3 feature of the model. Moreover, the phenyl ring of benzo-dioxane is superposed to the hydrophobic region HY1, the chloro-substituent on the central aromatic ring matches HY2, and the dimethylamino group is located in the spatial region occupied by HY3. Fitting of cyclopamine and Cur61414 to the pharmacophoric model is also shown in Supplemental Fig. 2.

Identification of the Acylthiourea MRT-10 Family of Smo Inhibitors. The Asinex Gold collection of diverse drug-like molecules was screened virtually for flexible fitting to the six-feature pharmacophore model of Smo. This in silico database search identified 525 compounds. After visual inspection of this library, 20 compounds were selected for experimental testing based on the following criteria: 1) high fit score, 2) molecular weight, and 3) chemical diversity.

These compounds were purchased and analyzed for both their antagonist properties in the Shh-light2 cell luciferase assay and their ability to inhibit SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells using measurement of alkaline phosphatase activity (Supplemental Table 2). Among the tested molecules, MRT-10 (Fig. 1), an acylthiourea, behaved as an antagonist with potency similar to that of the reference compound Cur61414 (Fig. 2, Table 1). Then, we investigated the ability of MRT-10 to modify the constitutive activity of Smo coexpressed with the α subunit of the G₁₅ in HEK293 cells. This assay allows the analysis of the nontranscriptional activity of the Hh pathway and has been used for the characterization of the inverse agonist properties of cyclopamine and Cur61414 (Masdeu et al., 2006). In agreement with previous results, we showed that Cur61414 displays inverse agonist properties toward this response as measured by the decreased IP accumulation that occurred in these cells 30 min after the addition of the ligand (Fig. 4). Cur61414 inhibited the IP response (IC₅₀ = 0.33 μ M) in cells expressing both Smo and G₁₅ to a level comparable with that observed in

mock-transfected cells. Z'''' also displays a full inverse agonism response ($IC_{50} = 0.12 \mu\text{M}$, Table 1). It is noteworthy that MRT-10 also inhibited the IP accumulation in a dose-dependent manner ($IC_{50} = 2.5 \mu\text{M}$). The inhibition of this response ($70 \pm 5\%$, $n = 3$) was partial (Fig. 4). Thus, MRT-10 has the capacity to abrogate the constitutive activity of Smo and should be considered as an inverse agonist for this response. These data also demonstrate that MRT-10 interacts with mouse Smo. MRT-10 and the other compounds presented in Table 1 have no significant inhibitory activity on the IP production in HEK cells transfected with G_{15} (Supplemental Fig. 5).

MRT-10 Binding to Cells Expressing Mouse Smo. To further investigate the binding properties of MRT-10 to Smo, we analyzed whether it can compete with Bodipy-cyclopamine, which interacts with Smo at the level of its heptahelical bundle (Chen et al., 2002b). First, we showed that Bodipy-cyclopamine bound to a subpopulation of HEK293 cells tran-

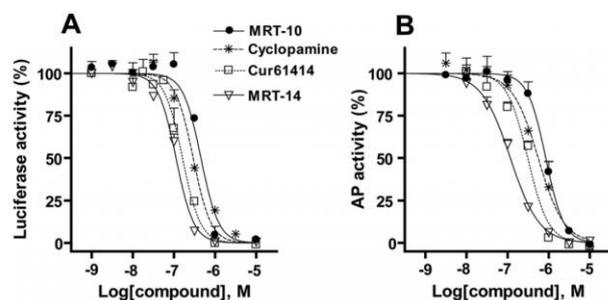


Fig. 2. Inhibition by MRT-10, MRT-14, Cur61414, and cyclopamine of ShhN-induced Gli-dependent luciferase activity in Shh-light2 cells (A) and SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells (B). Inhibition curves were generated using increasing concentrations of MRT-10, MRT-14, Cur61414, and cyclopamine in the presence of ShhN (5 nM) (A) or SAG (0.1 μM) (B). The experiments were performed as described under *Materials and Methods*. The data shown are representative of independent experiments ($n = 3-10$) and are the means \pm S.E.M. of triplicates. The values are expressed as a percentage of the maximal response induced by ShhN or SAG, respectively.

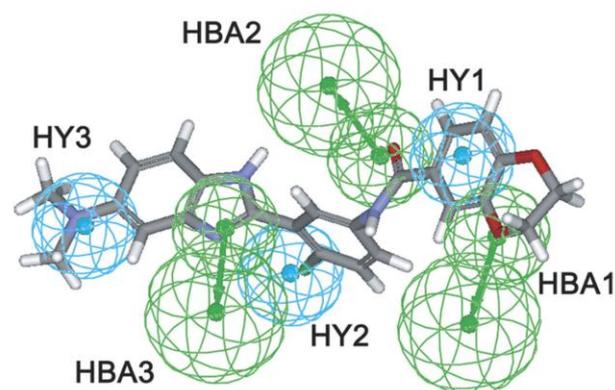


Fig. 3. Proposed pharmacophore model for Smo antagonists. Graphical representation of Z'''' fitted to the pharmacophoric model for Smo antagonists. Pharmacophoric features are color coded: green for hydrogen bond acceptor groups (HBA1-3) and cyan for hydrophobic regions (HY1-3). HBA features are constituted by a smaller sphere accommodating the hydrogen bond acceptor group, by a directionality vector represented by an arrow, and by a larger sphere intended to allocate the hydrogen bond donor group of the target macromolecule. The atoms are color coded: gray, carbon; white, hydrogen; red, oxygen; and blue, nitrogen.

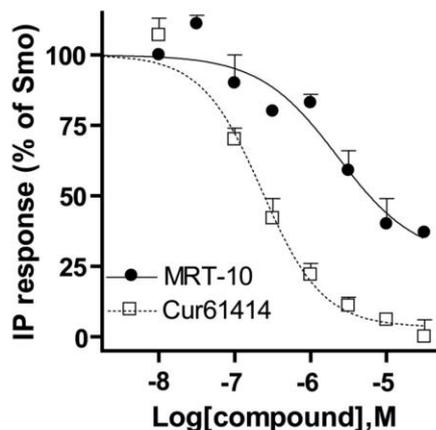


Fig. 4. Effects of Cur61414 and MRT-10 on Smo-induced IP response in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with G_{15} and mouse Smo and further incubated with increasing concentrations of Cur61414 and MRT-10 as described under *Materials and Methods*. The values used for concentration-response curves are expressed as a percentage of Smo-induced IP accumulation over basal level. They are representative of independent experiments ($n = 3-4$) and are the means \pm S.E.M. of triplicates.

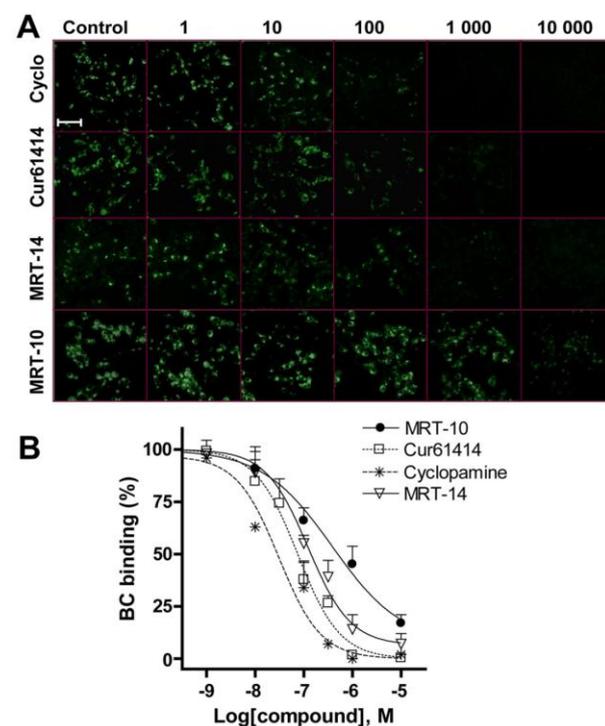


Fig. 5. Inhibition of Bodipy-cyclopamine binding to Smo by MRT-10, MRT-14, Cur61414, and cyclopamine. HEK293 cells were transiently transfected with mouse Smo and incubated with Bodipy-cyclopamine (5 nM) alone (Control) or in the presence of increasing concentrations (nanomolar) of the indicated compounds (Cyclo, cyclopamine). A, Bodipy-cyclopamine binding (green) is visualized using fluorescence microscopy in a representative field (150-200 cells shown; scale bar, 50 μM). B, the concentration-response curves for MRT-10, MRT-14, Cur61414, and cyclopamine were obtained by quantification of the Bodipy-cyclopamine fluorescence in three photographs for each coverslip as described in the *Material and Methods* and as exemplified in Supplemental Table 3. The values are expressed as a percentage of the fluorescence detected in control HEK293 cells incubated with Bodipy-cyclopamine alone. The data shown are the means of triplicates derived from a representative experiment of three.

siently transfected for expression of mouse Smo, as determined by fluorescence microscopy and immunostaining for the Smo protein, but did not bind to cells not expressing Smo (Supplemental Fig. 3). Then, the cells were incubated with 5 nM Bodipy-cyclopamine for 2 h in the presence or absence of various concentrations of MRT-10, cyclopamine, Z''', or Cur61414. At the end of the incubation, the cells were fixed and counterstained with DAPI. MRT-10 blocked Bodipy-cyclopamine binding to cells expressing mouse Smo in a dose-dependent manner (Fig. 5) with an $IC_{50} = 0.5 \mu\text{M}$, which was in good correlation with its IC_{50} in the Shh-light2 and AP assays (Table 1). Cyclopamine, Cur61414, and Z''' abrogated Bodipy-cyclopamine binding to cells expressing mouse Smo (Table 1). All together, these data demonstrate that MRT-10 binds to the Smo receptor at the level of the Bodipy-cyclopamine binding site.

Having established that MRT-10 behaves as a Smo antagonist and thus demonstrated the validity of our pharmacophoric model, we then screened the Asinex database for additional compounds featuring the phenylthiourea moiety. Among the thirty compounds of this second focused library, we identified five additional compounds [*N*-(3-benzamidophenylcarbamothioyl)-3,4-dimethoxybenzamide (MRT-24); 4-methoxy-*N*-(3-(2-methylbenzamido)phenylcarbamothioyl)-3-nitrobenzamide (MRT-29); *N*-(3-(3-biphenylcarbonylthioureido)phenyl)furan-2-carboxamide (MRT-31); *N*-(3-(3-(3,4-dimethoxybenzoyl)thioureido)phenyl)furan-2-carboxamide (MRT-39); *N*-(5-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-2-methylphenylcarbamothioyl)-3,4-dimethoxybenzamide (MRT-42)] that were able to inhibit significantly the responses at micromolar concentrations in the Shh-light2 cell and the AP assays (Table 2). The observed inhibition was in the same range or lower than with MRT-10. These compounds and MRT-10 did not modify by their own the basal response in the AP assays, indicating that they do not display agonist activity (Supplemental Fig. 6).

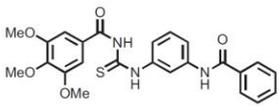
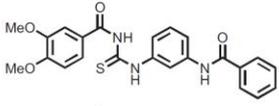
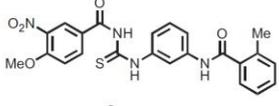
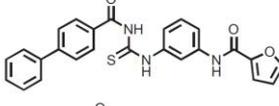
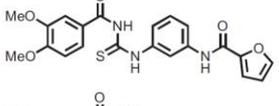
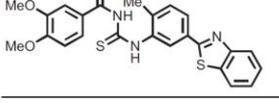
Synthesis and Characterization of the Acylurea MRT-14. Because the acylthiourea moiety seems to be an important fragment for receptor recognition, we decided to synthesize the corresponding acylurea derivative MRT-14 (Fig. 1), which can be obtained directly from MRT-10 by an oxidative desulfuration process. It is noteworthy that MRT-14 inhibited ShhN signaling in Shh-light2 cells in a dose-dependent manner with a 4-fold increased potency compared with MRT-10 ($IC_{50} = 0.16$ versus $0.64 \mu\text{M}$) (Table 1 and Fig. 2). The newly synthesized acylurea exhibited an inhibitory potency comparable with or greater than that of cyclopamine ($0.30 \mu\text{M}$) and Cur61414 ($0.14 \mu\text{M}$). A similar increase in potency for MRT-14 compared with MRT-10 was also observed in the AP assay ($IC_{50} = 0.13$ versus $0.90 \mu\text{M}$) and the IP response ($IC_{50} = 0.6$ versus $2.5 \mu\text{M}$, Table 1). The maximal inhibition of the IP response by MRT-14 ($70 \pm 5\%$, $n = 3$) was comparable with that observed for MRT-10, indicating that this compound is a partial inverse agonist. MRT-14 blocked Bodipy-cyclopamine binding to mouse Smo in a dose-dependent manner with an $IC_{50} = 0.12 \mu\text{M}$. Therefore, MRT-14, like MRT-10, displays Smo antagonist properties. These data also suggest that modifications of MRT-10 structure are amenable to the design of more potent compounds. It is noteworthy that the Hill coefficients of the dose response curves of cyclopamine, Cur61414, Z''', MRT-10, and MRT-14 were

not different in all assays, suggesting a similar interaction of the various molecules with the receptor, whereas analysis of the slope of the concentration-response curves in the Shh-light2 luciferase assay indicated cooperativity ($n_H \approx 2$) (Table 1).

Pharmacophore Models of MRT-10 and MRT-14. MRT-10 and MRT-14 feature the following structural elements: an electron-rich phenyl ring (3,4,5-trimethoxy substituted) linked through an acylthiourea or an acylurea function, respectively, to a second phenyl bearing a phenyl carbamoyl residue. The superposition pattern of MRT-10 to the pharmacophore showed that one of the methoxy oxygen atoms of the ligand matches HBA1, the acylthiourea carbonyl oxygen represents HBA2, and the amide carbonyl oxygen is located within HBA3. The hydrophobic features are fitted by the aromatic rings of MRT-10 or MRT-14. The structural difference between MRT-10 and MRT-14 is also responsible for a slight different superposition to the pharmacophore (Fig. 6B). In fact, as a consequence of the transformation of the acylthiourea into an acylurea, the anchor point of HBA2 is located between the two carbonyl groups of MRT-14, thus allowing it to make a bifurcated hydrogen bond involving the oxygen atoms of both carbonyl groups and sharing the pro-

TABLE 2
Comparison of the inhibition induced by MRT compounds on ShhN-induced Gli-dependent luciferase activity in Shh-light2 cells and SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells

The structure of MRT compounds identified in the first and second virtual library screening procedure are shown. The values correspond to percentage inhibition of the luciferase activity induced by ShhN (5 nM) in the presence of $3 \mu\text{M}$ concentrations of each compound analyzed in the Shh-light2 assay. The values correspond to percentage inhibition of AP activity induced by SAG ($0.1 \mu\text{M}$) in the presence of $10 \mu\text{M}$ of each compound analyzed in C3H10T1/2 cell differentiation assay. Data are the means \pm S.E.M. of at least three independent experiments.

Structure	Compound	Inhibition	
		Shh-light2	C3H10T1/2
%			
	MRT-10	96 ± 1	96 ± 4
	MRT-24	71 ± 7	45 ± 8
	MRT-29	65 ± 4	36 ± 4
	MRT-31	49 ± 6	28 ± 6
	MRT-39	44 ± 2	49 ± 11
	MRT-42	77 ± 2	78 ± 2

jecting point of HBA2 as a common hydrogen bond acceptor counterpart.

Although MRT-10 and Z'''''' apparently display different structures such as an additional central carbamoyl fragment present in MRT-10 with respect to Z'''''', the two compounds fit well with the pharmacophoric model, the six features being satisfied by different functional groups. The structures of MRT-10 and MRT-14 are relatively easy to assemble, and variations on the three aromatic core are amenable to cognate chemistry. Because we have already identified five additional antagonists displaying the acylthiourea moiety, it can be anticipated that other derivatives of MRT-10 and MRT-14 displaying Smo antagonist properties will be obtained. Indeed, exchanging the sulfur with an oxygen atom, a better hydrogen bond acceptor, from MRT-10 to MRT-14, respectively, has already led to an increase of the antagonist potency.

Discussion

Thus, this work highlights the mainstream use of virtual screening protocols based on a pharmacophore for the identification of compound leads for Smo antagonists. On the basis of a pharmacophore for Smo ligands, we have here identified and characterized the mechanism of action of

MRT-10, an acylthiourea, and MRT-14, its acylurea derivative. They represent new leads that expand the chemical domain of Smo inhibitors. Although the crystal structures for the $\beta 1/\beta 2$ -adrenergic receptors and rhodopsin, three members of the GPCR family, have been obtained (Lodowski et al., 2009; Rosenbaum et al., 2009), there are few data describing the identification of new compound leads for GPCRs based on homology modeling of the putative ligand binding site. This site is proposed to be located within the heptahelical bundle of these proteins, which displays some structural conservation (Schalon et al., 2008). Homology model-based virtual screening using ligand docking and target-based scoring have encountered limited success for the identification of mGluR5 or melanin-concentrating hormone receptor modulators (Cavasotto et al., 2008; Radestock et al., 2008). The development of a proper pharmacophore model may be limited not only by accurate pharmacological data from known reference lead molecules but also by the conformational flexibility of GPCRs that might adopt multiple conformations linked to the activation process.

In the case of Smo, this intrinsic plasticity is presumably more complex than originally thought for GPCRs. Smo is proposed to act as a dimer, to be in active and inactive forms linked to Hh signaling, and to be differentially modulated by antagonists within cytoplasmic vesicles or at the primary cilia (Zhao et al., 2007; Rohatgi et al., 2009; Scales and de Sauvage, 2009; Wang et al., 2009b; Wilson et al., 2009). Moreover, agonists such as SAG derivatives and antagonists such as SANT-1 have been proposed to act in an allosteric manner on Smo, suggesting that multiple binding sites for Smo modulators exist at the level of the transmembrane domains (Chen et al., 2002b; Rominger et al., 2009). How Smo is regulated and whether Smo is modulated by an endogenous ligand remains unknown. However, allosteric ligands acting at the level of the heptahelical domain of GPCRs have been characterized recently and represent a novel therapeutic strategy (Conn et al., 2009; Wang et al., 2009a). MRT-10 and MRT-14 block Bodipy-cyclopamine binding to mouse Smo, suggesting that both molecules are acting at the same site or at allosteric sites. Site-directed mutagenesis and molecular modeling studies have allowed the identification of allosteric binding pockets for modulators of GPCRs (Petrel et al., 2004; Simpson et al., 2010). This approach together with binding and functional assays should help to further delineate the mechanism of action of Smo modulators.

In conclusion, we report here a successful virtual screening approach in which we identified and characterized MRT-10 and MRT-14 compounds as novel high-affinity Smo antagonists. These molecules, or more potent Smo inhibitors chemically derived from MRT-10 and MRT-14 that we are currently developing, should help to further understand Smo regulation and its interaction with accessory proteins both in vitro and in vivo. Moreover, our work has important implications for developing novel drugs for cancer therapy.

Acknowledgments

We thank Dr. S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

References

- Barnum D, Greene J, Smellie A, and Sprague P (1996) Identification of common functional configurations among molecules. *J Chem Inf Comput Sci* 36:563–571.

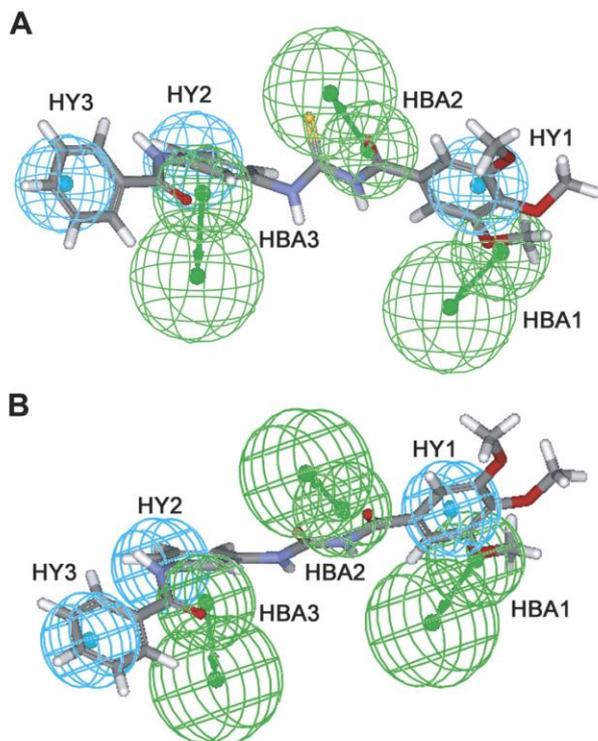


Fig. 6. Pharmacophore model for MRT-10 and MRT-14. Graphical representation of MRT-10 (A) and MRT-14 (B) fitted to the proposed pharmacophoric model for Smo antagonists. Pharmacophoric features are color coded: green for hydrogen bond acceptor groups (HBA1–3) and cyan for hydrophobic regions (HY1–3). HBA features are constituted by a smaller sphere accommodating the hydrogen bond acceptor group, by a directionality vector represented by an arrow, and by a larger sphere intended to allocate the hydrogen bond donor group of the target macromolecule. The atoms are color coded: gray, carbon; white, hydrogen; red, oxygen; blue, nitrogen; yellow, sulfur.

- Borzillo GV and Lipka B (2005) The Hedgehog signaling pathway as a target for anticancer drug discovery. *Curr Top Med Chem* **5**:147–157.
- Cavasotto CN, Orry AJ, Murgolo NJ, Czarniecki MF, Kocsi SA, Hawes BE, O'Neill KA, Hine H, Burton MS, Voigt JH, et al. (2008) Discovery of novel chemotypes to a G-protein-coupled receptor through ligand-steered homology modeling and structure-based virtual screening. *J Med Chem* **51**:581–588.
- Chen JK, Taipale J, Cooper MK, and Beachy PA (2002a) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* **16**:2743–2748.
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, and Beachy PA (2002b) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14071–14076.
- Conn PJ, Christopoulos A, and Lindsley CW (2009) Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov* **8**:41–54.
- Coulombe J, Traiffort E, Loulier K, Faure H, and Ruat M (2004) Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Mol Cell Neurosci* **25**:323–333.
- Gerdes JM, Davis EE, and Katsanis N (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**:32–45.
- Hausmann G, von Mering C, and Basler K (2009) The hedgehog signaling pathway: where did it come from? *PLoS Biol* **7**:e1000146.
- Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ, et al. (2009) Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:14132–14137.
- Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, Hsu C, Ali SA, Ali AS, and Alman BA (2009) Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med* **15**:1421–1425.
- Lodowski DT, Angel TE, and Palczewski K (2009) Comparative analysis of GPCR crystal structures. *Photochem Photobiol* **85**:425–430.
- Mahindroo N, PUNCHIHEWA C, and Fujii N (2009) Hedgehog-Gli signaling pathway inhibitors as anticancer agents. *J Med Chem* **52**:3829–3845.
- Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, and Freyssié JM (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* **108**:3012–3020.
- Masdeu C, Bernard V, Faure H, Traiffort E, and Ruat M (2007) Distribution of Smoothened at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* **18**:395–399.
- Masdeu C, Faure H, Coulombe J, Schoenfelder A, Mann A, Brabet I, Pin JP, Traiffort E, and Ruat M (2006) Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothened to G15. *Biochem Biophys Res Commun* **349**:471–479.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, and Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**:335–344.
- Petrel C, Kessler A, Dauban P, Dodd RH, Rognan D, and Ruat M (2004) Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *J Biol Chem* **279**:18990–18997.
- Radestock S, Weil T, and Renner S (2008) Homology model-based virtual screening for GPCR ligands using docking and target-biased scoring. *J Chem Inf Model* **48**:1104–1117.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, and Scott MP (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:3196–3201.
- Rominger CM, Bee WL, Copeland RA, Davenport EA, Gilmartin A, Gontarek R, Hornberger KR, Kallal LA, Lai Z, Lawrie K, et al. (2009) Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothened receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:995–1005.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**:356–363.
- Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, et al. (2009) Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* **361**:1173–1178.
- Ruiz i Altaba A, Mas C, and Stecca B (2007) The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* **17**:438–447.
- Scales SJ and de Sauvage FJ (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**:303–312.
- Schalch C, Surgand JS, Kellenberger E, and Rognan D (2008) A simple and fuzzy method to align and compare druggable ligand-binding sites. *Proteins* **71**:1755–1778.
- Simpson F, Kerr MC, and Wicking C (2009) Trafficking, development and hedgehog. *Mech Dev* **126**:279–288.
- Simpson LM, Taddese B, Wall ID, and Reynolds CA (2010) Bioinformatics and molecular modelling approaches to GPCR oligomerization. *Curr Opin Pharmacol* **10**:30–37.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, and Beachy PA (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**:1005–1009.
- Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, Darbonne WC, Ahn CP, Scales SJ, and de Sauvage FJ (2009) Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:4254–4259.
- Traiffort E, Angot E, and Ruat M (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* **113**:576–590.
- Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC, Jr., de Sauvage FJ, and Low JA (2009) Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **361**:1164–1172.
- Wang L, Martin B, Brenneman R, Luttrell LM, and Maudsley S (2009a) Allosteric modulators of g protein-coupled receptors: future therapeutics for complex physiological disorders. *J Pharmacol Exp Ther* **331**:340–348.
- Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, and McMahon AP (2009b) Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:2623–2628.
- Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, Xu Y, Chai L, Wichterle H, Kon C, Gatchalian C, Porter JA, Rubin LL, et al. (2003) Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:4616–4621.
- Wilson CW, Chen MH, and Chuang PT (2009) Smoothened adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS One* **4**:e5182.
- Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Aliche B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, et al. (2009) Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* **326**:572–574.
- Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, et al. (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**:406–410.
- Zhao Y, Tong C, and Jiang J (2007) Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**:252–258.

Address correspondence to: Martial Ruat, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR-3294, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR 2118, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology team, 1 Avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France. E-mail: ruat@inaf.cnrs-gif.fr

Résumé de l'article *Roudaut et al., 2011, Mol. Pharmacol.*

La voie de signalisation Hh est primordiale au cours du développement embryonnaire et notamment impliquée dans le maintien et la réparation des tissus chez l'adulte ; pour revue, (*Traiffort et al., 2010*). La transmission des signaux Hh repose sur la fixation de Hh au récepteur à 12 domaines TM Ptc, levant l'inhibition exercée par Ptc sur le récepteur à 7 domaines TM Smo. L'activation de Smo déclenche une cascade de signalisation intracellulaire complexe impliquant les facteurs de transcription Gli et aboutissant à la transcription des gènes cibles de la voie ; pour revue, (*Dessaud et al., 2008*). Chez les mammifères, cette cascade de signalisation a lieu dans une structure particulière de la cellule, le cil primaire. En l'absence de son ligand, Ptc est exprimé dans le cil primaire, tandis que Smo est retenu dans le cytoplasme de la cellule. L'activation de la voie induit la sortie de Ptc et l'entrée de Smo dans le cil ; pour revue, (*Goetz and Anderson, 2010*). L'utilisation d'outils pharmacologiques a permis de montrer que l'activation du récepteur Smo dans le cil primaire nécessite deux étapes successives : la translocation du récepteur, puis son activation proprement dite (*Rohatgi et al., 2009*).

La signalisation Hh est associée au développement de nombreuses tumeurs lorsqu'elle est dérégulée suite à des mutations affectant les composantes de la voie (cas des MB ou des BCC) ou à sa réactivation aberrante dans les tissus périphériques dont elle contrôle normalement l'homéostasie ; pour revue, (*Scales and de Sauvage, 2009*). C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont focalisées sur le développement et la caractérisation d'antagonistes de la voie et en particulier du récepteur Smo. Cependant, comme il a été précédemment mentionné, le traitement de tumeurs par des antagonistes de Smo a présenté quelques limitations. Comme pour le composé GDC-0449, l'apparition de résistance a également été décrite pour un autre antagoniste de Smo actuellement testé en clinique, le composé LDE-225. Le traitement d'allogreffes de MB dans un modèle murin par cet antagoniste, a permis d'identifier des résistances liées à des mutations ponctuelles sur le récepteur Smo ou à une amplification chromosomique de Gli2 (*Buonamici et al., ; Pan S, 2010*); pour revue, (*Heretsch et al., 2010*). Par ailleurs, le cil primaire pourrait également jouer un rôle dans le développement de tumeurs tels que les MB ou les BCC, bien qu'à l'heure actuelle, des zones d'ombre persistent sur le rôle de l'adressage du récepteur Smo au cil primaire dans ces cancers (*Han et al., 2009; Wong et al., 2009*).

Afin d'identifier des molécules issues des nouvelles séries chimiques identifiées, mais plus puissantes que MRT-10 et MRT-14, nous avons réalisé des études de relations structure-activité. L'optimisation de la structure des composés MRT-10 et MRT-14 (*Manetti et al., 2010*) a conduit à la découverte d'une nouvelle famille de composés, des acylguanidines à laquelle le composé MRT-83 appartient. L'investigation de ses propriétés pharmacologiques sur les tests cellulaires classiques a très vite révélé que MRT-83 est un puissant antagoniste de la voie Hh présentant une affinité 20 à 60 fois supérieure à celle de la cyclopamine dans les tests reposant sur l'activation du gène rapporteur Gli-luciférase ou la différenciation des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 en ostéoblastes. De plus, MRT-83 possède un effet anti-prolifératif très important puisqu'il inhibe l'incorporation de thymidine tritiée dans les précurseurs des cellules granulaires du cervelet de rats proliférant sous l'action de la protéine recombinante ShhN (3 nM) ou de l'agoniste de synthèse SAG (0,01 μ M). Dans les deux cas, MRT-83 présente une CI_{50} proche de 3 nM. De manière intéressante, l'utilisation d'une concentration de SAG 10 fois supérieure (0,1 μ M) induit un décalage vers la droite de la courbe d'inhibition par MRT-83, démontrant l'existence d'un antagonisme compétitif. Afin de s'assurer que l'effet inhibiteur du composé MRT-83 est la conséquence de sa fixation sur Smo, nous avons déterminé sa capacité à inhiber la liaison du dérivé fluorescent de la cyclopamine, la BODIPY-cyclopamine dont la liaison à l'heptahélice du récepteur Smo a préalablement été montrée (*Chen et al., 2002a*). MRT-83 est capable d'inhiber cette liaison avec des affinités de 5 ou 15 nM respectivement sur les récepteurs Smo humain ou murin. MRT-83 est donc un puissant antagoniste du récepteur Smo.

En raison de l'homologie du récepteur Smo aux récepteurs Fz, nous avons analysé la capacité de MRT-83 à inhiber une réponse liée à l'activation de ces récepteurs impliqués dans la signalisation Wnt. Contrairement à IWR1, un antagoniste de référence de la voie Wnt, MRT-83 n'a pas d'activité inhibitrice sur la voie Wnt indiquant la spécificité de MRT-83.

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les antagonistes de Smo peuvent être classés en fonction de leur capacité à induire ou non la translocation de Smo au cil primaire. Nous avons utilisé les lignées de cellules murines C3H10T1/2 et humaines NT2, issues de tératocarcinomes, afin d'analyser comment MRT-83 régule l'adressage du récepteur endogène au cil primaire. Nous montrons que, comme d'autres antagonistes de référence tels que le GDC-0449, mais contrairement à la cyclopamine, MRT-83 bloque la translocation du récepteur induite par l'agoniste SAG dans le cil primaire.

Par ailleurs, nous avons caractérisé l'activité de MRT-83 *in vivo* en l'injectant par voie intracérébroventriculaire dans le cerveau de souris adulte. MRT-83 est capable de bloquer dans la ZSV (l'une des principales aires neurogéniques chez l'adulte) la transcription du gène cible *Ptc* induite par la protéine recombinante ShhN. En comparaison, MRT-36, une molécule apparentée à MRT-83 mais dépourvue d'activité sur la voie Hh *in vitro*, ne bloque pas l'induction transcriptionnelle de *Ptc* induite par ShhN. MRT-83 ne modifie pas le niveau d'expression des transcrits de *Ptc* dans une autre aire cérébrale, le septum médian suggérant donc que l'effet de la drogue reste localisé au site d'injection. Enfin, MRT-83 s'adapte également très bien au modèle pharmacophorique initialement établi pour le criblage virtuel d'antagonistes de Smo (Manetti et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats a conduit à la découverte et à la caractérisation d'une nouvelle famille d'acylguanidines antagonistes de Smo, à laquelle le composé MRT-83 appartient. Cette molécule présente une très haute affinité pour le récepteur Smo, comparable à celle des meilleurs antagonistes de Smo connus à ce jour. Sa spécificité d'action au sein de la classe des récepteurs à 7 domaines TM à laquelle Smo appartient, son effet *in vivo*, son affinité pour le récepteur humain et sa capacité à moduler l'adressage de Smo au cil font du MRT-83, un excellent antagoniste dont l'utilisation permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la voie Hh.

Identification and Mechanism of Action of the Acylguanidine MRT-83, a Novel Potent Smoothened Antagonist^S

Hermine Roudaut, Elisabeth Traiffort, Tatiana Gorojankina, Ludwig Vincent, Helene Faure, Angele Schoenfelder, Andre Mann, Fabrizio Manetti, Antonio Solinas, Maurizio Taddei, and Martial Ruat

Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology Team, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2118, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Centre National de la Recherche Scientifique, UPR-3294, Gif-sur-Yvette, France (H.R., E.T., T.G., L.V., H.F., M.R.); Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche-7200, Université de Strasbourg, Illkirch, France (A.S., A.M.); and Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena, Siena, Italy (F.M., A.S., M.T.)

Received October 29, 2010; accepted December 21, 2010

ABSTRACT

There is a clear need to develop novel pharmacological tools to improve our understanding of Smoothened (Smo) function in normal and pathological states. Here, we report the discovery, the mechanism of action, and the in vivo activity of *N*-(2-methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)guanidino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (MRT-83), a novel potent antagonist of Smo that belongs to the acylguanidine family of molecules. MRT-83 fits to a proposed pharmacophoric model for Smo antagonists with three hydrogen bond acceptor groups and three hydrophobic regions. MRT-83 blocks Hedgehog (Hh) signaling in various assays with an IC₅₀ in the nanomolar range, showing greater potency than the reference Smo antagonist cyclopamine. MRT-83 inhibits Bodipy-cyclopamine binding to human and mouse Smo but does not modify Wnt signaling in human embryonic kidney 293 transiently transfected with a Tcf/Lef-dependent Firefly lu-

ciferase reporter together with a *Renilla reniformis* luciferase control reporter. MRT-83 abrogates the agonist-induced trafficking of endogenous mouse or human Smo to the primary cilium of C3H10T1/2 or NT2 cells that derive from a pluripotent testicular carcinoma. Stereotaxic injection into the lateral ventricle of adult mice of MRT-83 but not of a structurally related compound inactive at Smo abolished up-regulation of *Patched* transcription induced by Sonic Hedgehog in the neighboring subventricular zone. These data demonstrate that MRT-83 efficiently antagonizes Hh signaling in vivo. All together, these molecular, functional and biochemical studies provide evidence that MRT-83 interacts with Smo. Thus, this novel Smo antagonist will be useful for manipulating Hh signaling and may help develop new therapies against Hh-pathway related diseases.

Introduction

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is implicated in developmental processes and in multiple physiological re-

sponses in adult tissues, including the control of brain functions. Hh pathway activation in vertebrates requires binding of a Hh peptide to the 12-pass transmembrane protein Patched (Ptc), which, in the absence of its ligand, represses the activation of the seven-pass transmembrane protein Smoothened (Smo), a proposed member of the G-protein-coupled receptor (GPCR) family. Upon Smo activation, a complex signaling cascade is initiated, leading to activation of Gli transcription factors and gene transcription (Beachy et al., 2004; Dessaud et al., 2008; Traiffort et al., 2010). Thus, most Smo-associated responses have been linked to tran-

This work was supported by a grant from La Ligue Contre le Cancer (Comité des Yvelines); and the Neuropole de Recherche Francilien [doctoral fellowship 248890] (to H.R.).

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/mol.110.069708.

^S The online version of this article (available at <http://molpharm.aspetjournals.org>) contains supplemental material.

ABBREVIATIONS: Hh, Hedgehog; Ptc, Patched; Smo, Smoothened; GPCR, G-protein-coupled receptor; BCC, basal cell carcinoma; MRT-83, *N*-(2-methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)guanidino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide; Cur61414, *N*-((3*S*,5*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-(piperazine-1-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(3-methoxybenzyl)-3,3-dimethylbutanamide; MRT-36, 3,4-dimethoxy-*N*-(phenylcarbamoithioyl)benzamide; SVZ, subventricular zone; BC, Bodipy-cyclopamine; IWR1, 4-(1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-8-quinolinyl-benzamide; SAG, Smoothened agonist; Shh, Sonic hedgehog; ShhN, Sonic hedgehog N terminus; DMSO, dimethyl sulfoxide; HEK, human embryonic kidney; FCS, fetal calf serum; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; GCP, granule cell precursor; MS, medial septum; LV, lateral ventricle; ISH, in situ hybridization.

scriptional activities mediated by Hh signaling. However, recent data suggest that some physiological responses do not involve gene transcription and are observed upon short activation of Smo (Yam et al., 2009; Traiffort et al., 2010). Trafficking of Hh signaling components at the primary cilium is proposed to regulate Hh pathway activities. In the absence of its ligand, Ptc is localized at the primary cilium as evidenced in neural tube cells during development (Rohatgi et al., 2007). Upon Hh binding, Ptc traffics out of the cilium and Smo translocates into it (Corbit et al., 2005). The biochemical and molecular mechanisms regulating Smo trafficking are complex and presumably involve multiple states of Smo that might be modulated by Ptc itself. Small molecules acting at Smo have been shown to modify Smo trafficking at the primary cilium, and the mechanism of antagonist action to block Smo translocation at the primary cilium has been proposed to be relevant in cancer therapies (Rohatgi et al., 2009; Wang et al., 2009; Wilson et al., 2009).

During the last decade, autocrine and paracrine Hh signaling have been linked to cancers, and molecules aimed at inhibiting the pathway have been proposed to be of interest for alleviating the associated symptoms (Scales and de Sauvage, 2009). The Hh pathway is activated by oncogenic Ptc and Smo mutations observed in basal cell carcinoma (BCC) or medulloblastoma. Such Hh pathway activation, which is ligand-independent, is also observed in Gorlin syndrome, in which patients present Ptc-inactivating mutations that render them highly susceptible to the development of BCC, medulloblastoma, and rhabdomyosarcoma (Barakat et al., 2010). Characterization of Hh component trafficking to the primary cilium is of interest for further clarifying the role of Hh signaling in various types of cancers.

Cyclopamine, a natural and teratogenic compound, and several other small-molecule Hh pathway inhibitors have been developed and proposed for the treatment of cancers associated with dysfunctions of Hh signaling. Most of these molecules, but not all, target Smo (Scales and de Sauvage, 2009; Peukert and Miller-Moslin, 2010). The initial trials for treating BCC using cyclopamine in humans have not been followed up. However, cyclopamine derivatives have been developed and are under investigation for the treatment of various Hh-linked cancers. Other Smo antagonists, such as *N*-((3*S*,5*S*)-1-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-(piperazine-1-carbonyl)pyrrolidin-3-yl)-*N*-(3-methoxybenzyl)-3,3-dimethylbutanamide (Cur61414) or HhAntag691 have been shown to induce remission in animal models of medulloblastoma or BCC (Scales and de Sauvage, 2009). Clinical trials for treating BCC and medulloblastoma in humans have been conducted with the small molecule GDC-0449 (vismodegib), which displays nanomolar potency for inhibiting Smo. However, such molecules may have some limitations associated with Smo mutations leading to treatment resistance, as reported recently in one case of medulloblastoma (Rudin et al., 2009; Von Hoff et al., 2009; Yauch et al., 2009). Still, Smo inhibitors may have other clinical applications, such as the treatment of unwanted hair related to their inhibiting activity on hair growth (Li et al., 2010). Pharmacological inhibition of Hh signaling using a Smo antagonist has also been shown to reduce the severity of osteoarthritis in mice models suggesting a therapeutic approach to cartilage degeneration (Lin et al., 2009).

Herein, we report our efforts to identify and characterize novel small molecules inhibiting Smo with high potency. We have synthesized *N*-(2-methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)guanidino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (MRT-83), a novel acylguanidine derivative that shows nanomolar antagonist potency toward Smo in various Hh assays. MRT-83 also blocks Hh-mediated Ptc transcription in the subventricular zone (SVZ) of adult mice *in vivo* indicating that this inhibitor should be useful for investigating Hh pathway-dependent responses in both normal and pathological conditions.

Materials and Methods

Drugs. Cyclopamine and Bodipy-cyclopamine (BC) were from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). 3,4-Dimethoxy-*N*-(phenylcarbamothioyl)benzamide (MRT-36) was from ASINEX (Rijswijk, The Netherlands). 4-(1,3,3*a*,4,7,7*a*-Hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2*H*-isoindol-2-yl)-*N*-8-quinolinyl-benzamide (IWR1; Chen et al., 2009) was from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). SAG was synthesized as described previously (Martínez et al., 2006). Details of the synthesis and structural characterization of MRT-83 are available upon request. ShhN was from R&D Systems (C24II) for [³H]thymidine incorporation or was provided by Dr. D. Baker (Biogen Idec, Boston, MA) for the other experiments. SAG and cyclopamine were dissolved in ethanol, and other compounds were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM. [³H]Thymidine was from PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Courtaboeuf, France).

Pharmacophoric Model of MRT-83. We constructed a pharmacophoric model of MRT-83 based on chemical structures of Smo inhibitors as described previously (Manetti et al., 2010).

Plasmids. The plasmids pRK5 and pRK5-SP-myc-Smo encoding the mouse Smo sequence have been described previously (Manetti et al., 2010) and are referred to in the text as pRK5 and mouse Smo, respectively. The Wnt reporter plasmid M50 Super8xTOPFlash containing seven Tcf/Lef binding sites in the firefly luciferase promoter, the pLNCWnt-3aHA, and the control pRL-TK *Renilla reniformis* luciferase were obtained from Addgene (Cambridge, MA).

Antibodies. A previously described polyclonal rabbit antiserum against rat Smo was used (Masdeu et al., 2007). The mouse anti-acetylated tubulin antibody and the mouse monoclonal anti-c-myc antibody were obtained from Sigma; the goat anti-mouse Alexa Fluor 546 antibody was obtained from Invitrogen (Leiden, The Netherlands); and the goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate antibody from Millipore Bioscience Research Reagents (Temecula, CA).

Cell Culture and Transfection. Zeocin, Geneticin (G418), penicillin-streptomycin, and all cell culture media or products were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) except as stated otherwise. HEK293 (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and C3H10T1/2 (American Type Culture Collection) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) as described previously (Manetti et al., 2010). The Shh-light2 cells (from Pr. P. A. Beachy, Stanford University, Stanford, CA) and HEK-hSmo cells stably expressing human Smo were cultured in the same medium supplemented with 0.4 mg/ml G418 and 0.150 mg/ml Zeocin or 0.5 mg/ml G418, respectively. NT2 cells (American Type Culture Collection) were cultured in Opti-MEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS. HEK293 cells were transiently transfected by electroporation using 4 μg of mouse Smo and 6 μg of pRK5 for BC binding. For Tcf/Lef-dependent luciferase reporter assay, HEK293 were transfected by FuGENE (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with 0.1 μg of Tcf/Lef reporter, 0.25 μg of *R. reniformis* luciferase and, as indicated in the legend to Fig. 3, with 0.1 μg of Wnt3a plasmids, supplemented to 0.4 μg/well with pRK5 plasmid. Cells were distributed into six-well plates containing glass coverslips coated with 0.05 mg/ml poly-D-lysine (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) for BC binding, Smo ciliary accumulation, and immunofluorescence experiments, or alternatively

into 96- or 24-well plates for [³H]thymidine analysis and Tcf/Lef-dependent luciferase reporter assay.

Stable Expression of Human Smo in HEK293 Cells. To generate the myc-human Smo construct, the human Smo sequence encoding the full-length protein devoid of the first 31 amino acids was amplified by polymerase chain reaction from the pCR2.1-hSmo vector kindly provided by Dr I. Mus-Veteau (University Nice-Sophia Antipolis, France), subcloned into pRK5-SP-myc vector (Manetti et al., 2010), using the restriction sites MluI and Sall to give pRK5-SP-myc-hSmo plasmid. The nucleotide sequence of hSmo construct was verified by DNA sequencing. HEK293 cells were transfected using FuGENE with pRK5-SP-myc-hSmo together with the expression vector pcDNA3 (Invitrogen) containing the selection marker neomycin. Transfected cells were selected with 2 mg/ml G418 and one clone (HEK-hSmo) selected for its expression of Smo by immunofluorescence using anti-c-myc antibodies was further characterized.

Gli-Dependent Luciferase Reporter Assay. Shh-light2 cells were incubated for 40 h with ShhN (5 nM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described previously (Manetti et al., 2010).

Tcf/Lef Dependent Luciferase Reporter Assay. After transfection (1 h) with the Wnt reporter and the control *R. reniformis* luciferase plasmids, HEK293 cells were incubated with MRT-83 (5 μM), IWR1 (10 μM), or vehicle (DMSO) alone, and luciferase activities were measured 48 h later. Data are Firefly luciferase activity reported relative to the *R. reniformis* luciferase control activity. The MRT-83 compound did not significantly modify the *R. reniformis* luciferase activity at 5 μM.

Alkaline Phosphatase Assay. C3H10T1/2 cells were incubated for 6 days in the presence of SAG (0.1 μM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described previously (Manetti et al., 2010).

BC Binding. The protocol was adapted from (Manetti et al., 2010). BC (green) and DAPI (blue; Vector Laboratories, Burlingame, CA) signals were analyzed in three to four representative fields per coverslip (~800 cells/field). The fluorescence intensity of transfected cells determined in presence of BC (5 nM) alone or in the presence of the drugs, over the basal fluorescence measured in the absence of BC was quantified and divided by the area occupied by the nuclei (DAPI staining) in the field. Data were expressed as percentage of fluorescence intensity observed with BC alone.

Primary Cerebellar Cultures. Isolation of cerebellar granule cell precursors (GCPs) and quantitation of [³H]thymidine incorporation were performed as described previously (Charytoniuk et al., 2002a).

Ciliary Smo Accumulation Assay. The protocol was adapted from that of Rohatgi et al. (2009). After 24 h of culture, C3H10T1/2 or NT2 cells were switched to Dulbecco's modified Eagle's medium or Opti-MEM, respectively, containing 0.5% FCS in the presence of SAG, MRT-83, cyclopamine, or vehicle solutions for 18 h. Then, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) in PBS for 20 min, washed, incubated with a 0.05% Triton X-100 PBS solution for 5 min, and washed in a blocking gelatin-PBS (0.2%) solution. Primary antibodies (1:2000 for anti-Smo, 1:5000 for anti-acetylated tubulin) were diluted in the blocking solution supplemented with 1% normal goat serum. Cells were incubated for 2 h at room temperature. After washes in gelatin-PBS, secondary antibodies were added (1:1000) in fresh blocking solution for 90 min at room temperature. Cells were finally washed in gelatin-PBS solution and mounted in Vectashield DAPI. Acetylated tubulin (red) and Smo (green) were analyzed in three or four representative fields by coverslip (100 cells/field). In each field, the percentage of cells expressing cilium remained stable. The percentage of ciliary Smo reflects the number of cells that display a Smo/acetylated tubulin colocalization.

Data Analysis. Means and S.E.M. were calculated using Excel 2003 (Microsoft Corp, Redmond, WA). Curve fitting and IC₅₀ determinations were performed using Prism 4.03 (GraphPad Software,

San Diego, CA). The BC fluorescence was analyzed with the Simple-PCI software (Hamamatsu Corporation, Massy, France).

Animals and Treatment. The protocol of injection has been done according to a procedure described previously (Angot et al., 2008). Four groups of six animals received 5 μl of 45% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Sigma) PBS solution containing 0.9 μg of ShhN alone or in the presence of MRT-83 (200 ng) or MRT-36 (110 ng). A control group received 5 μl of 45% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin solution alone. All groups were analyzed 48 h after the injection. All procedures were carried out in accordance with the European Community Council Directive (86/806/EEC) for the care and use of laboratory animals.

In Situ Hybridization. The experiments using Ptc-specific riboprobes were performed as described previously (Angot et al., 2008).

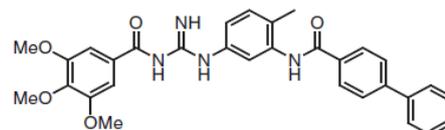
Counting and Statistical Analysis. The number of Ptc-positive cells was counted between bregma levels +0.18 and +0.38 mm along the SVZ or in a representative field of the medial septum (MS) on each section. Analysis was carried out on at least three sections per animal. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test. Statistical significance was considered for *p* < 0.05.

Microscopy. Both cell cultures and tissue slices were analyzed with a DMRXA2 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a Photometric Cool-Snap camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany). Cell culture images for counting were taken with a 20× objective in black and white for the BC binding analysis, with 10× objective for the counting of Ptc-positive cells on slices, and magnification or fluorescent images were taken with a 40× objective.

Results

Potency of MRT-83. We recently described the synthesis and characterization of a novel series of molecules displaying antagonist properties toward the mouse Smo receptor. Among these molecules, the acylthiourea MRT-10 and its corresponding acylurea derivative MRT-14 were the most potent (Manetti et al., 2010). They displayed a potency comparable with that of the steroidal alkaloid cyclopamine extracted from corn lilies, which has been widely used for blocking the Hh pathway both in vitro and in vivo (Scales and de Sauvage, 2009). During our efforts to identify more potent high-affinity Smo antagonists, we have optimized the structure of MRT-10 and MRT-14 and we have now developed and synthesized MRT-83, which belongs to a new family of acylguanidine molecules (Fig. 1).

We have investigated the antagonist properties of MRT-83 toward Hh pathway activation in various cell-based assays and compared its potency with that of cyclopamine. Thus, the antagonist properties of MRT-83 and cyclopamine were determined in Shh-light2 cells, a NIH3T3 cell line stably transfected with a Gli-dependent Firefly luciferase reporter widely used for identifying Hh inhibitors (Taipale et al., 2000). These cells were stimulated for 40 h with ShhN (5 nM) in the presence or absence of the drugs in parallel experiments. We also evaluated their ability to inhibit SAG (0.1 μM)-induced differentiation of the mesenchymal pluripotent C3H10T1/2 cells into alkaline



MRT-83

Fig. 1. Chemical structure of MRT-83.

phosphatase-positive osteoblasts, a response that involves activation of Smo (Hyman et al., 2009). Both molecules were found to block these responses (Fig. 2, A and B), and analysis of the dose-response curves led to an $IC_{50} \approx 10$ nM for MRT-83, which was very similar in the two assays (Table 1). These data indicate that MRT-83 is a potent Hh inhibitor that displays a greater potency (20–60-fold) than cyclopamine.

It has been demonstrated previously that cerebellar GCPs proliferate in response to Hh activation, an effect that can be inhibited by Smo antagonists (Charytoniuk et al., 2002a; Romer et al., 2004). To further investigate the antagonist properties of MRT-83 toward this response, we analyzed its potency to inhibit rat GCP proliferation in primary culture as measured by [3 H]thymidine incorporation. Increasing concentrations of ShhN or SAG to rat GCPs caused a dose-dependent increase in [3 H]thymidine incorporation over basal level (Supplemental Fig. 1). In these experiments, the EC_{50} values for ShhN and SAG were 3.2 ± 0.3 and 4.6 ± 0.2 nM, respectively. Neither MRT-83 nor cyclopamine (1 μ M) modified significantly the basal level of [3 H]thymidine incorporation in rat GCPs (data not shown). However, MRT-83 displayed full antagonist properties with an IC_{50} (~ 3 nM) for inhibiting ShhN (3 nM)-induced proliferation of rat GCPs (Fig. 2C and Table 1). MRT-83 also blocked SAG (0.01 μ M)-induced proliferation of GCPs ($IC_{50} \approx 6$ nM) (Fig. 2C). When the same experiment was repeated in the presence of a ten fold higher SAG concentration (0.1 μ M), the dose-response curve was shifted to the right and the IC_{50} for MRT-83 was increased as expected for a competitive antagonism. MRT-83 resulted in IC_{50} values of 66 nM under these conditions, corresponding to an 11 fold IC_{50} shift, suggesting Smo as the target of MRT-83 (Fig. 2C). MRT-83 was consistently a better antagonist than cyclopamine in these tests (Table 1).

MRT-83 Binding to Cells Expressing Mouse and Human Smo. To further investigate the binding properties of

MRT-83 to Smo, we analyzed whether it can compete with BC, which interacts with Smo at the level of its heptahelical bundle (Chen et al., 2002b). First, we showed that BC bound to HEK293 cells stably expressing the human Smo (HEK-hSmo), as determined by fluorescence microscopy and immunostaining for the Smo protein (Supplemental Fig. 2), whereas BC did not bind to HEK293 cells not transfected with human Smo (data not shown). Then, the cells were incubated with 5 nM BC for 2 h in the presence or absence of various concentrations of MRT-83. At the end of the incubation, the cells were fixed and counterstained with DAPI. MRT-83 blocked BC binding to HEK-hSmo cells in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 4.6 nM (Fig. 2, D and E, and Table 1). We also conducted similar experiments in HEK293 cells transiently transfected for expression of mouse Smo as described previously (Manetti et al., 2010). MRT-83 abrogated BC binding to cells expressing mouse Smo with an IC_{50} of 14 nM (Table 1), which was in good correlation with its IC_{50} in the Shh-light2 and alkaline phosphatase assays (Table 1). All together, these data demonstrate that MRT-83 is a potent antagonist of human and mouse Smo receptors.

MRT-83 Does Not Block Wnt Signaling. Smo presumably belongs to the family of GPCRs and displays the highest homology with the serpentine Frizzled receptors that are responsible for Wnt signaling (van Amerongen and Nusse, 2009). To further investigate the potential activities of MRT-83 toward the Wnt pathway, we subsequently evaluated the ability of MRT-83 to modulate Wnt signaling in HEK293 transiently transfected with a Tcf/Lef-dependent Firefly luciferase reporter together with an *R. reniformis* luciferase control reporter (Fig. 3). Tcf/Lef-dependent luciferase activity was stimulated (around 40 times the basal level) in these cells when they were cotransfected with a Wnt3a plasmid compared with a control plasmid. This activity was completely blocked by the Wnt antagonist IWR1 (10

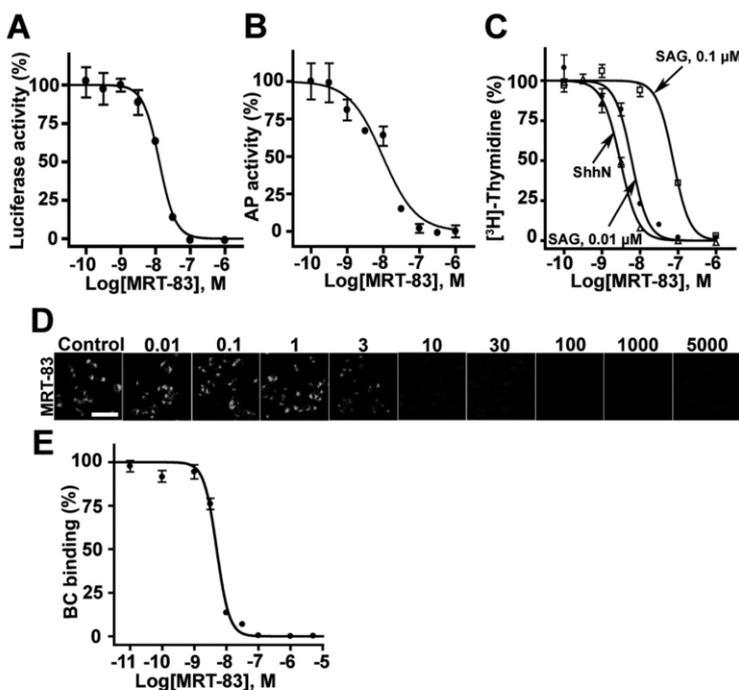


Fig. 2. MRT-83 inhibits Hh pathway activation in cell-based assay and BC binding to human Smo. A to C, activity of MRT-83 on ShhN-induced Gli-dependent luciferase activity in Shh-light2 cells (A), SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells (B), and ShhN and SAG-induced proliferation of rat cerebellar GCPs (C). Inhibition curves were generated using increasing concentrations of MRT-83 in the presence of ShhN (5 nM; A) or (3 nM; C, Δ), SAG (0.1 μ M) (B and C, \square), or SAG (0.01 μ M) (C, \bullet). The values are expressed as a percentage of the maximal response induced by ShhN or SAG, respectively. D, HEK-hSmo cells stably expressing human Smo were incubated with BC (5 nM) alone (Control) or in the presence of increasing concentrations (nanomolar) of MRT-83. BC binding (green) is visualized using fluorescence microscopy in a representative field (100–150 cells are shown; scale bar = 50 μ M). E, the concentration-response curve for MRT-83 was obtained by quantification of the BC fluorescence in three photographs for each coverslip as described under *Materials and Methods*. The values are expressed as percentage of the fluorescence detected in control HEK-hSmo cells incubated with BC alone. The data are representative of independent experiments ($n = 3$ –10) and are the means \pm S.E.M. of triplicates (A and E) or quadruplicates (B and C).

TABLE 1

Compared activities of MRT-83 and cyclopamine in different cell-based assays

IC₅₀ values of the compounds were determined on Gli-dependent luciferase reporter activity induced by ShhN (5 nM) in Shh-light2 cells (1); AP activity induced by SAG (0.1 μM) in C3H10T1/2 cells (2); Proliferative activity of cerebellar GCPs induced by ShhN (3 nM) determined by [³H]thymidine incorporation (3); BC binding to HEK293 cells stably expressing human Smo (hSmo) (4); or transiently expressing mouse Smo (mSmo) (5). Data are the means ± S.E.M. of at least three independent experiments.

	IC ₅₀				
	Shh-Light2 (1)	C3H10T1/2 (2)	GCPs (3)	BC Binding	
				hSmo (4)	mSmo (5)
	nM				
MRT-83	15 ± 2	10 ± 2	2.9 ± 0.5	4.6 ± 0.7	14 ± 2
Cyclopamine	300 ± 50	620 ± 30	100 ± 6	64 ± 17	50 ± 10

μM), as expected (Chen et al., 2009). However, MRT-83 (5 μM) did not modify significantly the basal level or the Wnt3a Tcf/Lef-dependent luciferase activity (Fig. 3).

Smo Trafficking at the Primary Cilium Is Inhibited by MRT-83. Smo activation was recently proposed to require a two-step mechanism including the accumulation of Smo at the primary cilium followed by an essential second activation step. These steps can be pharmacologically separated through the use of selective inhibitors and might be crucial for Smo antagonist efficacy (Rohatgi et al., 2009). To further examine the mechanism of action of MRT-83, we investigated the ability of MRT-83 to modulate the trafficking of endogenous mouse or human Smo to the primary cilium of C3H10T1/2 or of NT2 cells that derive from a pluripotent human testicular carcinoma (Fig. 4 and Supplemental Fig. 3). In basal culture conditions, Smo was not detected at the primary cilium visualized by the acetylated tubulin positive signal in both cell lines (Fig. 4A, and Supplemental Fig. 3A). After treatment with the Smo agonist SAG (1 μM) for 18 h, Smo accumulation was induced at the primary cilium as shown by the colocalization of acetylated tubulin and Smo-positive immunolabelings. This effect was blocked when the cells were incubated in the presence of MRT-83 (5 μM), whereas this compound did not promote Smo-positive signals at the primary cilium when it was administered alone. Under the same experimental conditions, cyclopamine (5 μM) was as effective as SAG (1 μM) for inducing accumulation of Smo-positive signals at the primary cilium, as evidenced in C3H10T1/2 cells (Supplemental Fig. 4, A and B), which is in agreement with its ability to promote Smo trafficking

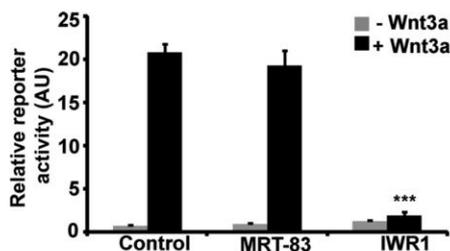


Fig. 3. MRT-83 does not block Wnt signaling. HEK293 cells were transiently transfected with plasmids containing Tcf/Lef-Luciferase reporter and *R. reniformis* luciferase control and, as indicated, with Wnt3a. MRT-83 (5 μM), IWR1 (10 μM), or vehicle (DMSO) alone was added into the medium 1 h after transfection, and luciferase activities were measured 48 h later. The values are expressed as arbitrary units (AU). The data are representative of independent experiments ($n = 3$) and are the means ± S.E.M. of quadruplicates. ***, $p < 0.005$.

in other cells (Rohatgi et al., 2009). Thus, these data demonstrate that MRT-83 abrogates Smo ciliary translocation promoted by SAG.

MRT-83 Inhibits Shh Signaling in the Subventricular Zone of the Lateral Ventricle. The SVZ bordering the lateral ventricle (LV) constitutes one of the main neurogenic areas of the brain. Shh, Ptc and Smo have been identified within this niche (Charytoniuk et al., 2002b; Ahn and Joyner, 2005; Palma et al., 2005; Angot et al., 2008). It offers a convenient in vivo model to analyze Hh pathway regulation as previously shown by the up-regulation of Ptc transcription after the intracerebroventricular injection of ShhN (Charytoniuk et al., 2002b; Loulier et al., 2006). To test further whether MRT-83 was able to modulate this well characterized Hh-associated response in vivo, we performed stereotaxic injections of ShhN in the presence or in the absence of MRT-83 into the LV of adult mice as described under *Materials and Methods*. We investigated also the effect of MRT-36, a compound structurally related to MRT-83 but without significant activity toward Smo (Supplemental Fig. 4). As expected, a strong induction of Ptc transcription visualized by intense ISH-associated signals was observed in the SVZ of animals injected with ShhN alone compared with vehicle-treated animals (Fig. 5, B and C), which was further confirmed by quantification of Ptc⁺ cells (vehicle, 5.1 ± 2.2 ; ShhN, 30 ± 4 Ptc⁺ cells/section; total number of counted slices, $n = 10$) (Fig. 5F). Animals treated with ShhN in the presence of MRT-83 were as healthy as those of the other groups but up-regulation of Ptc transcription in the SVZ of these animals was no longer observed in agreement with a complete inhibition of ShhN-mediated effects (8.7 ± 2.4 Ptc⁺ cells/section, $n = 9$) and was not different from vehicle-mediated effects. Conversely, the coinjection of MRT-36 did not alter ShhN-induced Ptc transcription in a significant manner (23 ± 4 Ptc⁺ cells/section, $n = 8$; Fig. 5, D–F). Ptc expression

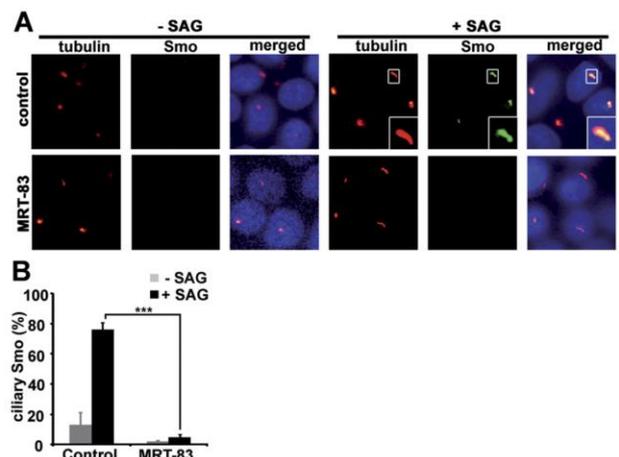


Fig. 4. MRT-83 abrogates Smo translocation to the primary cilium. NT2 cells untreated or treated with SAG (1 μM) alone or in the presence of MRT-83 (5 μM) were stained with antibodies against endogenous Smo (green), acetylated tubulin (red), and DAPI (blue). A, in the absence of SAG, Smo is not detected at the cilium. Cell exposure to SAG induces Smo trafficking to the cilium as identified by immunofluorescence, which is abolished by MRT-83. MRT-83 by itself does not induce Smo trafficking to the primary cilium. B, quantification of the percentage of Smo-positive cilium after treatment with the indicated compounds for 18 h. Values are the means of three to four independent experiments ± S.E.M. ***, $p < 0.005$.

profile in the MS was not altered by vehicle or ShhN injection in the SVZ or by the coinjection of Shh with MRT-36 or MRT-83 (Fig. 5, B–E, bottom panels; Fig. 5G). These data demonstrate that MRT-83 antagonizes Shh-mediated pathway activation in vivo in the SVZ.

Pharmacophoric Model of MRT-83. We have recently built a pharmacophoric model of Smo antagonists constituted by six features represented by three hydrogen bond acceptor groups and three hydrophobic regions (Manetti et al., 2010). MRT-83 features the following structural elements: an electron-rich phenyl ring (3,4,5-trimethoxy-substituted) linked through an acylguanidine function, to a second phenyl bearing a phenyl carbamoyl residue (Fig. 6). Superposition of MRT-83 to the model shows a perfect fit between the chemical portions of the inhibitor and the pharmacophoric features. In fact, the fit value, describing the complementarity between chemical portions of MRT-83 and the features of the model, is 5.2 of a maximum value of 6.0 (a six-feature pharmacophoric model allows, by definition, a maximum fit value of 6.0). The oxygen atom of one of the methoxy groups maps HBA1, whereas the oxygen atoms of the carbonyl moieties

correspond to HBA2 and HBA3. Each of the hydrophobic regions is mapped by a phenyl ring of MRT-83. The fact that the pharmacophoric model is fully superposable to MRT-83 correlates with the high potency found for this compound.

Discussion

In this study, we have reported the functional activity and the mechanisms of action of MRT-83, a potent acylguanidine that belongs to a novel family of Smo antagonists. The Hh pathway plays a major role in stem cell maintenance both during embryogenesis and in adult tissues, and perturbations of this pathway have been associated with human diseases, including a diverse set of cancers. The Smo receptor is an essential element in Hh signaling and Smo has been proposed as a molecular target for the action of antagonists aimed at blocking the Hh pathway in those cancers (Beachy et al., 2004; Scales and de Sauvage, 2009; Barakat et al., 2010; Peukert and Miller-Moslin, 2010).

The small-molecule inhibitor GDC-0449 holds great promise for treating metastatic BCC and medulloblastoma driven by mutations in the Hh pathway as well as several Hh-dependent cancers not linked to Hh pathway mutations (Scales and de Sauvage, 2009). However, a Smo mutation (D473H) arising within the sixth putative transmembrane domain of Smo and disrupting the ability of GDC-0449 to bind Smo was found in the tumor of a patient with medulloblastoma who had relapsed after an initial response to the drug (Rudin et al., 2009; Von Hoff et al., 2009). A Smo mutation occurring at a homologous position in mouse Smo was also observed in a GDC-0449-resistant mouse model of medulloblastoma (Yauch et al., 2009). Therefore, the development and characterization of novel Smo antagonists have valuable therapeutic interests.

Using a pharmacophoric model-based virtual screening strategy, we have recently reported the identification of the acylthiourea MRT-10 and the acylurea MRT-14 as members of novel families of Smo antagonists (Manetti et al., 2010). These new leads have rapidly allowed us to develop a new series of Smo inhibitors with high potency to which MRT-83

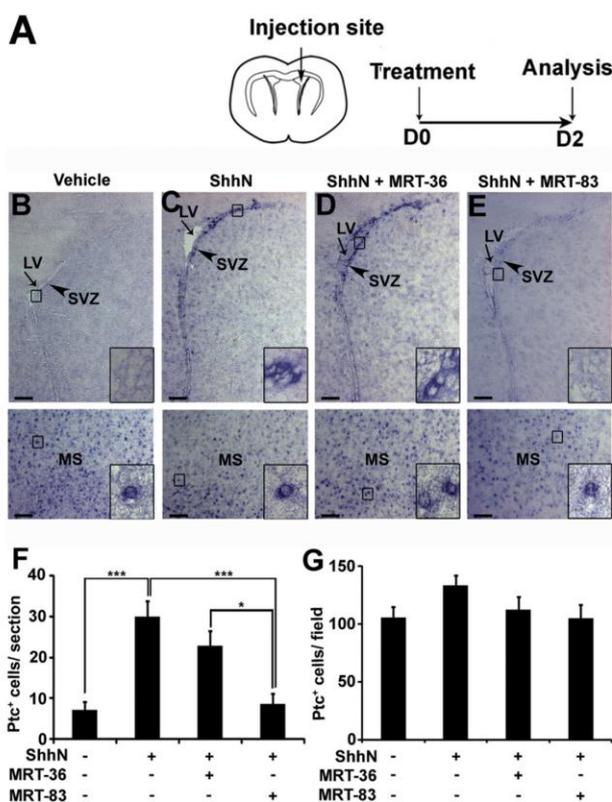


Fig. 5. MRT-83 antagonizes Shh signaling in vivo. A, scheme of the experimental protocol. B to E, MRT-83 but not MRT-36 antagonizes the up-regulation of Ptc transcription induced by ShhN in vivo in the SVZ of the LV. B to E, ISH experiments visualize Ptc-expressing cells (dark blue) on coronal brain sections (B–E) from control mice injected with vehicle (B) and from animals that have received ShhN (0.9 μ g) alone (C) or in the presence of MRT-36 (110 ng; D) or MRT-83 (200 ng; E). B to E, bottom, show the corresponding MS area where the pattern of Ptc expression is not modified. Quantification of the number of Ptc-expressing cells in the SVZ (F) or MS (G) for each experimental condition. Data are the means \pm S.E.M. from five or six mice per group. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$. Scale bars, 200 μ m.

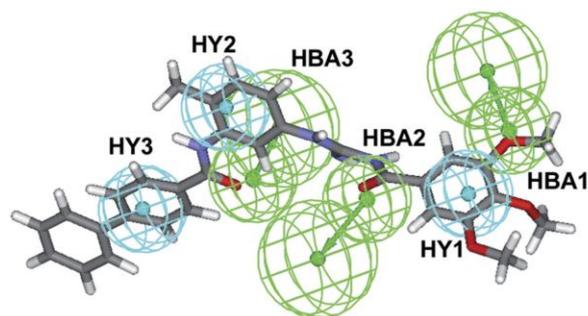


Fig. 6. Pharmacophoric model of MRT-83. Graphical representation of MRT-83 fitted to the proposed pharmacophoric model for Smo antagonists. Chemical features of MRT-83 are able to perfectly map all the features of the model. Features are color-coded: cyan, hydrophobic regions (HY1–3); green, hydrogen bond acceptor groups (HBA1–3). Each of the HBA features is constituted by two green spheres: the smaller is filled by the hydrogen bond acceptor atom of the inhibitor, and the larger sphere is located at the end of a vector and represents the region at which the corresponding hydrogen bond donor group of the receptor counterpart should be located. The atoms are color-coded: gray, carbon; white, hydrogen; red, oxygen; and blue, nitrogen.

belongs (this work and data not shown). MRT-83 perfectly fits with the proposed pharmacophoric model for Smo antagonists that we have recently proposed. With respect to MRT-10 or MRT-14, MRT-83 features the following structural differences: 1) a guanidine replaces the thiourea or urea functions; 2) a methyl residue is introduced in the central phenyl ring; and 3) the lateral amide is formed with biphenylcarboxylic acid. These discrete structural differences may account for the increased potency of MRT-83 observed in various *in vitro* Hh-based assays (Manetti et al., 2010). It is noteworthy that MRT-83 inhibits BC binding to human Smo and ShhN-mediated proliferation of GCPs with a nanomolar potency similar to that of GDC-0449 (Robarge et al., 2009). Therefore, MRT-83 seems to be one of the most potent Smo antagonists known so far. Within the family of GPCRs, cross-talk pharmacology between members displaying significant homology has been observed, such as between the calcium-sensing receptor and the related GPCRC6A receptor (Faure et al., 2009; Rosenbaum et al., 2009). Because Smo displays the highest amino acid homology with the Frizzled receptors (van Amerongen and Nusse, 2009), it was of interest to further investigate the specificity of MRT-83 toward the Wnt pathway. Our experiments demonstrate that MRT-83 did not display significant agonist or antagonist Wnt signaling activity evaluated by a Tcf/Lef dependent luciferase assay. These data indicate that MRT-83 should be a valuable tool for investigating Hh signaling mechanisms in cell culture or tissues where both pathways are functional.

The existence of multiple binding sites for both Smo agonists and antagonists might underlie for the diversity of actions of Smo positive and negative modulators. For example, the agonist SAG and the antagonist cyclopamine binding sites are overlapping but not identical (Chen et al., 2002b). Radioligand binding analysis with tritiated SAG derivatives also revealed that the antagonist SANT-1 binds in a manner consistent with that of an allosteric modulation (Rominger et al., 2009). Itraconazole, an antifungal compound, has been shown to inhibit Hh signaling and to act on Smo at a site distinct from cyclopamine (Kim et al., 2010). Whether the site of action of glucocorticoid-derived Smo agonists is overlapping with one of the above-mentioned sites is not yet known (Wang et al., 2010). Here, we have shown that MRT-83 abrogates BC binding to mouse and human Smo and suppresses the accumulation of Smo at the primary cilium induced by Hh pathway activation, whereas cyclopamine by itself induces Smo trafficking at the primary cilium in various cell lines (Supplemental Fig. 3 and Rohatgi et al., 2009; Wang et al., 2009; Wilson et al., 2009). Therefore, it might be anticipated that MRT-83 interacts with Smo. Further experiments should investigate the site of MRT-83 binding on the receptor.

It is noteworthy that primary cilia are present on human BCC and medulloblastoma and can both mediate and suppress Hh-dependent tumorigenesis (Han et al., 2009; Wong et al., 2009). Moreover, the presence of primary cilium in specific variants of human medulloblastomas is also informative from a therapeutic point of view. Thus, ciliated medulloblastomas with high Hh signaling might be susceptible to treatments that target primary cilium (Han et al., 2009). Smo activation and its regulation by Hh signaling and by small molecules at the level of the primary cilium have been proposed as a key step in tumorigenesis-dependent processes

but are still not sufficiently studied (Scales and de Sauvage, 2009). It has been proposed that Smo activation requires first its translocation to the primary cilium, which is then followed by a second activation step. Thus, Smo inhibitors have been classified into at least two families of compounds. Sant1-like molecules that would block Smo trafficking to the primary cilium and cyclopamine-like molecules that would affect Smo activation process within the cilium (Rohatgi et al., 2009). The *Smo*^{M2} mutation has been associated with BCC and a *Smo*^{M2} protein is equally distributed in the cytoplasm and in the primary cilium of transfected cells (Rohatgi et al., 2009). It is noteworthy that the *Smo*^{M2} protein is less sensitive to cyclopamine than WT Smo, whereas Sant1 inhibits both proteins with similar potency (Chen et al., 2002a). It has been anticipated that *Smo*^{M2}-like mutations that might arise from drug treatment in the clinic will therefore be more sensitive to the Sant1-like family of molecules than to the cyclopamine-like family of molecules.

Our current work indicates that MRT-83 blocks trafficking to the primary cilium of both endogenous mouse and human Smo expressed in C3H10T1/2 cells or on human pluripotent testicular carcinoma cells. Thus, this Smo inhibitor falls into the SANT-1-like family of molecules. Further studies should clarify the molecular and biochemical mechanisms underlying the resistance to Smo inhibitors, particularly at the level of the primary cilium in normal and cancer cells.

Cyclopamine blocks Hh signaling by directly binding Smo and slows down the growth of tumors in various animal models (Beachy et al., 2004; Scales and de Sauvage, 2009). When applied *in vivo*, cyclopamine also inhibits stem cell proliferation in the adult SVZ (Palma et al., 2005). However, it was recently proposed that cyclopamine and another unrelated Smo antagonist may have nonspecific off-target effects on cell growth (Yauch et al., 2008). Thus, it was of interest to further investigate the ability of MRT-83 to modulate Hh signaling *in vivo*. We have previously observed that direct infusion of Shh into the LV of rodent brain induced a rapid Ptc transcription in the SVZ, indicating that Hh pathway is activated in this neurogenic area (Loulrier et al., 2006). In the present study, such Ptc transcription was also observed 2 days after Shh infusion in the LV, as identified by the strong ISH signals detected in the cells located throughout the SVZ of treated animals, whereas such signals were not present in control animals. These signals were not observed in the SVZ areas of brain sections from animals treated with MRT-83 but were present when animals were treated with MRT-36, a molecule sharing structural homology with MRT-83 but not harboring Hh pathway inhibitory or stimulatory properties (Supplemental Fig. 4). ShhN injection was not accompanied by up-regulation of Ptc transcription in the adjacent septum in agreement with previous work (Charytoniuk et al., 2002b) and Ptc expression profile in this area was not modified either by the coadministration of MRT-83 or MRT-36 with ShhN. All together, these data demonstrate that MRT-83 is a potent antagonist of ShhN-induced up-regulation of Ptc transcription in the SVZ. Both Smo and Ptc are expressed in cells located in the SVZ (Angot et al., 2008). Thus, because MRT-83 is a potent Smo inhibitor in various *in vitro*-based assays, Hh pathway inhibition in the SVZ may reflect Smo blockade in this neurogenic area.

Blocking the Hh pathway seems to be a promising approach for the treatment of various types of cancers. There-

fore, understanding the mode of action of Smo inhibitors as well as delineating their pharmacological and functional properties is an important goal for further development of a new class of therapeutic molecules in oncology. Thus, MRT-83, which is a novel potent Smo antagonist belonging to a acylguanidine family of molecules, should be a valuable tool for further investigating the mode of action of Smo inhibitors and for characterizing Smo functions both in vitro and in vivo.

Acknowledgments

We thank Dr. R. Moon (University of Washington, Seattle, WA) for kindly providing the Super8xTOPFlash reporter plasmid and Dr. J. Kitajewski (Columbia University, New York, NY) for the pLNC Wnt-3aHA plasmid. We thank Dr. S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

Authorship Contributions

Participated in research design: Roudaut, Traiffort, Faure, Ruat, Solinas, and Taddei.

Conducted experiments: Roudaut, Traiffort, Gorojankina, and Faure.

Contributed new reagents or analytic tools: Vincent, Schoenfelder, Mann, Solinas, Taddei, and Manetti.

Performed data analysis: Roudaut, Traiffort, Gorojankina, Faure, and Ruat.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Roudaut, Ruat, and Manetti.

References

Ahn S and Joyner AL (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**:894–897.

Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M, and Traiffort E (2008) Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells* **26**:2311–2320.

Barakat MT, Humke EW, and Scott MP (2010) Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends Mol Med* **16**:337–348.

Beachy PA, Karhadkar SS, and Berman DM (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**:324–331.

Charytoniuk D, Porcel B, Rodriguez Gomez J, Faure H, Ruat M, and Traiffort E (2002a) Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris* **96**:9–16.

Charytoniuk D, Traiffort E, Hantraye P, Hermel JM, Galdes A, and Ruat M (2002b) Intrastriatal sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur J Neurosci* **16**:2351–2357.

Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, et al. (2009) Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* **5**:100–107.

Chen JK, Taipale J, Cooper MK, and Beachy PA (2002a) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* **16**:2743–2748.

Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, and Beachy PA (2002b) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:14071–14076.

Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, and Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**:1018–1021.

Dessaud E, McMahon AP, and Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* **135**:2489–2503.

Faure H, Gorojankina T, Rice N, Dauban P, Dodd RH, Braüner-Osborne H, Rognan D, and Ruat M (2009) Molecular determinants of non-competitive antagonist binding to the mouse GPRC6A receptor. *Cell Calcium* **46**:323–332.

Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, Ellison DW, Gilbertson RJ, and Alvarez-Buylla A (2009) Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med* **15**:1062–1065.

Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ, et al. (2009) Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:14132–14137.

Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, Chong CR, Chang KS, Fereshteh M, Gardner D, et al. (2010) Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell* **17**:388–399.

Li JJ, Shanmugasundaram V, Reddy S, Fleischer LL, Wang Z, Smith Y, Harter WG, Yue WS, Swaroop M, Li L, et al. (2010) Smoothened antagonists for hair inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **20**:4932–4935.

Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, Hsu C, Ali SA, Ali AS, and Alman BA (2009) Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med* **15**:1421–1425.

Loulier K, Ruat M, and Traiffort E (2006) Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *J Neurochem* **98**:530–542.

Manetti F, Faure H, Roudaut H, Gorojankina T, Traiffort E, Schoenfelder A, Mann A, Solinas A, Taddei M, and Ruat M (2010) Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothened antagonists. *Mol Pharmacol* **78**:658–665.

Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, and Freysson JM (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* **108**:3012–3020.

Masdeu C, Bernard V, Faure H, Traiffort E, and Ruat M (2007) Distribution of Smoothened at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* **18**:395–399.

Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, and Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**:335–344.

Peukert S and Miller-Moslin K (2010) Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *Chem Med Chem* **5**:500–512.

Robarge KD, Brunton SA, Castanedo GM, Cui Y, Dina MS, Goldsmith R, Gould SE, Guichert O, Gunzner JL, Halladay J, Jia W, Khojasteh C, Koehler MF, Kotkow K, La H, Lalonde RL, Lau K, Lee L, Marshall D, Marsters JC, Jr., Murray LJ, Qian C, Rubin LL, Salphati L, Stanley MS, Stibbard JH, Sutherland DP, Ubhayaker S, Wang S, Wong S, and Xie M (2009) GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorg Med Chem Lett* **19**:5576–5581.

Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, and Scott MP (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothened: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:3196–3201.

Rohatgi R, Milenkovic L, and Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* **317**:372–376.

Romer JT, Kimura H, Magdalenos S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, et al. (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* **6**:229–240.

Rominger CM, Bee WL, Copeland RA, Davenport EA, Gilmartin A, Gontarek R, Hornberger KR, Kallal LA, Lai Z, Lawrie K, et al. (2009) Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothened receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:995–1005.

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**:356–363.

Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, et al. (2009) Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* **361**:1173–1178.

Scales SJ and de Sauvage FJ (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**:303–312.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP, and Beachy PA (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**:1005–1009.

Traiffort E, Angot E, and Ruat M (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *J Neurochem* **113**:576–590.

van Amerongen R and Nusse R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**:3205–3214.

Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC, Jr., de Sauvage FJ, and Low JA (2009) Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **361**:1164–1172.

Wang J, Lu J, Bond MC, Chen M, Ren XR, Lyerly HK, Barak LS, and Chen W (2010) Identification of select glucocorticoids as Smoothened agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:9323–9328.

Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, and McMahon AP (2009) Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:2623–2628.

Wilson CW, Chen MH, and Chuang PT (2009) Smoothened adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS One* **4**:e5182.

Wong SY, Seol AD, So PL, Ermilov AN, Bichakjian CK, Epstein EH, Jr., Dlugosz AA, and Reiter JF (2009) Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat Med* **15**:1055–1061.

Yam PT, Langlois SD, Morin S, and Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**:349–362.

Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alieck B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, et al. (2009) Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* **326**:572–574.

Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, et al. (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**:406–410.

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

Résumé de l'article *Solinas et al, 2011, en préparation.*

La structure tridimensionnelle du récepteur Smo n'étant pas disponible, la stratégie que nous avons choisie pour le développement de nouveaux ligands de ce récepteur est le criblage virtuel de banques de molécules après génération d'un modèle pharmacophorique, puis l'optimisation des molécules identifiées grâce à des études de relations structure-activité. Les deux premiers articles dérivés de ce travail décrivent les têtes de listes des molécules appartenant à 3 séries chimiques : acylthiourée (MRT-10), acylurée (MRT-14) et acylguanidine (MRT-83). Ce troisième article est focalisé sur l'optimisation des molécules dérivées des acylthiourées et acylurées afin d'accroître leur affinité sur le récepteur Smo. La conversion de la fonction acylthiourée en acylurée correspondante a permis d'augmenter l'affinité d'un facteur 6. Par ailleurs, l'utilisation de dérivés acylurées vient d'être rapportée comme inhibiteurs de l'enzyme glycogène phosphorylase humaine et de l'autophosphorylation du PDGF, mais aussi comme activateurs de glucokinases (*Furuta et al., 2006 ; Haynes et al., 2010; Klabunde et al., 2005*). Les composés MRT-10 et MRT-14 sont donc des molécules de structure intéressante à partir desquelles nous avons réalisé une étude structure-activité afin d'améliorer les propriétés pharmacologiques des composés initiaux vis-à-vis de la voie Hh.

Ainsi, nous avons synthétisé des séries de composés dérivés de deux familles chimiques possédant une fonction thiourée ou urée. Les composés ont été testés *in vitro* sur le modèle basé sur la mesure de l'activité du rapporteur Gli-luciférase induite par le ligand Shh. Un dérivé acylthiourée, le composé 60 présentant un groupement méthyl sur le cycle aromatique central et un groupement phényl sur sa partie droite, possède une affinité plus de 10 fois supérieure à celle du MRT-10 (CI_{50} : 0,041 μ M). Les relations structure-activité que nous avons établies conduisent aux conclusions suivantes : l'intégrité du triéthoxybenzoyl situé sur la partie gauche de la molécule est importante, de même que la présence d'un méthyl sur le cycle aromatique central et celle d'un biphenyl sur la partie droite de la molécule. La conversion de la fonction thiourée du composé 60 en urée dans le composé 71 induit de nouveau un gain d'affinité avec une valeur de CI_{50} de 13 nM déterminée dans le test utilisant le rapporteur Gli-luciférase et proche de celle du composé GDC-0449 testé en clinique ($CI_{50} \approx 10$ nM). Les affinités des composés 60 et 71 ont ensuite été déterminées dans les autres tests cellulaires disponibles *in vitro* et les valeurs obtenues ont été comparées à celles précédemment déterminées pour MRT-10,

MRT-14, cyclopamine, Cur61414 et GDC-0449. Les composés 60 et 71 inhibent la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses C3H10T1/2 induite par l'agoniste SAG avec des CI_{50} respectives de 6 et 9 nM. Ils bloquent la prolifération des précurseurs des cellules granulaires du cervelet de raton induite par 3 nM de la protéine recombinante ShhN avec des affinités 20 à 60 fois supérieures à celles des composés MRT-10, MRT-14, cyclopamine ou Cur61414. Enfin, ils inhibent la liaison de la BODIPY-cyclopamine ((*Chen et al., 2002a*) au récepteur Smo humain de manière dose-dépendante et avec des affinités respectives de 63 et 24 nM.

L'ensemble de ces résultats rapporte donc la synthèse et la caractérisation de nouvelles séries de molécules à fonction acylurée et acylthiourée. Plusieurs composés sont de puissants antagonistes de la signalisation Hh, interagissant avec le récepteur Smo et dont la forte affinité pour le récepteur humain suggère qu'ils puissent servir d'outils originaux pour l'analyse pharmacologique de la voie Hh et constituer de potentielles molécules antitumorales.

Synthesis and Biological Evaluation of new Acylthiourea and Acylurea Derivatives as Potent Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway

Antonio Solinas,^a Hélène Faure,^b Hermine Roudaut,^b Elisabeth Traiffort,^b Angèle Schoenfelder,^c Andr e Mann,^c Fabrizio Manetti,^a Maurizio Taddei*^a and Martial Ruat*^b

^a*Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena, Via A. Moro 2, I-53100, Siena, Italy*

^b*CNRS, UPR-3294, Laboratoire de Neurobiologie et Développement, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard IFR2118, Signal Transduction and Developmental Neuropharmacology team, 1 avenue de la Terrasse, F-91198, Gif-sur-Yvette, France*

^c*Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, UMR-7200, CNRS -Universit  de Strasbourg, 74, route du Rhin, F-67401 Illkirch, France*

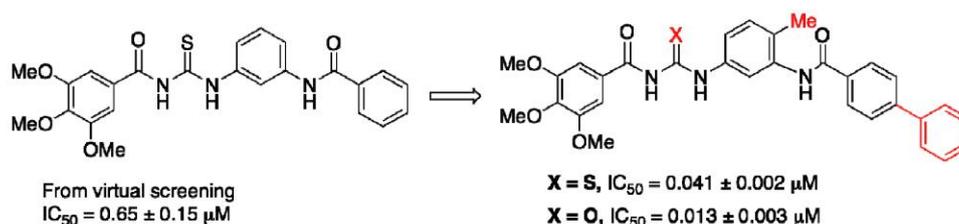
E-mail address for correspondence: taddei.m@unisi.it; ruat@inaf.cnrs-gif.fr

* To whom correspondence should be addressed.

Abstract

The seven transmembrane receptor Smoothed (Smo) is the major component involved in the transduction of the Hedgehog (Hh) signaling pathway. After ligand-based virtual screening, an acylthiourea was identified as a Smo antagonist and a variety of analogous compounds were prepared and the structure optimized. Two of the most active molecules (compound 60 and its acylurea derivative, compound 71) displayed IC₅₀s in the nanomolar range with respect to the inhibition of the Hh signaling pathway in various cell-based assays and of Bodipy-cyclopamine binding to human Smo. The biological data were comparable to those of GDC-0449, currently in clinical trials for treating various cancers. Thus, these two MRT-10 series of molecules might be the basis to further develop novel lead compounds for blocking Smo and potential anticancer agents.

TOC Graphic



Abbreviations

Hh, Hedgehog; Ptc, Patched; Smo, Smoothed; Shh, Sonic Hedgehog; Gli, Glioma-associated oncogene homologue; AcTU, acylthiourea; AcU, acylurea; GCP, granule cell precursors; BC, Bodipy-cyclopamine; h, hour; rt, room temperature; mw, microwave.

Introduction

The Hedgehog (Hh) signaling pathway is an essential embryonic signaling cascade that regulates stem and progenitor-cell differentiation in multiple developmental processes. The pathway is also functional in various adult tissues including brain where its roles are beginning to be explored thanks to the development of genetic and pharmacological tools.^{1,2} In mammals, the three Hh homologous proteins Sonic Hh (Shh), Desert Hh (Dhh) and Indian Hh (Ihh) are present. They differ in their tissue distribution and temporal expression and mediate their activity via a receptor complex associating two transmembrane proteins, Patched (Ptc) displaying a transporter-like structure and Smoothed (Smo), presumably belonging to the G protein-coupled receptor family.³ The repression exerted by Ptc on Smo is relieved when Hh ligands bind Ptc, which leads to a complex signaling cascade involving the transcription factors of the Glioma-associated oncogene (Gli) family and to the activation of target genes including Ptc and Gli themselves.^{4,5}

Interruption of Hh signaling during embryogenesis can lead to severe developmental defects including holoprosencephaly.^{2,6,7} On the other hand, uncontrolled activation of the Hh pathway in adults has been associated with the development of several cancers. Mutation-driven Hh reactivation generates basal cell carcinoma and medulloblastoma, whereas alterations in the ligand balance have been associated with onset of pancreatic carcinoma, stomach, oesophageal, colorectal, prostate, breast and liver cancers.^{4,5,8} The natural and teratogenic compound cyclopamine blocks Hh signaling by directly binding Smo and slows down the growth of tumors in various animal models⁸⁻⁹ thus validating Smo as a therapeutic target in the treatment of Hh-related diseases. Recently, several highly potent Smo antagonists have been described.¹⁰⁻¹² The small-molecule inhibitor GDC-0449, actually in clinical phase,¹³ holds great promise for treating medulloblastomas driven by mutations in the Hh pathway as well as several Hh-dependent

cancers.^{5,10-12} However, a Smo mutation arising within the sixth putative transmembrane domain of Smo and disrupting the ability of GDC-0449 to bind Smo, was found in the tumor of a metastatic form of medulloblastoma from a patient who had relapsed after an initial response to the drug.^{14,15} A Smo mutation occurring at a homologous position in mouse Smo was also observed in a GDC-0449-resistant mouse model of medulloblastoma.¹⁶

Therefore, new ligands are required for characterizing Smo pharmacology *in vitro* and *in vivo* and proposing improved drugs for cancer therapy. As a three-dimensional structure of Smo is not yet available, one of the strategies for ligand discovery relies on the screening of large libraries of compounds and subsequent hit optimization. The identification of potent Smo antagonists such as Cur61414 or Z^{'''} is the result of those efforts.¹⁰

Interested in identifying new small molecule inhibitors of the Hh pathway, we developed a ligand-based pharmacophore starting from a set of active described compounds and carried out a virtual screening of commercial libraries.¹⁷ This approach led us to identify the acylthiourea (AcTU) **MRT-10** (Figure 1, X = S) which displayed micromolar range antagonist potency in various Hh assays (IC₅₀ = 0.65 μM on a Gli-luciferase dependent assay, entry 1, Table 1). Interestingly, the simple transformation of the thiourea function into the corresponding acylurea (AcU) produced compound **MRT-14** which showed an increased inhibition potency (IC₅₀ = 0.16 μM on the same test, entry 1, Table 4). Both compounds feature the following structural elements: an electron rich phenyl ring (3,4,5-trimethoxy substituted) linked, through an urea-type function, to a second phenyl bearing an aryl carbamoyl residue (Figure 1) with a bent shape around the central 1,3-bis-amino phenyl pattern as the global geometry.

Whereas thiourea derivatives have shown some benefits for the treatment of solid tumors,¹⁸ AcU compounds, originally developed

as insecticides, displayed interesting antitumor activities as shown during a random screening.¹⁹ More recently, AcUs have been identified as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase²⁰ and Platelet-Derived Growth Factor receptor autophosphorylation,²¹ but also

as glucokinase activators.²² Therefore, **MRT-10** and **MRT-14** could be considered as viable hits and a chemical program, focused on the synthesis of analogues, was developed in order to explore the structure-activity relationship of these compounds.

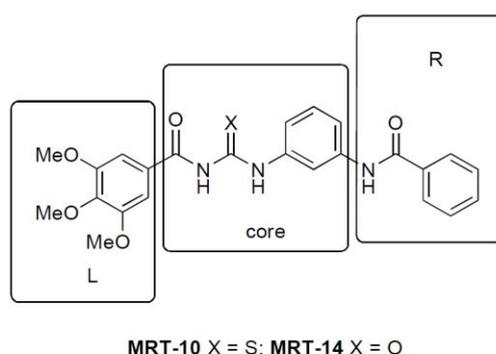


Figure 1. Exploration the left (L), core, and right (R) regions of the reference molecules MRT-10 and MRT-14.

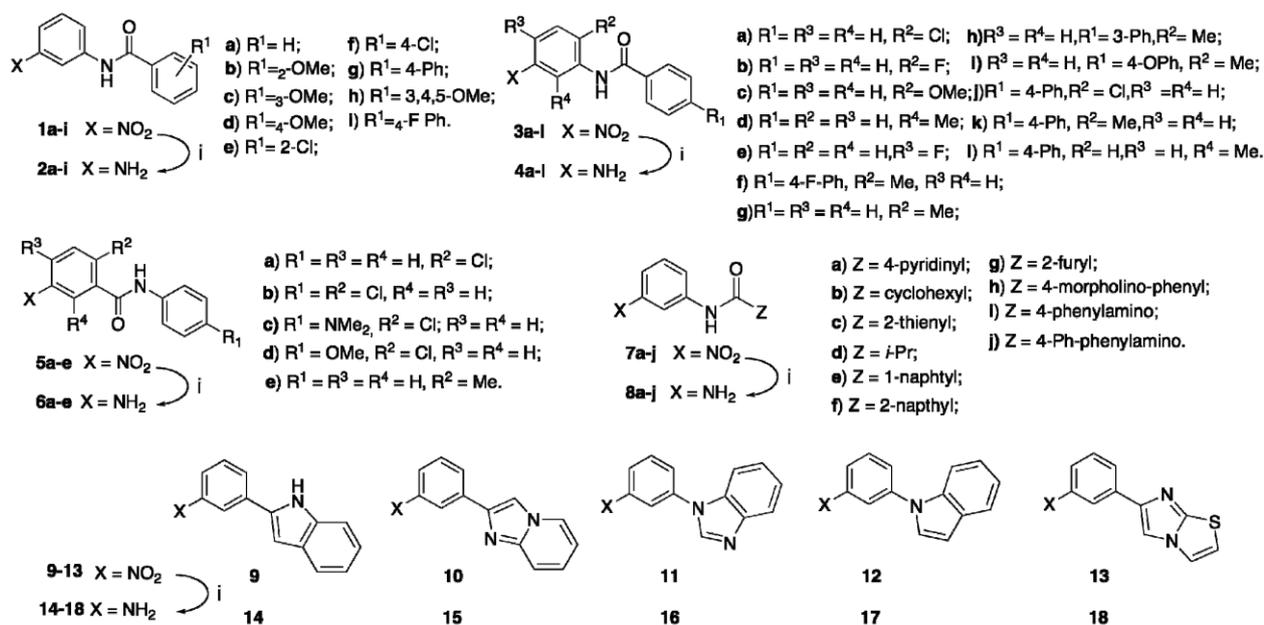
Results and Discussion

The only structural difference between **MRT-10** and **MRT-14** is the nature of the central urea function: thiourea versus urea. Consequently, for synthetic convenience, we prepared first a series of thioureas further transformable into the corresponding ureas by standard methods.

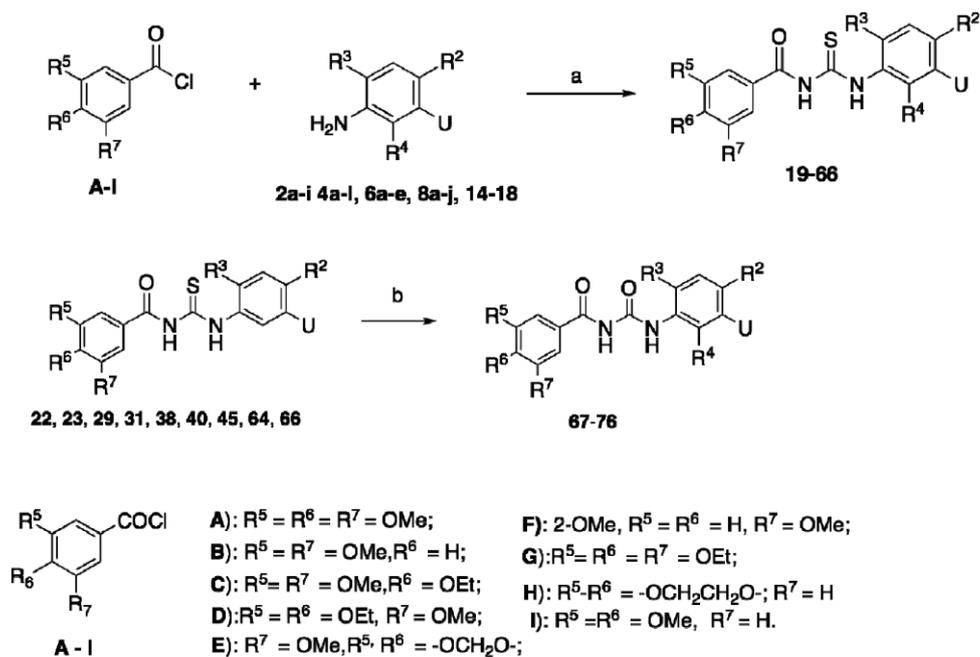
Chemistry. The targeted AcTU's were obtained via a classical and convergent sequence. First the transient acyl isothiocyanates were obtained by the reaction of selected acylchlorides with ammonium isothiocyanate as partner, the subsequent reactions with different anilines gave the final adducts (Schemes 1 and 2). At first, aroyl-anilines **2a-i**, **4a-l**, **6a-e**, **8a-j**, **14-18** were obtained from the corresponding 1,3-nitroanilines (**1a-i**, **3a-l**, **5a-e**, **7a-j**, **9-13**) (Scheme 1) either prepared following literature indications or purchased directly. In general the reduction of the nitro function into amine was performed by transfer hydrogenation with ammonium formate over Pd/C under microwave dielectric heating.²³ This transformation worked efficiently except when a halogen atom was

present in any of the two aromatic rings. In these cases, the reduction was performed with SnCl₂/HCl /EtOH at 60°C,²⁴ leading to the corresponding anilines in good yields (Scheme 1).

Then, acylchlorides A-I (commercially available or prepared from acid and oxalyl chloride) were reacted with ammonium isothiocyanate²⁵ to give the intermediate aroyl isothiocyanates (Scheme 2). Further addition of anilines **2a-i**, **4a-l**, **6a-e**, **8a-j**, **14-18** followed by 1.5 h of reflux in acetone gave AcTU's **19-66** in good to acceptable yields (Scheme 2). Selected AcTU's **22**, **23**, **29**, **31**, **38**, **40**, **45**, **64**, **66** were then transformed into the corresponding ureas by oxidation in the presence of CuCl /MeCN and NaOH under microwave heating, a method adapted from reports dealing with oxidation of thioamides and thioureas into the corresponding amides and ureas.^{26,27} This method proved to be the most affordable to produce the different AcU's **67-76** in acceptable yields (Scheme 2). All the products were finally isolated as solid compounds and purified by crystallization in EtOH or *i*-PrOH.



Scheme 1. Preparation of anilines **2a-i**, **4a-l**, **6a-e**, **8a-j**, **14-18**. Conditions and reagents: i. HCO₂NH₄, Pd/C, MeOH, reflux or SnCl₂, HCl, MeOH.

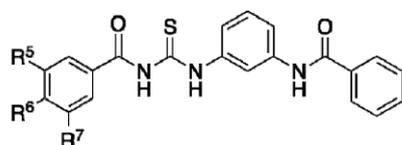


Scheme 2. Synthesis of thioureas and ureas: conditions and reagents: a) i. NH₄SCN, acetone, reflux; ii. Addition of anilines **2a-i**, **4a-l**, **6a-e**, **8a-j**, **14-18**, acetone, reflux. b) CuCl, NaOH, CH₃CN microwave irradiation. R⁵, R⁶, R⁷ and U are referring to the appendages explicated in the formulas at the top of the following Tables.

Biological activity. For structure optimization, the hit molecules were divided in 3 zones (L, core and R) as reported in Figure 1. Compounds **19-76** were tested for their inhibitory properties in a luciferase reporter assay using Shh as the ligand and Shh-light2 cells, that are NIH3T3 cells stably transfected with a Gli-dependent firefly luciferase reporter widely used for characterizing Hh inhibitors.²⁸ They were also tested as inhibitors of the differentiation of the mesenchymal pluripotent C3H10T1/2 cells into alkaline phosphatase-positive osteoblasts

induced by the Smo agonist SAG.^{29,30} In Table 1, the impact on the biological activity of some discrete variations on the L region of the hit molecule is reported. We decided to maintain an electron-rich aromatic ring with the presence of alkoxy residues. Indeed, variations in the number and the position of the alkoxy substituents on the phenyl ring affected the biological activity. Removal of one methoxy, independently from the position, resulted in a contrasted impact on the Hh pathway inhibition.

Table 1. Modifications at the L (left) region of the MRT-10 hit structure.



- 19:** R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = H; **23:** 2-OMe, R⁵ = R⁷ = H, R⁶ = OMe.
20: R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = OEt; **24:** R⁵ = R⁶ = R⁷ = OEt;
21: R⁵ = R⁶ = OEt, R⁷ = OMe; **25:** R⁵-R⁶ = -OCH₂CH₂O-, R⁷ = H;
22: R⁷ = OMe, R⁵, R⁶ = -OCH₂O-; **26:** R⁵ = R⁶ = OMe, R⁷ = H

Entry	Compound	Shh-light2, (Shh 5 nM)		C3H10T1/2, (SAG 0.1 μM)	
		Inhibition, % ¹	Inhibition, % ²	Inhibition, % ²	IC ₅₀ , μM
1	MRT-10	96 ± 1	96 ± 4	96 ± 4	0.9 ± 0.2
2	19	84 ± 8	82 ± 1	82 ± 1	1.9 ± 0.2
3	20	99 ± 2	94 ± 5	94 ± 5	0.6 ± 0.1
4	21	100 ± 1	82 ± 8	82 ± 8	0.8 ± 0.2
5	22	92 ± 2	85 ± 11	85 ± 11	1.1 ± 0.6
6	23	34 ± 4	60 ± 13	60 ± 13	4.1 ± 0.3
7	24	100 ± 2	96 ± 2	96 ± 2	0.8 ± 0.1
8	25	inactive	nd	nd	nd
9	26	71 ± 8	45 ± 8	45 ± 8	nd

¹ At 3 μM; ² At 10 μM; mean ± SEM; n ≥ 3 for all data; nd: not determined

For example, the removal of the methoxy in the para position was less detrimental than the removal in the meta position which produced a significant drop in the biological activity (compounds **19**, **23** and **26**, entries 2, 6 and 9, Table 1). The introduction of one, two or three EtO- in the place of the MeO- group (**20**, **21**, **24**) resulted in a limited enhancement of the inhibition (entries 3, 4 and 7, Table 1). Interestingly, the triethoxy aroyl group in compound **24** is also present in SANT-2, a known Hh antagonist.³¹ The replacement of the two methoxy groups with a dioxolane ring gave compound **22** (entry 5, Table 1) with a decreased activity. Surprisingly, the introduction of a dioxane cycle at the same position produced a completely inactive compound (**25** entry 8). From those data, it appears that the 3,4,5-trimethoxybenzoyl fragment remains the most contributive for the L region with respect to the activity of the molecules. Therefore this chemical feature was maintained unchanged in all the following compounds. The influence of structural modifications at the R region of the hit molecule is reported in Table 2. The presence of an aromatic ring in this part of the molecule was required to maintain the inhibition as demonstrated by the low inhibitory properties observed for the cyclohexyl **36** or the isopropyl **38** derivatives (entries 11 and 13, Table 2) or by the presence of thiophene **37** or furan **41** groups (entries 12 and 16 respectively, Table 2).

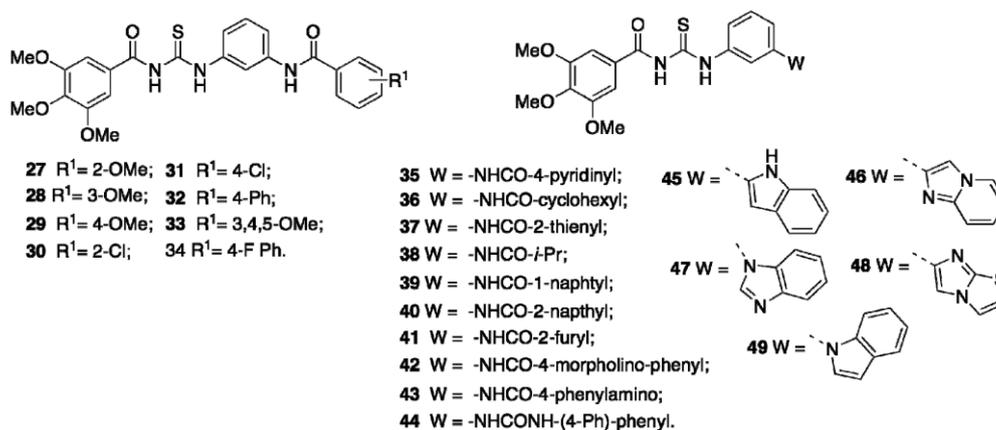
Introduction of a methoxyl fragment as in **27-29** (entries 2-4) or a chlorine atom as in **30-31** (entries 5 and 6) at various positions on the phenyl ring have a slightly detrimental effect on the biological activities with respect to the reference compound (entry 1). The presence of a trimethoxy phenyl group in the R zone (as in compound **33**) was accompanied by a decrease of inhibition in the two assays (entry 8) and discouraging results were also obtained with the pyridine moiety **35** and with the 1- and 2-naphthalenoyl compounds **39-40** (entries 10, 14 and 15 respectively). On the other hand, a major improvement in the inhibition properties was observed with the introduction of a second phenyl ring in para position. The biphenyl

derivative **32** showed a more than 10-fold improvement of the IC₅₀ in both assays (entry 7). The further introduction of a fluorine atom in the para position of the biphenyl ring **34** did not modify the inhibition (entry 9). When the second ring was alicyclic (as for compound **42**) the inhibition dropped (entry 17). However, if the biphenyl structure is maintained, the replacement of the amide bond with a urea group afforded compound **44** with only a slight decrease in the inhibition observed in the two assays (entry 19). Such a replacement (compound **43**, entry 18) did not greatly modify the inhibition compared to the hit compound MRT-10.

Moreover, the replacement of the benzamide group with an indole fragment led to compound **45** which displayed a 3-fold increased inhibitory activity (entry 20) with respect to the hit compound. Other attempts to introduce classical indole isosters (compounds **46-49**) were less productive (see entries 21-24). As a conclusion, the biphenyl derivatives **32** and **34** resulted in the most active compounds in this series. Some conclusions can be drawn from our preliminary investigations: in the L zone, the presence of the 3,4,5-trimethoxyaryl frame is necessary to maintain the inhibitory potency, whereas in the R region the introduction of a biphenyl fragment is beneficial.

Next, the influence of a central aromatic ring substitution in the core region was explored and results are reported in Table 3. Modifications on substituents at R³ and R² were first investigated. At R², the introduction of a chloro (**50**), fluoro (**51**), or a methyl group (**56**) retained the activity (entries 2, 3 and 8) while a methoxy in the same position (**52**) decreased the activity (entry 4). Compound **50** was the best of this series with a 3-fold improvement in the inhibitory property with respect to the hit compound in the Shh-light2 assay. At R³ and R⁴, the introduction of substituents did not afford any increment in the activity (**53-54**), (see entries 5, 6, Table 3). Then, the original amide bond was inverted leading to compounds **62-66** (entries 14-18, Table 3). A significant decrease

Table 2. Modifications at the R (right) zone of the MRT-10 hit structure.



Entry	Compound	Shh-light2, (Shh 5 nM)		C3H10T1/2, (SAG 0.1 μM)	
		Inhibition, % ¹	IC ₅₀ , μM	Inhibition, % ²	IC ₅₀ , μM
1	MRT-10	96 ± 1	0.65 ± 0.15	96 ± 4	0.9 ± 0.2
2	27	49 ± 14	nd	99 ± 6	2.0 ± 0.5
3	28	99 ± 1	nd	89 ± 3	2.0 ± 1
4	29	93 ± 3	nd	85 ± 8	1.6 ± 0.3
5	30	66 ± 11	nd	80 ± 12	2.5 ± 0.6
6	31	99 ± 1	nd	96 ± 3	0.8 ± 0.4
7	32	89 ± 1	0.09 ± 0.02	62 ± 3	0.08 ± 0.01
8	33	37 ± 1	nd	74 ± 7	nd
9	34	97 ± 1	0.10 ± 0.02	95 ± 3	0.14 ± 0.06
10	35	67 ± 4	nd	82 ± 8	nd
11	36	14 ± 13	nd	26 ± 7	nd
12	37	13 ± 3	nd	60 ± 5	nd
13	38	6 ± 16	nd	6 ± 4	nd
14	39	64 ± 10	nd	63 ± 9	nd
15	40	24 ± 8	nd	59 ± 11	nd
16	41	53 ± 1	nd	67 ± 12	nd
17	42	90 ± 5	nd	55 ± 2	nd
18	43	78 ± 10	nd	104 ± 3	nd
19	44	71 ± 10	nd	91 ± 1	nd
20	45	90 ± 4	0.18 ± 0.06	102 ± 1	0.28 ± 0.05
21	46	93 ± 1	0.82 ± 0.06	94 ± 1	0.55 ± 0.15
22	47	84 ± 8	nd	60 ± 17	nd
23	48	92 ± 3	1.1 ± 0.1	98 ± 1	nd
24	49	69 ± 1	nd	92 ± 7	nd

¹ At 3 μM; ² At 10 μM; mean ± SEM; n ≥ 3 for all data; nd: not determined

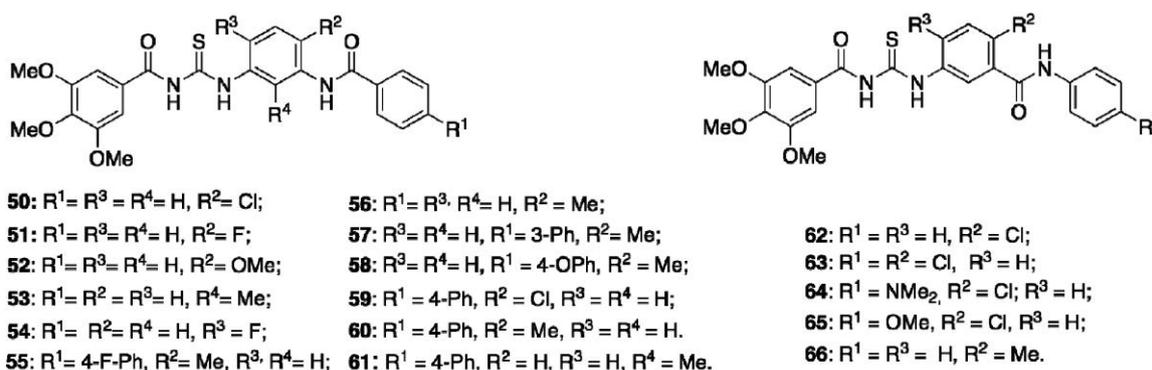
in the inhibition was observed when comparing compounds **62** (inverted amide bond, entry 14) and **50** (original amide bond, entry 2) where the only difference is the reversal of the amide bond. The same observation can be also made for compounds **56** and **66** (entries 8 and 18, Table 3). However, the synchronous introduction of Cl or Me ortho to the carbamoyl moiety together with the presence of a biphenyl fragment at R¹, led to two potent compounds **59** and **60** (entries 11, 12, Table 3). Maintaining a methyl in the R² position and changing the 4-Phe to a 3-Phe or 4-O-Phe in R¹ led to the less potent compounds **57** and **58** (entry 9, 10, Table 3). In this series, we synthesized also compound **55** (entry 7, Table 3), formally derived from compound **34** (entry 9, Table 2) in which a Me group has been incorporated at the R² position in the core region. A 3-fold increase in its potency was observed in the two assays. Interestingly, the presence of a fluorine atom on the phenyl at the R¹ position in compound **60** did not modify the inhibition property (Table 3). Therefore, the gain in the inhibitory potency with respect to the reference compound may be

attributed to the presence of a Cl or a Me substituent at R² which is disrupting the conjugation of the central phenyl and the amide bond, and is responsible for the formation of an appreciable dihedral angle between the two phenyl rings. In conclusion, compound **60** was among the most active, showing an IC₅₀ = 41 nM in the Shh-light2 assay.

As a preliminary conclusion of this structure optimization study, it was found that the following features were important for Smo inhibition: keeping a 3,4,5-trimethoxybenzoyl (or triethoxybenzoyl) fragment at the L region of the molecule, providing a 4-Me or 4-Cl, 1,3-diamino aryl fragment at the central aromatic core and a biphenyl appendage at the R side (Scheme 3).

After the identification of these important structural features, we decided to convert some representative AcTU's into the corresponding AcU's as described in Scheme 2. As previously observed, an increase of the inhibitory property was observed with most of the representative structures (Table 4).

Table 3. Modifications at the “core” region of the MRT-10 hit structure.

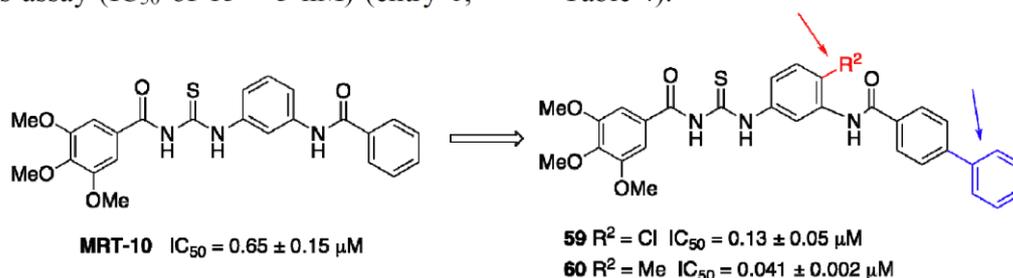


Entry	Compound	Shh-light2, (Shh 5 nM)			C3H10T1/2, (SAG 0.1 μ M)	
		Inhibition, % ¹	Inhibition, % ²	IC ₅₀ , μ M	Inhibition, % ³	IC ₅₀ , μ M
1	MRT-10	15 \pm 4	96 \pm 1	0.65 \pm 0.15	96 \pm 4	0.9 \pm 0.2
2	50	69 \pm 7	89 \pm 4	0.19 \pm 0.03	96 \pm 3	0.99 \pm 0.03
3	51	21 \pm 9	98 \pm 1	nd	96 \pm 1	nd
4	52	1 \pm 2	33 \pm 6	nd	8 \pm 1	nd
5	53	2 \pm 2	54 \pm 7	nd	44 \pm 13	nd
6	54	4 \pm 5	92 \pm 8	nd	97 \pm 2	nd
7	55	96 \pm 3	97 \pm 6	0.029 \pm 0.001	86 \pm 4	0.03 \pm 0.01
8	56	60 \pm 6	100 \pm 2	nd	99 \pm 1	0.9 \pm 0.3
9	57	72 \pm 5	100 \pm 1	nd	97 \pm 4	0.6 \pm 0.6
10	58	59 \pm 1	97 \pm 2	nd	99 \pm 2	0.5 \pm 0.1
11	59	85 \pm 2	99 \pm 3	0.13 \pm 0.04	101 \pm 5	0.38 \pm 0.10
12	60	98 \pm 1	98 \pm 1	0.041 \pm 0.002	100 \pm 1	0.06 \pm 0.02
13	61	9 \pm 7	48 \pm 8	nd	7 \pm 13	nd
14	62	11 \pm 5	95 \pm 3	0.52 \pm 0.09	96 \pm 5	1.5 \pm 0.1
15	63	7 \pm 7	98 \pm 1	nd	96 \pm 3	nd
16	64	4 \pm 1	99 \pm 1	nd	98 \pm 2	nd
17	65	10 \pm 8	100 \pm 1	nd	88 \pm 1	nd
18	66	13 \pm 5	89 \pm 5	1.8 \pm 0.6	99 \pm 1	2.5 \pm 0.5

¹ At 0.3 μ M; ² At 3 μ M; ³ At 10 μ M; mean \pm SEM; n \geq 3 for all data; nd: not determined

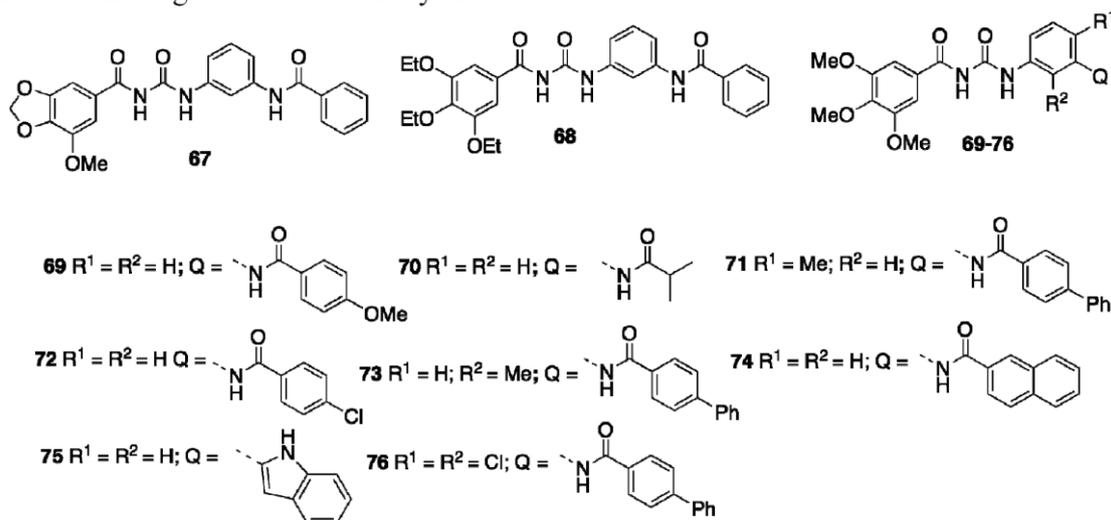
For one of the most active compound of our series, the conversion from thiourea (compound **60**, Table 3) to urea (compound **71**, Table 4) resulted in an additional substantial gain of inhibitory potency, since compound **71** was active in the nanomolar range in the Shh-light2 cells assay (IC₅₀ of 13 \pm 3 nM) (entry 6,

Table 4). This effect was more modest when we converted the AcTU compound **59** (Table 3) to its corresponding AcU derivative (compound **76**, Table 4). We also observed that the location of the Me in the central core region was important (compare compounds **71** and **73**, Table 4).



Scheme 3. MRT-10 optimization by discrete structural modifications. Improvement came from substituents at R² (red) and with a second phenyl ring (blue). IC₅₀ are from the Shh-light2 assay.

Table 4. Biological activities of acylureas.



Entry	Compound	Shh-light2, (Shh 5 nM)			C3H10T1/2, (SAG 0.1 μ M)	
		Inhibition, % ¹	Inhibition, % ²	IC ₅₀ , μ M	Inhibition, % ³	IC ₅₀ , μ M
1	MRT-14	76 \pm 5	96 \pm 1	0.16 \pm 0.07	101 \pm 5	0.13 \pm 0.05
2	67	1 \pm 4	2 \pm 2	nd	32 \pm 11	nd
3	68	13 \pm 5	24 \pm 11	nd	45 \pm 14	nd
4	69	40 \pm 4	103 \pm 1	nd	99 \pm 1	nd
5	70	4 \pm 4	62 \pm 8	nd	99 \pm 3	nd
6	71	96 \pm 2	99 \pm 1	0.013 \pm 0.002	101 \pm 3	0.025 \pm 0.003
7	72	6 \pm 6	96 \pm 1	nd	95 \pm 3	nd
8	73	26 \pm 10	99 \pm 1	nd	104 \pm 1	nd
9	74	1 \pm 7	3 \pm 4	nd	4 \pm 3	nd
10	75	85 \pm 6	90 \pm 5	0.11 \pm 0.03	97 \pm 1	0.22 \pm 0.04
11	76	95 \pm 2	98 \pm 1	0.08 \pm 0.01	72 \pm 4	0.10 \pm 0.03

¹ At 0.3 μ M; ² At 3 μ M; ³ At 10 μ M; mean \pm SEM; n \geq 3 for all data; nd: not determined

The activity of compounds **60** and **71** (on Shh-light2 and C3H10T1/2 cells) was then compared to that of MRT-10, MRT-14 and reference Smo antagonists: cyclopamine, Cur61414 and GDC-0449. Results are collected in Table 5, expressed as IC₅₀ nM and are listed in order of ascending activity.

Abnormal Shh signaling in the cerebellum of Ptc^{+/-} mice has been proposed to be

responsible for medulloblastoma³² and a higher incidence of these tumors occurs when these animals are developed on a p53^{-/-} background.³³ The tumors are believed to result from a modification of the proliferative properties of the cerebellar granule cell precursors (GCPs) that populate this tissue. It has been previously demonstrated that GCPs proliferate in response to Hh pathway activation, an effect inhibited by Smo antagonists.^{33,34} To further investigate the

antagonist properties of compounds **60** and **71**, we analyzed their potencies to inhibit rat GCP proliferation in primary culture as measured by [³H]-thymidine incorporation in comparison to other Smo antagonists including the original hits. Neither compound (1 μM) modified significantly the basal level of [³H]-thymidine incorporation in rat GCPs (data not shown). As it has been previously reported, rat GCPs treatment with SAG causes an increase in [³H]-thymidine incorporation over basal level³⁶. Compounds **60** and **71** were found to be potent antagonists of SAG (0.01 μM)-induced

proliferation of rat GCPs with an IC₅₀ of 9 nM and 6 nM, respectively. Therefore, these data further validate **60** and **71** as potent Hh inhibitors and again show that the urea is more potent than the thiourea in this assay. Both compounds were 20 to 60 times more potent than MRT-10, MRT-14, cyclopamine or Cur61414 and their IC₅₀ were in the same range as GDC-0449, a potent Hh inhibitor in clinical phase (Figure 2C and Table 5).¹³ Thus, these data further demonstrate that these novel series of AcTU and AcU compounds are potent Hh pathway inhibitors.

Table 5. Binding affinities and functional potencies of MRT-10 derivatives and reference Smo inhibitors.

Compound	IC ₅₀ , μM ± SEM			
	Shh-light2 ¹	C3H10T1/2 ¹	GCPs ²	BC Binding ³
MRT-10	0.64 ± 0.15	0.9 ± 0.2	0.34 ± 0.03	0.30 ± 0.05
Cyclopamine	0.3 ± 0.05	0.62 ± 0.03	0.10 ± 0.06	0.06 ± 0.02
Cur61414	0.14 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.095 ± 0.005	nd
MRT-14	0.16 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.106 ± 0.010	0.107 ± 0.018
60	0.041 ± 0.002	0.06 ± 0.02	0.009 ± 0.001	0.063 ± 0.013
71	0.013 ± 0.003	0.025 ± 0.003	0.006 ± 0.001	0.024 ± 0.007
GDC-0449	0.007 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.007 ± 0.001

¹Shh-light2 and C3H10T1/2 tests as in Tables 1-4; ²Granule cell precursors proliferation as determined from experiments depicted in Figure 2C; ³Bodipy-cyclopamine (BC) binding to human Smo as determined from experiments depicted in Figure 3. Mean ± SEM; n ≥ 3 for all data; nd: not determined

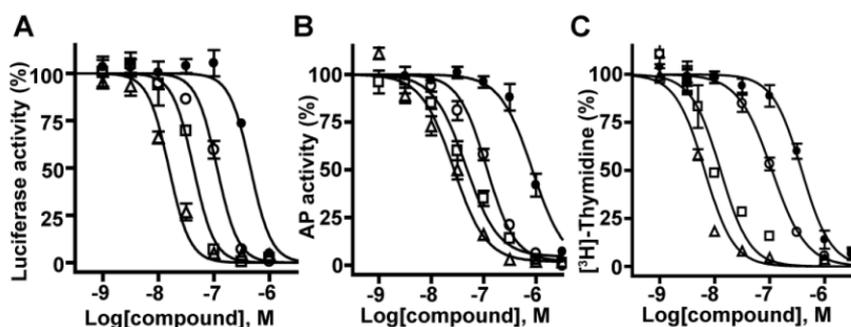


Figure 2. Dose-response inhibition curves of Shh-induced Gli-dependent luciferase activity in Shh-light2 cells (A), SAG-induced differentiation of C3H10T1/2 cells (B) or SAG-induced [³H]-thymidine incorporation of rat cerebellar GCPs (C) of the tested compounds. Curves of MRT-10 (filled circle), MRT-14 (circle), compound **60** (square) and compound **71** (triangle) were generated using increasing concentrations of compounds in the presence of Shh (5 nM) (A), SAG (0.1 μM) (B) or (0.01 μM) (C). The values are expressed as % of the maximal response induced by Shh or SAG, respectively. The data are representative of independent experiments (n=3-10) and are the means ± SEM of triplicates (A) or quadruplicates (B, C). Fitting of the dose-response curves was calculated by Prism software (GraphPad).

Finally, the characterization of the mode of action of compounds **60** and **71** was carried out by investigating whether they could compete with Bodipy-cyclopamine (BC), a fluorescent derivative of cyclopamine which interacts with Smo at the level of its heptahelical bundle.³⁶ We took advantage of our recent development of a BC assay on human Smo (hSmo) expressed stably in HEK293 (HEK-hSmo) cells.³⁵ These cells were incubated with 5 nM of BC for 2 h in

the absence or presence of various concentrations of compounds (Table 5). GDC-0449 and cyclopamine inhibited BC binding to hSmo with an IC₅₀ comparable to that previously reported using a similar assay (Table 5).³⁷ As previously observed for inhibiting BC binding to mouse Smo,¹⁷ the hit compounds demonstrated full inhibition of BC binding to hSmo thus further confirming their interest for targeting the human receptor (Table 5).

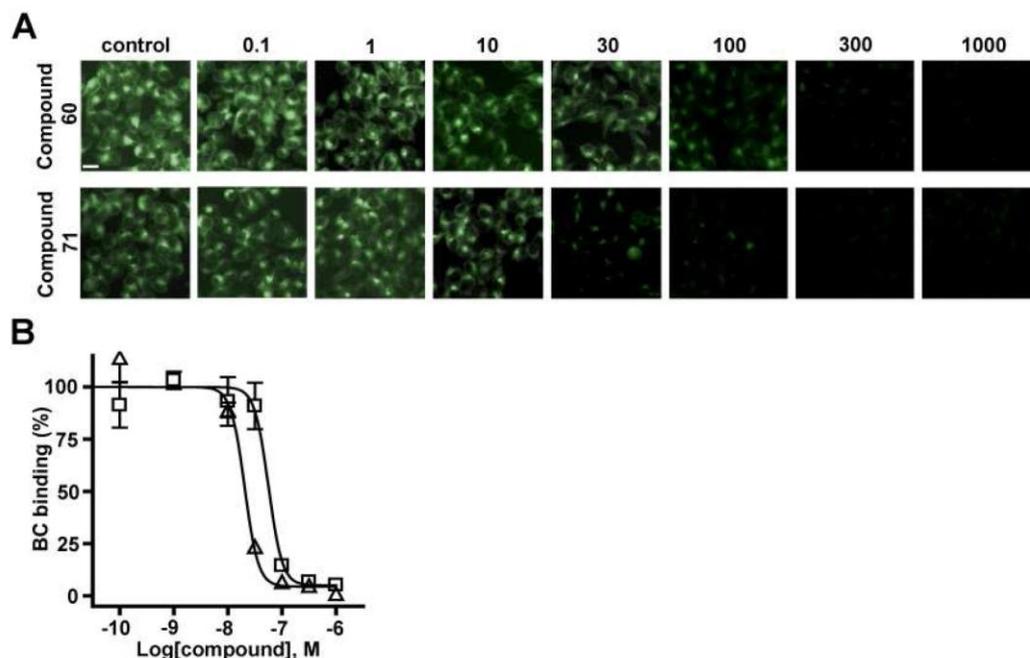


Figure 3. Inhibition of Bodipy-cyclopamine (BC) binding to HEK-hSmo cells by compound 60 and 71. (A) HEK-hSmo cells stably expressing human Smo were incubated with BC (5 nM) alone (control) or in the presence of increasing concentrations (nM) of the compound 60 (B, square) or compound 71 (B, triangle). BC binding (green) is visualized using fluorescence microscopy in a representative field (100-150 cells are shown, scale bar: 10 μ m). (B) The concentration-response curves were obtained by quantification of the BC fluorescence in 3 photographs for each coverslip as described in the experimental section. The values are expressed as % of the fluorescence detected in control HEK-hSmo cells incubated with BC alone. The data are representative of independent experiments ($n = 3$) and are the means \pm SEM of triplicates (B). Response curve fitting was calculated with Prism software (GraphPad).

Compounds **60** and **71** also blocked BC binding to hSmo in a dose-dependent manner with an IC₅₀ of 63 nM and 24 nM, respectively, comparable to that of GDC-0449 (Figure 3 and Table 5). The inhibition potency of these compounds correlates well with Hh inhibition as tested in Table 1. Altogether, these data

demonstrate that both compounds are potent antagonists of human and rodent Smo receptors.

Conclusion

In this study, we report the synthesis and the characterization of novel families of AcTU and AcU molecules that are potent inhibitors of Hh signaling. We have investigated the

structure-activity relationships around the three main regions that constitute these molecules. The AcTU analogue **60** and its AcU derivative **71** were found among the most potent inhibitors in several Hh assays and in inhibiting BC binding to human Smo. Both series of compounds have original chemical features and represent novel leads on the way to find new anticancer agents. Moreover, they should be valuable tools for further characterizing Hh signaling and Smo pharmacology both *in vitro* and *in vivo*.

Experimental section

General procedure. All reagents were used as purchased from commercial suppliers without further purification. The reactions were carried out in oven dried or flamed vessels and performed under N₂. Solvents were dried and purified by conventional methods prior use. The benzoylchlorides A-I were obtained from commercially available benzoic acids. Flash column chromatography was performed with Merck silica gel 60, 0.040-0.063 mm (230-400 mesh). Merck aluminium backed plates pre-coated with silica gel 60 (UV254) were used for thin layer chromatography and were visualized by staining with KMnO₄. ¹H, ¹³C spectra were recorded on Brüker (300 or 400 MHz / 75 or 100 MHz) spectrometers. Chemical shifts (δ) are given in ppm relative to the resonance of their respective residual solvent peak. Low resolution mass spectra were obtained on an Agilent 1100 LC/MS instrument in positive mode and HRMS were conducted at the Institut Federatif de Recherche at the Louis Pasteur University, Strasbourg, France. For MW reactions, a CEM Discover microwave oven equipped with a 10 mL tube for reactions under pressure was employed.

3,5-Dimethoxy-N-(3-phenylamidophenylcarbamothioyl)benzamide (**19**).

Ammonium thiocyanate (125 mg, 1.63 mmol) was dissolved in dry acetone (4 mL). To this stirred solution, 3,5-dimethoxybenzoyl chloride

B (320 mg, 1.36 mmol) was added, refluxing the reaction mixture for 20 minutes. After the solution became clear, benzamide **2a** (275 mg, 1.30 mmol) was added, and the reaction mixture refluxed for 60 minutes. Monitoring of the reaction was carried out by TLC, using petroleum ether/AcOEt 1/4. Upon disappearance of the starting amine, the reaction mixture was poured into a beaker containing ice. The resulting precipitate was filtered and crystallized from methanol, affording compound **19** (327 mg, 59% yield). M.p. 193-195°C. ¹H NMR (CDCl₃). 11.36 (s, 1H), 8.43-8.02 (bs, 2H), 7.90-7.42 (m, 9H), 7.15 (m, 3H), 3.94 (s, 6H). ¹³C NMR (DMSO, d₆); 179.5, 169.6, 165.5, 153.4, 144.5, 141.5, 138.1, 136.7, 133.3, 129.7, 129.0, 128.5, 127.0, 121.1, 119.9, 116.7, 106.1, 63.1, 62.8. ES/MS m/z 436 [M+1]⁺, 458 [M+Na]⁺ HRMS (ES⁺): calcd. for C₂₃H₂₁N₃NaO₄S, 458.1145; found, 458.1141.

N-(3-Benzamidophenylcarbamothioyl)-4-ethoxy-3,5-dimethoxybenzamide (20). Mp: 192-193°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.69 (brs, 1H), 9.01 (brs, 1H), 8.23 (brs, 1H), 8.23-7.41 (m, 9H), 7.08 (s, 2H), 4.17 (q, 2H), 3.94 (s, 6H), 1.39 (3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 166.7, 154.3, 141.5, 136.6, 134.0, 133.1, 128.7, 127.8, 127.1, 123.4, 117.5, 114.4, 106.4, 69.2, 56.1, 14.2. MS-ESI (m/z): 480 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): calcd for C₂₅H₂₆N₃O₅S, 480.1539; found, 480.1535

N-(3-Benzamidophenylcarbamothioyl)-3,4-diethoxy-5-methoxybenzamide (21). Mp: 172°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.68 (brs, 1H), 9.01 (brs, 1H), 8.21 (brs, 1H), 8.01-7.39 (m, 8H), 7.07 (s, 2H), 4.15 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 1.48 (t, 3H), 1.38 (t, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 178.6, 167.1, 166.5, 166.2, 154.4, 153.5, 138.9, 138.6, 135.1, 132.4, 129.9, 129.2, 127.5, 126.6, 120.4, 118.9, 115.9, 106.7, 105.2, 69.6, 65.5, 56.9, 16.0, 15.2. MS-ESI (m/z): 494 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): calcd for C₂₆H₂₈N₃O₅S [M+1]: 494.1750. Found 494.1746

N-(3-Benzamidophenylcarbamothioyl)-7-methoxybenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (22). Mp: 206°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.74 (brs, 1H), 11.43 (brs, 1H), 10.39

(s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.99-7.41, 9H), 7.31 (s, 1H), 6.16 (s, 2H), 3.94 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 179.0, 167.03, 165.6, 148.4, 142.7, 139.6, 139.3, 138.2, 134.8, 131.6, 128.8, 128.3, 127.7, 125.7, 119, 4, 118.1, 116.0, 109.6, 102.8, 102.5, 56.5. MS-ESI (m/z): 450 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): calcd for C₂₃H₁₉N₃O₅S C, 61.46; H, 4.26; N, 9.35; O, 17.80 ; S, 7.13. Found C, 61.40; H, 4.24; N, 9.31.

2,4-Dimethoxy-N-(3-phenylamidophenylcarbamoithiyl)benzamide (23). M.p. 208-211°C. ¹H NMR (CDCl₃). 11.90 (s, 1H), 8.40 (bs, 1H), 8.10 (bs, 1H), 7.90–7.54 (m, 9H), 7.15 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO, d₆) = 180.5, 168.3, 166.2, 154.5, 145.4, 140.3, 139.1, 137.1, 134.1, 129.2, 129.3, 128.4, 127.5, 121.6, 118.9, 115.1, 107.7, 64.0, 63.1. ES/MS m/z 436 [M+1]⁺, 458 [M+Na]⁺ HRMS (ES⁺): calcd. for C₂₃H₂₁N₃NaO₄S, 458,1145; found 458.1143.

N-(3-Benzamidophenylcarbamoithiyl)-3,4,5-triethoxybenzamide (24). Mp: 176-177°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.77 (brs, 1H), 11.52 (brs, 1H), 10.37 (brs, 1H), 8.17-7.40 (m, 7H), 7.36 (s, 2H), 4.12 (m, 6H), 1.36 (t, 6H), 1.25 (t, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 179.9, 168.4, 165.5, 153.0, 142.1, 140.4, 139.1, 135.6, 132.5, 129.6, 129.2, 128.5, 127.2, 120.3, 119.0, 116.9, 108.1, 69.0, 65.2, 65.1, 16.3, 15.5. MS-ESI (m/z): 508 [M+1]⁺. Calcd for C₂₇H₂₉N₃O₅S C, 63.89; H, 5.76; N, 8.28; O, 15.76; S, 6.32. Found C, 63.80; H, 5.72; N, 8.29.

N-(3-(Phenylcarbamoil)phenylcarbamoithiyl)-2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxine-6-carboxamide (25). Mp : 204-206°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.72 (brs, 1H), 11.35 (brs, 1H), 10.37 (brs, 1H), 8.15-7.96 (m, 3H), 7.69-6.98 (m, 9H), 4.32 (4H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 179.0, 167.2, 165.6, 147.9, 143.0, 139.5, 138.2, 134.8, 131.6, 128.7, 128.4, 127.7, 124.6, 122.6, 119.4, 118.1, 117.9, 117.0, 116.1, 64.5, 63.9. MS-ESI (m/z): 434 [M+1]⁺. Calcd for C₂₃H₁₉N₃O₄S: C, 63.73; H, 4.42; N, 9.69; O, 14.76; S, 7.40. Found C, 63.68; H, 4.40; N, 9.66.

3,4-Dimethoxy-N-(3-phenylamidophenylcarbamoithiyl)benzamide (26). M.p. 200-202°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ = 10.89 (s, 1H), 8.56 (bs, 1H), 8.19 (bs, 1H), 7.90–7.84 (m, 6H), 7.56 (m, 3H), 7.25 (m, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.64 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) = 179.7, 169.1 166.4, 156.3, 146.1, 140.6, 138.1, 137.7, 135.2, 129.6, 129.0, 128.6, 127.7, 122.6, 117.9, 112.6, 108.0, 61.5, 60.1. ES/MS m/z 436 [M+1]⁺, 458 [M+Na]⁺ HRMS (ES⁺) Calcd. for C₂₃H₂₁N₃NaO₄S, 458,1145; found, 458.1147.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(2-methoxybenzoyl)aminophenyl)amino)carbonothioyl)benzamide (27). M.p. 135-137°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.00 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 7.71 (s, 2H), 7.40-7.09 (m, 6H), 6.99 (s, 2H), 3.87 (s, 9H), 3.70 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.2, 166.9, 164.9, 161.7, 155.6, 143.9, 141.0, 137.2, 133.7, 128.4, 121.1, 120.6, 113.5, 112.9, 111.1, 61.9, 59.7, 58.8. ES/MS m/z 496 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₅H₂₆N₃O₆S, 496.5566; found ,496.5567.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(3-methoxybenzoyl)aminophenyl)amino)carbonothioyl)benzamide (28). M.p. 161-164°C. ¹H NMR (300 MHz CDCl₃) δ = 11.88 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 7.70 (s, 2H), 7.41-7.11 (m, 6H), 6.90 (s, 2H), 3.89 (s, 9H), 3.80 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.7, 166.5, 165.5, 160.3, 156.9, 145.0, 140.9, 136.2, 133.1, 129.0, 121.8, 121.0, 113.5, 112.0, 111.1, 61.5, 57.7, 55.8. ES/MS m/z 496 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₅H₂₆N₃O₆S 496.5566; found 496.5562.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(4-methoxybenzoyl)aminophenyl)amino)carbonothioyl)benzamide (29). M.p. 166-168°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.78 (s, 1H), 9.95 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.40-7.09 (m, 6H), 6.93 (s, 2H), 3.89 (s, 9H), 3.78 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.3, 166.7, 165.5, 161.3, 156.1, 144.7, 140.9, 136.8, 132.1, 129.4, 120.9, 120.3, 113.7, 112.9, 110.3, 61.5, 56.7, 55.8. ES/MS m/z 496 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₅H₂₆N₃O₆S, 496.5566; found 496.5569.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(3-(2-chlorobenzoyl)aminophenylamino)carbonothioyl)benzamide (30). M.p. 176-178°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.90 (s, 1H), 9.05-8.78 (bs, 2H), 7.75 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.40-7.12 (m, 6H), 6.90 (s, 2H), 3.85 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.5, 166.4, 165.2, 155.3, 142.8, 139.5, 136.6, 132.6, 130.9, 130.0, 129.0, 128.6, 127.4, 120.9, 120.2, 113.5, 110.1, 61.2, 57.6. ES/MS m/z 500 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₂₃ClN₃O₅S, 500.9753; found 500.9747.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(3-(4-chlorobenzoyl)aminophenylamino)carbonothioyl)benzamide (31). M.p. 150-151°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.78 (s, 1H), 9.05-8.70 (bs, 2H), 7.70 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.40-7.12 (m, 6H), 6.87 (s, 2H), 3.89 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.4, 167.4, 165.0, 156.3, 141.1, 139.4, 137.2, 131.6, 130.1, 130.6, 129.4, 128.0, 127.6, 121.5, 121.2, 113.8, 110.1, 61.9, 59.6. ES/MS m/z 500 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₂₃ClN₃O₅S, 500.9753; found 500.9749.

***N*-(3-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioylaminophenyl)biphenyl-4-carboxamide (32).** M.p. 143-145 °C. ¹H NMR (300 MHz CDCl₃) δ = 11.10 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.88 (m, 1H), 8.95 (s, 1H), 7.53-7.35 (m, 9H), 7.40-7.10 (m, 4H), 6.89 (m, 2H), 3.89 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 182.0, 167.7, 164.3, 155.9, 144.5, 142.3, 139.8, 139.2, 135.8, 134.3, 132.3, 130.0, 129.9, 129.6, 129.2, 128.1, 120.4, 120.0, 113.3, 110.0, 61.1, 58.8. ES/MS m/z 542 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₃₀H₂₈N₃O₅S, 542.6265; found 542.6260.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioyl)aminophenyl)-benzamide (33). M.p. 166-169 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 11.5 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 7.37-7.05 (m, 4H), 6.90 (m, 4 H), 3.87-3.80 (18H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.9, 167.7, 165.4, 155.9, 153.4, 142.3, 141.1, 139.9, 165.7, 130.0, 129.6, 120.9, 120.0, 113.6, 110.3, 107.6, 60.8, 59.6, 58.7. ES/MS m/z 556 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺):

Calcd. for C₂₇H₃₀N₃O₈S, 556.6085; found 556.6080.

4'-Fluoro-*N*-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioylaminophenyl)biphenyl-4-carboxamide (34). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.2 (s, 1H), 9.01 (bs, 2H), 7.55-6.93 (m, 12H), 6.90 (s, 2H), 3.90 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 181.3, 166.3, 164.7, 166.19 and 159.7 (C-F), 155.2, 143.7, 142.6, 140.7, 139.9, 136.5, 135.4, 130.2, 129.3, 128.7, 127.8, 127.4, 120.2, 116.2, 115.3, 112.4, 110.3, 61.1, 58.7. ES/MS m/z 560 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₃₀H₂₇FN₃O₅S, 560.6170; found, 560.6166.

***N*-(3-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioylaminophenyl)isonicotinamide (35).** M.p. 187 °C dec. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 13.78 (s, 1H), 8.95-8.75 (bs, 2H), 8.82 (s, 2H), 7.83 (s, 2H), 7.40-7.20 (m, 4H), 6.83 (s, 2H), 3.90 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.3, 168.3, 166.3, 155.2, 150.2, 142.8, 142.6, 139.5, 137.6, 127.4, 122.3, 120.8, 113.8, 110.3, 109.2, 60.4, 58.9. ES/MS m/z 467 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₃H₂₃N₄O₅S, 467.5190; found, 467.5187.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(3-cyclohexanecarboxamido)phenylcarbamothioyl)benzamide (36). M.p. 66-68°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.69 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.93-7.49 (m, 4H), 7.20 (m, 2H), 3.94 (s, 9H), 3.01 (m, 1H), 2.01 (m, 4 H), 1.80-1.60 (m, 6 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 177.0, 168.0, 167.6, 153.2, 144.5, 141.4, 136.1, 135.6, 130.5, 128.5, 127.5, 120.3, 119.1, 116.9, 106.2, 60.9, 44.8, 32.8, 29.9, 27.2. ES/MS m/z 472 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₃₀N₃O₅S, 472,1901; found 472.1989.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(3-(2-thienylcarboxamido)phenylcarbamothioyl)benzamide (37). M.p. 150°C dec. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.16 (s, 1H), 8.70-8.50 (bs, 2H), 7.86 (d, J 1 H, J = 5 Hz), 7.74-7.43 (m, 4 H), 7.30-7.18 (m, 3 H), 6.88 (m, 1H), 3.85 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.0, 167.1, 165.9, 155.2, 142.7, 141.2, 140.5, 140.0, 135.6, 132.8, 130.6, 129.5, 128.5, 120.80, 110.1, 108.5, 60.58, 56.27. ES/MS m/z 472

[M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₂H₂₂N₃O₅S₂, 472,1001; found 472.1005.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-isopropoylcarboxamido)phenylcarbamothioyl)benzamide (38). M.p. 100-103°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.76 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.10 (m, 1H), 7.84–7.33 (m, 4H), 7.22 (m, 2H), 3.96 (s, 9H), 3.11 (m, 1H), 1.89 (d, 3H, J = 7 Hz), 1.84 (d, 3H, J = 7 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 178.7, 169.2, 168.6, 154.2, 147.4, 142.1, 137.8, 136.1, 131.5, 128.5, 127.5, 120.3, 119.8, 117.0, 105.3, 61.9, 40.8, 27.8, 26.9. ES/MS m/z 432 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₁H₂₆N₃O₅S, 432,1593; found 432.1590.

N-(3-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioylaminophenyl)-1-naphthamide (39). M.p. 139-141°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.90 (s, 1H), 9.70-9.30 (bs, 2H), 8.96 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.73-7.10 (m, 8H), 6.98 (m, 2H), 3.87 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 181.2, 166.3, 165.2, 155.6, 142.3, 139.9, 136.4, 133.3, 132.2, 131.8, 129.2, 128.9, 128.4, 127.0, 125.6, 125.8, 124.7, 110.3, 61.4, 57.7. ES/MS m/z 516 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₈H₂₆N₃O₅S, 516.5893; found 516.5888

N-(3-(3,4,5-Trimethoxybenzoyl)aminocarbonothioylamino)phenyl)-2-naphthamide (40). M.p. 159-161°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.00 (s, 1H), 9.70-9.60 (bs, 2H), 8.88 (m, 1H), (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.73-7.10 (m, 8H), 6.98 (m, 2H), 3.87 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 181.2, 166.3, 165.2, 155.6, 142.3, 139.9, 136.4, 133.3, 132.2, 131.8, 129.2, 128.9, 128.4, 127.0, 125.6, 125.8, 124.7, 110.3, 61.4, 57.7. ES/MS m/z 516 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₈H₂₆N₃O₅S, 516.5893; found 516.5888.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(2-furanoylcarboxamido)phenylcarbamothioyl)benzamide (41). M.p. 93-95°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.76 (s, 1H), 8.60-8.40 (bs, 2H), 7.96 (d, J 1 H, J = 5 Hz), 7.84–7.33 (m, 4 H), 7.20-7.10 (m, 3 H), 6.86 (m, 1H), 3.95 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 179.0, 169.1, 166.9, 154.2, 148.7, 143.2, 142.5, 140.4, 139.1, 135.6, 127.5, 120.3, 119.1, 116.9, 116.5,

111.3, 107.2, 62.1. ES/MS m/z 456 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₂H₂₂N₃O₆S 456,1229; found 456.1226.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(4-morpholin-4-ylbenzoyl)aminophenylamino)carbonothioyl)-benzamide (42). M.p. 143-145 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 10.21 (s, 1H), 9.01 (bs, 2H), 7.50 (m, 2H), 7-35-7.00 (m, 6H), 6.93 (s, 3H), 3.96 (s, 9H), 3.70 (m, 4H), 3.12 (m, 4H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.2, 166.6, 164.9, 155.9, 142.3, 139.4, 136.7, 129.9, 129.6, 128.7, 128.0, 120.8, 120.4, 114.2, 110.8, 107.8, 66.9, 60.7, 56.7, 48.8. ES/MS m/z 551 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₈H₃₁N₄O₆S, 551.6351; found 551.6351.

3,4,5-Trimethoxy-N-(3-(3-phenylureido)phenylcarbamothioyl)benzamide (43). Mp : ≥ 250°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.76 (brs, 1H), 11.56 (brs, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.48-6.95 (m, 10H), 3.89 (s, 6H), 3.76 (s, 3H). MS-ESI (m/z): 481 [M+1]⁺; Calcd for C₂₄H₂₄N₄O₅S: C, 59.99; H, 5.03; N, 11.66; O, 16.65; S, 6.67. Found C, 60.04; H, 5.06; N, 11.61.

N-(3-(3-Biphenyl-4-ylureido)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (44) Mp: 220°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.78 (brs, 1H), 11.57 (brs, 1H), 8.90 (brs, 1H), 8.84 (brs, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.65-7.33 (m, 16H), 3.88 (s, 6H), 3.75 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 178.9, 167.5, 152.5, 152.4, 141.6, 140.1, 139.8, 139.1, 138.4, 133.6, 129.0, 128.9, 127.0, 126.8, 126.7, 126.1, 118.6, 117.5, 116.0, 113.7, 106.4, 60.1, 56.1. MS-ESI (m/z): 557 [M+1]⁺; Calcd for C₃₀H₂₈N₄O₅S: C, 64.73; H, 5.07; N, 10.07; O, 14.37; S, 5.76. Found: C, 64.73; H, 5.07; N, 10.07.

N-(3-(1H-Indol-2-yl)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (45). Mp: 131°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.27 (brs, 1H), 9.05 (brs, 1H), 8.47 (brs, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.67-7.11 (m, 9H), 6.88 (brs, 1H), 3.96 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 180.0, 168.4, 153.6, 142.7, 139.4, 138.0, 137.6, 133.8, 129.8, 129.5, 127.6, 123.8, 123.5, 122.5, 121.4, 120.8, 120.1, 111.8, 106.7, 99.8, 60.5, 56.4. MS-

ESI (m/z): 462 [M+1]⁺; Calcd for C₂₅H₂₃N₃O₅S: C, 62.88; H, 4.85; N, 8.80; O, 16.75; S, 6.71. Found: C, 62.80; H, 4.80; N, 8.77.

***N*-(3-(Imidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenylcarbamoithiyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (46).** Mp: 136-137°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.85 (brs, 1H), 11.62 (brs, 1H), 8.55-8.31 (m, 3H), 7.8-6.90 (m, 8H), 3.89 (s, 6H), 3.76 (s, 3H). MS-ESI (m/z): 463 [M+1]⁺; Calcd for C₂₄H₂₂N₄O₄S: C, 62.32; H, 4.79; N, 12.11; O, 13.84; S, 6.93. Found: C, 62.27; H, 4.75; N, 12.06.

***N*-(3-(1*H*-Benzo[*d*]imidazol-1-yl)phenylcarbamoithiyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (47).** Mp: 214°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.88 (brs, 1H), 10.09 (brs, 1H), 8.57-8.35 (2H), 7.61-7.30 (m, 5H), 7.18-7.05 (m, 4H), 3.83 (s, 9H). MS-ESI (m/z): 463 [M+1]⁺; Calcd for C₂₄H₂₂N₄O₄S: C, 62.32; H, 4.79; N, 12.11; O, 13.84; S, 6.93. Found: C, 62.27; H, 4.74; N, 12.07.

***N*-(3-(Imidazo[2,1-*b*]thiazol-6-yl)phenylcarbamoithiyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (48).** Mp: 133-134°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.83 (brs, 1H), 11.59 (brs, 1H), 8.25-8.18 (m, 2H), 7.93 (d, J = 4Hz, 1H), 7.94-7.28 (m, 5H), 7.27 (d, J = 6Hz, 1H), 3.88 (s, 6H), 3.76 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 180.0, 168.3, 153.4, 146.4, 142.5, 139.3, 135.7, 129.8, 127.5, 123.4, 121.3, 120.9, 114.1, 110.6, 107.2, 61.0, 57.0. MS-ESI (m/z): 469 [M+1]⁺; Calcd for C₂₂H₂₀N₄O₅S₂: C, 54.53; H, 4.16; N, 11.56; O, 16.51; S, 13.24. Found C, 54.59; H, 4.12; N, 11.54.

***N*-(3-(1*H*-Indol-1-yl)phenylcarbamoithiyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (49).** Mp: 130-131°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.88 (brs, 1H), 8.09 (d, J = 6Hz, 1H), 7.71-6.68 (m, 7H), 6.68 (d, J = 6Hz, 1H), 3.92 (s, 6H), 3.90 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 180.2, 168.2, 153.4, 142.5, 140.0, 139.9, 135.8, 130.9, 130.0, 129.0, 127.4, 123.3, 122.0, 121.8, 121.3, 120.2, 111.3, 107.2, 104.8, 61.0, 57.0. MS-ESI (m/z): 462 [M+1]⁺; Calcd for C₂₅H₂₃N₃O₄S: C, 65.06; H, 5.02; N, 9.10; O, 13.87; S, 6.95. Found C, 65.00; H, 5.06; N, 9.15.

***N*-(3-Benzoylamino-4-chlorophenylaminocarbonothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (50).** M.p. 150-151 °C, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.20 (s, 1H), 9.01 (bs, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.65-7.00 (m, 6H), 6.93 (s, 2H), 3.96 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.4, 166.5, 164.3, 155.3, 142.6, 139.8, 137.8, 134.2, 131.8, 129.3, 128.2, 127.9, 125.6, 121.5, 119.9, 110.1, 61.5, 56.7. ES/MS m/z 501 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₂₃ClN₃O₅S, 500.9753; Found 500.9749.

***N*-(3-(Benzoylamino-4-fluorophenylamino carbonothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (51)** M.p. 176-178 °C, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.34 (s, 1H), 9.01 (bs, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.65-7.00 (m, 6H), 6.93 (s, 2H), 3.96 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.4, 166.5, 164.3, 155.3, 142.6, 139.8, 137.8, 134.2, 131.8, 129.3, 128.2, 127.9, 125.6, 121.5, 119.9, 110.1, 61.5, 56.7. ES/MS m/z 484 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₂₃FN₃O₅S, 484.5210; Found 484.5211.

***N*-(3-(Benzoylamino-4-methoxyphenylaminocarbonothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (52).** M.p. 185-186 °C, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.10 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.75-7.00 (m, 6H), 6.88 (s, 2H), 3.96-3.87 (s, 12H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.0, 166.9, 164.0, 156.3, 143.2, 142.2, 135.5, 134.9, 131.6, 129.8, 128.4, 122.7, 122.3, 118.6, 113.3, 110.0, 60.5, 59.8, 56.6. ES/MS m/z 496 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₅H₂₆N₃O₆S, 496.5566; Found 496.5560.

***N*-(3-Benzamido-2-methylphenylcarbamoithiyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (53).** M.p.: 205-207°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.41 (brs, 1H), 11.68 (brs, 1H), 10.06 (brs, 1H), 8.03-8.00 (m, 2H), 7.58-7.35 (m, 8H), 3.90 (s, 6H), 3.77 (s, 3H), 3.14 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 180.5, 167.5, 165.4, 152.5, 141.6, 137.6, 137.2, 134.3, 131.6, 130.6, 128.4, 127.6, 125.9, 125.5, 125.1, 60.1, 56.1, 13.0. MS-ESI (m/z): 480 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): Calcd for C₂₅H₂₆N₃O₅S: 480.1593. Found 480.1590

***N*-(5-Benzamido-2-fluorophenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (54).** Mp : 153°C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.71 (brs, 1H), 11.78 (brs, 1H), 10.42 (brs, 1H), 8.56-7.96 (m, 3H), 7.72-7.34 (m, 7H), 3.89 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 181.1, 168.5, 166.4, 154.9, 153.4, 150.3, 142.6, 136.1, 135.5, 132.5, 129.2, 128.5, 127.3, 126.6, 120.7, 119.6, 116.5, 116.1, 61.0, 57.0. MS-ESI (m/z): 484 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): calcd for C₂₄H₂₃FN₃O₅S [M+1]: 484.1342. Found 484.13.38.

4'-Fluoro-*N*-(2-methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)thioureido)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (55). Mp: 217°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 12.75 (brs, 1H), 11.59 (brs, 1H), 10.62 (brs, 1H), 8.12-7.31 (m, 13H), 3.89 (s, 6H), 3.76 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 179.0, 167.5, 165.9, 160.7, 152.6, 142.1, 141.7, 136.5, 135.9, 135.6, 133.1, 131.7, 130.3, 129.0, 128.9, 128.4, 126.6, 121.9, 121.8, 116.0, 115.9, 115.7, 106.4, 60.2, 56.2, 17.6. MS-ESI (m/z): 574 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): Calcd for C₃₁H₂₈FN₃O₅S: 574.1812. Found 574.1819.

***N*-3-(Benzoylamino-4-methylphenylaminocarbonothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (56)** M.p. 190 °C dec, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.2 (bs, 1H), 8.80 (bs, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.65-7.05 (m, 6H), 6.90 (s, 2H), 3.96 (s, 9H), 2.24 (s, 3H). ¹³C NMR (300 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.0, 166.9, 164.0, 156.7, 142.5, 141.4, 135.5, 132.0, 131.1, 130.0, 128.9, 128.7, 121.3, 119.9, 110.3, 60.5, 57.6, 20.0. ES/MS m/z 480 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₅H₂₆N₃O₅S: 480.5572; found 480.5569.

***N*-(2-Methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)thioureido)phenyl)biphenyl-3-carboxamide (57).**

Mp : 193-194°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.56 (brs, 1H), 9.01 (brs, 1H), 8.38 (brs, 1H), 8.13 (brs, 1H), 7.84-7.09 (m, 15H), 3.95 (s, 9H), 2.37 (s, 3H). MS-ESI (m/z): 556 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺): calcd for C₃₁H₃₀N₃O₅S, 556.1901; found, 556.1897.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(4-methyl-3-(4-phenoxybenzamido)phenylcarbamothioyl)benzamide (58)

Mp: 185-186°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.55 (brs, 1H), 9.04 (brs, 1H), 8.35 (brs, 1H), 7.89-7.06 (m, 16H), 3.95 (s, 6H), 3.94 (s, 3H), 2.34 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 178.3, 167.0, 165.4, 161.3, 156.1, 153.8, 143.1, 136.5, 131.1, 131.0, 130.6, 130.6, 130.4, 129.5, 129.2, 128.8, 127.0, 124.8, 121.5, 120.3, 119.5, 118.2, 105.4, 61.4, 56.8, 18.0. MS-ESI (m/z): 572 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺) Calcd for C₃₁H₃₀N₃O₆S, 572.1855. Found 572.1860

***N*-(2-Chloro-5-(3,4,5-trimethoxybenzoylaminocarbonothioylamino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (59).** ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 10.77 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 7.70-7.00 (m, 12H), 6.90 (s, 2H), 3.96 (s, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.0, 166.9, 164.0, 156.3, 142.9, 142.6, 141.1, 140.0, 136.9, 134.4, 129.9, 129.4, 128.8, 128.7, 126.8, 125.6, 123.4, 120.2, 110.3, 61.4, 57.6. ES/MS m/z 577 [M+1]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₃₀H₂₇ClN₃O₆S, 577.0713; found 577.0719.

***N*-(2-Methyl-5-(3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)thioureido)phenyl)biphenyl-3-carboxamide (60).**

Mp : 193-194°C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 12.56 (brs, 1H), 9.01 (brs, 1H), 8.38 (brs, 1H), 8.13 (brs, 1H), 7.84-7.09 (m, 15H), 3.95 (s, 9H), 2.37 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ = 178.3, 167.0, 165.4, 161.3, 156.1, 153.8, 143.1, 136.5, 131.1, 131.0, 130.6, 130.6, 130.4, 129.5, 129.2, 128.8, 127.0, 124.8, 121.5, 120.3, 119.5, 118.2, 105.4, 61.4, 56.8, 18.0. MS-ESI (m/z): 556 [M+1]⁺; Calcd for C₃₁H₂₉N₃O₅S C, 67.01; H, 5.26; N, 7.56; O, 14.40; S, 5.77. Found: C, 67.10; H, 5.29; N, 7.59.

***N*-(2-Methyl-5-(3,4,5-trimethoxybenzoylaminocarbonothioylamino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (61).** ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 11.00 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.70-7.00 (m, 12H), 6.87 (s, 2H), 3.96 (s, 9H), 2.10 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆); δ = 180.4, 166.5, 164.3, 156.9, 142.6, 142.1, 142.0, 140.4, 136.7, 135.4, 128.8, 128.7, 126.8, 125.6, 121.1, 118.7,

110.1, 61.2, 57.6, 20.1. ES/MS m/z 555 $[M+1]^+$
HRMS (ES+): Calcd. for $C_{31}H_{29}N_3O_5S$
555.6452; found 555.6448.

***N*-(4-Chloro-3-(phenylcarbamoyl)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (62).** Mp: 164°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ = 12.79 (brs, 1H), 11.69 (brs, 1H), 10.58 (brs, 1H), 7.98-7.60 (m, 5H), 7.40-7.08 (m, 5H), 3.88 (s, 6H), 3.76 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, d_6) δ = 179.5, 167.3, 164.1, 152.5, 141.7, 138.8, 137.0, 136.9, 129.8, 128.8, 127.0, 126.8, 126.5, 124.3, 123.9, 119.6, 106.3, 60.1, 56.1. MS-ESI (m/z): 500 $[M+1]^+$; Calcd for $C_{24}H_{22}ClN_3O_5S$: C, 57.66; H, 4.44; Cl, 7.09; N, 8.40; O, 16.00; S, 6.41. Found C, 57.61; H, 4.42.

***N*-(4-Chloro-3-(4-chlorophenylcarbamoyl)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (63)** Mp: 187-188°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ = 12.78 (brs, 1H), 11.69 (brs, 1H), 10.72 (brs, 1H), 7.97-7.40 (m, 10H), 3.88 (s, 6H), 3.76 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 180.3, 168.1, 165.1, 153.4, 142.6, 138.5, 137.9, 137.4, 130.7, 129.6, 128.4, 127.8, 127.3, 125.2, 122.0, 107.2, 61.0, 57.0. MS-ESI (m/z): 535 $[M+1]^+$; Calcd for $C_{24}H_{21}Cl_2N_3O_5S$: C, 53.94; H, 3.96; Cl, 13.27; N, 7.86; O, 14.97; S, 6.00. Found C, 53.90; H, 3.93.

***N*-(4-Chloro-3-(4-(dimethylamino)phenylcarbamoyl)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (64).** Mp: 201°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ = 12.7 (brs, 1H), 11.6 (brs, 1H), 10.24 (brs, 1H), 7.92-7.39 (m, 7H), 7.72 (d, J = 9Hz, 2H), 3.88 (s, 6H), 3.75 (s, 3H), 2.86 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 179.4, 167.3, 163.4, 152.5, 147.4, 141.7, 137.3, 136.9, 129.8, 128.6, 127.0, 1216.5, 124.3, 120.9, 112, 5, 106.3, 60.1, 56.1. MS-ESI (m/z): 544 $[M+1]^+$; Calcd for $C_{26}H_{27}ClN_4O_5S$: C, 57.51; H, 5.01; Cl, 6.53; N, 10.32; O, 14.73; S, 5.90. Found: C, 57.52; H, 5.05.

***N*-(4-Chloro-3-(4-methoxyphenylcarbamoyl)phenylcarbamothioyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (65).** Mp: 164-166°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ = 12.76 (brs, 1H), 11.69 (brs, 1H), 10.62 (brs,

1H), 7.95-6.91 (m, 10H), 3.88 (s, 6H), 3.76 (s, 3H), 3.75 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, d_6) δ = 179.4, 167.3, 163.7, 155.6, 152.5, 141.7, 137.0, 136.9, 131.9, 129.8, 127.0, 126.7, 126.5, 124.3, 121.1, 113.9, 106.3, 60.1, 56.1, 55.2. MS-ESI (m/z): 530 $[M+1]^+$; Calcd for $C_{25}H_{24}ClN_3O_6S$: C, 56.66; H, 4.56; Cl, 6.69; N, 7.93; O, 18.11; S, 6.05. Found: C, 56.61; H, 4.52.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-(4-methyl-3-(phenylcarbamoyl)phenylcarbamothioyl)benzamide (66). Mp: 190°C. 1H NMR (300 MHz, DMSO, d_6) δ = 12.74 (brs, 1H), 11.54 (brs, 1H), 10.30 (brs, 1H), 7.77-7.05 (m, 10H), 3.87 (s, 6H), 3.75 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO, d_6) δ = 179.2, 167.4, 167.0, 152.5, 141.9, 141.1, 139.1, 137.2, 135.5, 133.3, 130.8, 128.7, 126.6, 125.4, 123.6, 122.9, 119.7, 106.3, 60.1, 56.2. MS-ESI (m/z): 480 $[M+1]^+$; Calcd for $C_{25}H_{25}N_3O_5S$: C, 62.61; H, 5.25; N, 8.76; O, 16.68; S, 6.69. Found; C, 62.57; H, 5.21; N, 8.73.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-3-(phenylamidophenylcarbamoyl)benzamide (71), general procedure. The acyl thiourea **31** (100 mg, 0.21 mmol) is suspended in MeCN (2 mL). This solution is added dropwise to a previously prepared solution of CuCl (20 mg, 0.2 mmol) in 2 mL MeCN inside to a microwave tube. Afterwards, 80 μ L of a 2.5 M solution of NaOH (0.2 mmol) is added. The tube is inserted in the microwave oven and irradiated for two cycles (Pmax: 50 psi; ramp time: 1 min; hold time: 6 min; T: 120 °C; Power: 200 W). After the reaction, the crude is diluted with CH_2Cl_2 , the organic phase is washed with a 30% ammonia solution, until the blue colour disappears in the aqueous phase. The organic phase is dried, filtered and evaporated *in vacuo* to furnish a crude which is purified *via* flash chromatography, using a petrol ether/ethyl acetate 95/5 to 1/1 eluent mixture. Obtained 56 mg of compound **71** (55% yield). M.p. 192°C dec 1H NMR, (400 MHz, DMSO, d_6) δ = 11.02 (m, 2H), 10.33 (bs, 1H), 8.09-7.97 (m, 3H), 7.60-7.30 (m, 8H), 3.95 (s, 9 H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, d_6); δ = 169.3, 166.5, 157.3,

154.5, 142.3, 139.8, 137.5, 137.2, 132.4, 129.1, 128.9, 128.1, 126.4, 112.1, 112.0, 109.3, 108.7, 61.2, 58.9. ES/MS m/z 472 $[M+Na]^+$ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₂₄H₂₃N₃NaO₆, 472.4458; Found 472.4453.

***N*-(3-Benzamidophenylcarbamoyl)-7-methoxybenzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (67).** Mp : 250-252°C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 10.95 (brs, 1H), 10.90 (brs, 1H), 8.05-7.95 (m, 3H), 7.59-7.32 (m, 9H), 1.93 (s, 2H), 3.91 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆) δ = 167.5, 165.6, 151.1, 148.3, 142.7, 139.7, 137.8, 134.8, 131.6, 129.1, 128.3, 127.7, 125.9, 116.1, 115.1, 11.7, 109.2, 84.2, 56.4. MS-ESI (m/z): 434 $[M+1]^+$; Calcd for C₂₃H₁₉N₃O₆: C, 63.74; H, 4.42; N, 9.70; O, 22.15. Found: C, 63.70; H, 4.41; N, 9.74.

***N*-(3-Benzamidophenylcarbamoyl)-3,4,5-triethoxybenzamide (68).** Mp : 220-222°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ = 11.00 (brs, 2H), 10.31 (brs, 1H), 8.07-7.94 (m, 3H), 7.60-7.31 (m, 8H), 4.13-4.01 (m, 6H), 1.39-1.21 (m, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 166.9, 166.3, 158.9, 148.4, 143.5, 137.2, 132.4, 130.5, 129.1, 128.4, 125.7, 119.3, 115.0, 112.4, 109.7, 64.3, 67.4, 14.8, 14.5. MS-ESI (m/z): 492 $[M+1]^+$; Calcd for C₂₇H₂₉N₃O₆: C, 65.97; H, 5.95; N, 8.55; O, 19.53. Found: C, 65.90; H, 5.91; N, 8.50.

3,4,5-Trimethoxy-*N*-[(3-(4-methoxybenzoyl)aminophenylamino)carbonyl]benzamide (69). M.p. 208-210°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ = 10.3 (bs, 2 H), 9.45 (bs, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.40 (m, 4H), 7.02 (m, 4H), 3.84 (s, 6 H), 3.70 (s, 3H), 3.68 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 166.9, 165.8, 162.4, 154.8, 148.2, 142.3, 139.3, 137.2, 131.7, 130.2, 128.2, 126.3, 115.2, 113.8, 112.2, 109.3, 60.58, 56.7, 55.4. MS-ESI (m/z): 480 $[M+1]^+$; Calcd for C₂₅H₂₅N₃O₇: C, 62.62; H, 5.26; N, 8.76; O, 23.36. Found C, 62.57; H, 5.24; N, 8.70.

***N*-(3-(Isobutrylamino)phenylaminocarbonyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (70)** M.p. 165-167°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ 10.45 (bs, 3H), 7.57-7.02 (m, 6H), 3.87 (s, 6H), 3.80 (s, 3H), 3.03 (hept. J = 7 Hz, 1H), 1.06 (d, J = 7

Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 173.2, 166.3, 154.3, 148.6, 142.3, 139.3, 137.6, 130.5, 126.4, 119.3, 109.4, 60.4, 56.4, 38.2, 19.9. MS-ESI (m/z): 416 $[M+1]^+$; Calcd for C₂₁H₂₅N₃O₆: C, 60.71; H, 6.07; N, 10.11; O, 23.11. Found; C, 60.66; H, 6.01; N, 10.15.

***N*-(2-Methyl-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl-amino)carbonylamino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (71)** M.p. = 235°C dec. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ = 10.90 (bs, 1H), 10.05 (bs, 2H), 8.03 (m, 1H), 7.51-7.06 (m, 13H), 3.86 (s, 3H), 3.80 (s, 6H), 2.24 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 166.9, 165.5, 154.8, 148.5, 142.3, 139.8, 138.4, 136.3, 132.9, 130.1, 129.9, 129.4, 129.0, 128.3, 124.4, 119.8, 116.3, 109.2, 60.6, 56.2, 17.9. MS-ESI (m/z): 416 $[M+1]^+$; Calcd for C₃₁H₂₉N₃O₆: C, 69.00; H, 5.42; N, 7.79; O, 17.79. Found C, 68.92; H, 5.40; N, 7.77.

***N*-(3-(4-Chlorobenzoylamino-2-methylphenyl-amino)carbonyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (72).** M.p. 199-201°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO, d₆) δ = 10.98 (bs, 1H), 10.31 (bs, 1H), 9.00 (bs, 1H), 7.55-6.98 (m, 9H), 3.84 (s, 9H), 1.77 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO, d₆) δ = 166.9, 165.4, 154.8, 150.0, 142.3, 136.8, 136.6, 133.7, 129.2, 129.0, 128.7, 126.4, 119.3, 114.2, 109.5, 60.4, 56.8, 10.9. MS-ESI (m/z): 521 $[M+Na]^+$; Calcd for C₂₄H₂₄ClN₃O₆: C, 60.30; H, 4.86; Cl, 7.12; N, 8.44; O, 19.28. Found C, 60.21; H, 4.82; N, 8.42.

***N*-(2-Methyl-3-(3,4,5-trimethoxybenzoylamino)carbonylamino-phenyl)biphenyl-4-carboxamide (73)** M.p. = 245°C dec. ¹H NMR, (DMSO, d₆) δ = 10.11 (m, 1H), 9.00-8.50 (bs, 2H), 7.72-7.00 (m, 12H), 6.90 (m, 2H), 3.90 (s, 9 H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (DMSO, d₆); δ = 166.4, 164.4, 154.4, 153.4, 144.6, 142.3, 139.8, 137.9, 136.6, 132.9, 129.8, 129.6, 129.4, 128.3, 128.0, 122.4, 118.4, 117.3, 110.0, 61.2, 59.8, 21.0. ES/MS m/z 562 $[M+Na]^+$ HRMS (ES⁺): calcd. for C₃₁H₂₉N₃NaO₆, 562.5684; found 562.5680.

***N*-(3-(3,4,5-Trimethoxybenzoylamino)carbonylamino)phenyl)-2-naphthamide (74).** M.p.: 206-209 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.20 (bs, 1H),

10.6 (bs, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.20-7.00 (m, 12H), 3.85 (s, 3H), 3.82 (s, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 170.3, 165.8, 154.9, 147.2, 142.3, 139.5, 138.9, 133.6, 131.7, 130.5, 128.4, 127.3, 126.4, 125.3, 119.3, 115.3, 112.5, 109.4, 50.5, 58.7. ES/MS m/z 562 [M+Na]⁺ HRMS (ES⁺): calcd. for C₂₈H₂₅N₃NaO₆ 522.5045; found 522.5040.

N-(3-(1*H*-Indol-2-yl)phenylcarbamoyl)-3,4,5-trimethoxybenzamide (75). Mp: 145-148°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ = 11.27 (brs, 1H), 10.05 (brs, 1H), 8.42 (brs, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.54-7.14 (m, 9H), 6.98 (brs, 1H), 3.96 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 165.3, 154.8, 153.2, 142.4, 139.5, 133.8, 132.2, 130.5, 128.7, 125.1, 120.3, 119.7, 119.5, 118.9, 114.3, 111.1, 109.3, 60.5, 58.8. MS-ESI (m/z): 446 [M+1]⁺; HRMS (ES⁺) Calcd for C₂₅H₂₄N₃O₅, 446.4753; found 446.4749.

N-(2-Chloro-5-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)aminocarbonylamino)phenyl)biphenyl-4-carboxamide (76). ¹H NMR, (300 MHz, DMSO, d₆) δ = 10.05 (m, 1H), 9.00-8.50 (bs, 2H), 7.70-7.00 (m, 12H), 6.90 (m, 2H), 3.90 (s, 9 H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO, d₆); δ = 166.4, 164.4, 154.4, 153.4, 144.6, 142.3, 139.8, 137.9, 136.6, 132.9, 129.8, 129.6, 129.4, 128.3, 128.0, 122.4, 118.4, 117.3, 110.0, 61.2, 59.8. ES/MS m/z 583 [M+Na]⁺ HRMS (ES⁺): Calcd. for C₃₀H₂₆ClN₃NaO₆ 582.9865; found 582.9861.

Biological tests

Drugs. Bodipy-cyclopamine (BC) was from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada). SAG was synthesized as described previously.³⁸ Shh was from Dr D. Baker (Biogen Idec, Boston, USA). SAG was dissolved in ethanol, BC in methanol and other compounds in DMSO at a concentration of 10 mM. [³H]-thymidine was from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France).

Cell Culture and Transfection. Zeocin, Geneticin, Penicillin-Streptomycin and all cell culture media or products were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) except when stated. HEK293 (ATCC (Manassas, USA), CRL-1593) and C3H10T1/2 (ATCC, CCL-226) were

cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal calf serum as described.¹⁷ The Shh-light2 cells (from Pr P.A. Beachy, Stanford, USA) and HEK-hSmo cells stably expressing human Smo³⁵ were cultured in the same medium supplemented with 0.4 mg/ml Geneticin and 0.15 mg/ml Zeocin or 0.5 mg/ml Geneticin, respectively. Cells were distributed into 12-well plates containing glass coverslips coated with 0.05 mg/ml poly-D-lysine (BD Bioscience, Le Pont de Claix, France) for BC binding.

Gli-dependent luciferase reporter assay. Shh-light2 cells were incubated for 40 h with Shh (5 nM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as previously described.¹⁷

Alkaline phosphatase assay. C3H10T1/2 cells were incubated for 6 days in the presence of SAG (0.1 μM) and the studied compounds. The cell-based bioassay was performed as described.³⁹

Primary cerebellar cultures. Isolation of cerebellar granule cell precursors (GCPs) and quantitation of [³H]-thymidine incorporation were performed as described³⁴.

BC binding. HEK-hSmo cells were incubated with 5 nM of BC and increased concentrations of the studied compounds for 2 h at 37°C. The protocol was performed as described³⁵. Cells were analysed with a DMRXA2 microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) equipped with a Photometric Cool-Snap camera (Roper Scientific, Ottobrunn, Germany). Cell culture images for counting were taken with a 20X objective in black and white for the analysis.

Data analysis. Means and SEM were calculated using Excel 2003®. Curve fitting and IC₅₀ determinations were performed using Prism 4.03® (GraphPad software, San Diego, USA). The BC fluorescence was analyzed with the Simple-PCI software (Hamamatsu Corporation, Massy, France).

Acknowledgment. This work was supported by a grant from La Ligue Contre le Cancer (Comite des Yvelines to M. R.) and the Neuropole de Recherche Francilien (doctoral fellowship

248890 to H. R.). We thank Dr. S. O'Regan for critical reading of the manuscript.

Supporting Information available. Synthetic procedures and characterization of nitroanilines and aroyl anilines. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and notes

1. Dessaud, E.; McMahon, A. P.; Briscoe, J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: A sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network *Development* **2008**, *135*, 2489–2503.
2. Traiffort, E.; Angot, E.; Ruat, M. Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain *J. Neurochem* **2010**, *113*, 576–590.
3. Philipp, M. and M. G. Caron. Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor? *Curr Biol* **2009**, *19*(3), R125–127.
4. Barakat, M.T.; Humke E. W.; Scott, M. P. Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer *Trends Mol Med* **2010**, *16*, 337–348.
5. Tian, H.; Callahan, C. A.; Dupree, K. J.; Darbonne, W. C.; Ahn, C. P.; Scales, S. J.; De Sauvage, F. J.; Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2009**, *106*, 4254–4259.
6. Traiffort, E.; Dubourg, C.; Faure, H.; Rognan, D.; Odent, S.; Durou, M. R.; David, V.; Ruat M. Functional characterization of Sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 42889–42897.
7. Nieuwenhuis, E.; Hui, C-c. Program in Developmental Biology, The Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin. Genet.* **2004**, *67*, 193–208.
8. Teglund, S.; Toftgård, R.; Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1805*, 181–208.
9. Berman, D. M.; Karhadkar, S. S.; Hallahan, A. R.; Pritchard, J. I.; Eberhart, C. G.; Watkins, D. N.; Chen, J. K.; Cooper, M. K.; Taipale, J.; Olson, J. M.; Beachy P. A. Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade *Science* **2002**, *297*, 1159.
10. Peukert, S, K. Miller-Moslin J. Small-Molecule Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway as Cancer Therapeutics *ChemMedChem* **2010**, *5*, 500–512.
11. Miller-Moslin, K.; Peukert, S.; Jain, R. K.; McEwan, M. A.; Karki, R.; Llamas, L.; Yusuff, N.; He, F.; Li, Y.; Sun, Y.; Dai, M.; Perez, L.; Michael, W.; Sheng, T.; Lei, H.; Zhang, R.; Williams, J.; Bourret, A.; Ramamurthy, A.; Yuan, J.; Guo, R.; Matsumoto, M.; Vattay, A.; Maniara, W.; Amaral, A.; Dorsch, M.; Kelleher III, J. F. 1-Amino-4-benzylphthalazines as orally bioavailable smoothened antagonists with antitumor activity *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3954–3968.
12. Pan, S.; Wu, X.; Jiang, J.; Gao, W.; Wan, Y.; Cheng, D.; Han, D.; Liu, J.; Englund, N. P.; Wang, Y.; Peukert, S.; Miller-Moslin, K.; Yuan, J.; Guo, R.; Matsumoto, M.; Vattay, A.; Jiang, Y.; Tsao, J.; Sun, F.; Pferdekammer, A. C.; Dodd, S.; Tuntland, T.; Maniara, W.; Kelleher III, J. F.; Yao, Y.-M.; Warmuth, M.; Williams, J.; Dorsch, M. Discovery of NVP-LDE225, a potent and selective smoothened antagonist *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 130–134
13. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=GDC-0449>.
14. Rudin, C.M.; Hann, C. L.; Laterra, J.; Yauch, R. L.; Callahan, C. A.; Fu, L.; Holcomb, T.; Stinson, J.; Gould, S. E.; Coleman, B.; LoRusso, P. M.; Von Hoff, D. D.; de Sauvage, F. J.; Low, J. A. Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* **2009** *361*, 1173–1178.
15. Von Hoff, D. D.; LoRusso, P. M.; Rudin, C. M.; Reddy, J. C.; Yauch, R. L.; Tibes, R.; Weiss, G. J.; Borad, M. J.; Hann, C. L.; Brahmer, J. R.; Mackey, H. M.; Lum, B. L.; Darbonne, W. C.; Marsters Jr. J. C.; de Sauvage, F. J.; Low, J. A. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 1164–1172.
16. Yauch, R. L.; Dijkgraaf, G. J. P.; Alicke, B.; Januário, T.; Ahn, C. P.; Holcomb, T.; Pujara, K.; Stinson, J.; Callahan, C. A.; Tang, T.; Bazan, J. F.; Kan, Z.; Seshagiri, S.; Hann, C. L.; Gould, S. E.; Low, J. A.; Rudin, C. M.; de Sauvage, F. J. Smoothened mutation confers resistance to a hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma *Science* **2009**, *326*, 572–574.
17. Manetti, F.; Faure, H.; Roudaut, H.; Gorojankina, T.; Traiffort, E.; Schoenfelder, A.; Mann, A.; Solinas, A.; Taddei, M. Ruat, M. Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothened antagonists *Mol. Pharmacol.* **2010**, *78*, 658–665.
18. Hallur, G.; Jimeno, A.; Dalrymple, S.; Zhu, T.; Jung, M. K.; Hidalgo, M.; Isaacs, J. T.; Sukumar, S.; Hamel, E.; Khan, S.R. Benzoylphenylurea Sulfur Analogues with Potent Antitumor Activity *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2357–2360.
19. Okada, H.; Koyanagi, T.; Yamada, N.; Haga, T. Synthesis and antitumor activities of novel benzoylphenylurea derivatives *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2308–2315.
20. Klabunde, T.; Wendt, K. U.; Kadereit, D.; Brachvogel, V.; Burger, H.-J.; Herling, A.W.; Oikonomakos, N.G.; Kosmopoulou, M. N.; Schmoll, D.; Sarubbi, E.; Von Roedern, E.; Schönafinger, K.; Defossa, E. Acyl ureas as human liver glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6178–6193.

21. Furuta, T.; Sakai, T.; Senga, T.; Osawa, T.; Kubo, K.; Shimizu, T.; Suzuki, R.; Yoshino, T.; Endo, M.; Miwa, A. Identification of potent and selective inhibitors of PDGF receptor autophosphorylation *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2186-2192
22. Haynes, N.-E.; Corbett, W. L.; Bizzarro, F. T.; Guertin, K. R.; Hilliard, D. W.; Holland, G. W.; Kester, R. F.; Mahaney, P. E.; Qi, L.; Spence, C. L.; Tengi, J.; Dvorozniak, M. T.; Railkar, A.; Matschinsky, F. M.; Grippo, J. F.; Grimsby, J.; Sarabu, R. Discovery, structure-activity relationships, pharmacokinetics, and efficacy of glucokinase activator (2R)-3-cyclopentyl-2-(4-methanesulfonylphenyl)-N-thiazol-2-yl-propionamide (RO0281675) *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3618-3625.
23. M. C. Daga, M. Taddei, G. Varchi Rapid microwave-assisted deprotection of N-Cbz and N-Bn derivatives *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5191-5194.
24. F. D. Bellamy, K. Ou Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 839-842
25. Rasmussen, C. R.; Villani, Jr. F. J.; Weaner, L. E.; Reynolds, B. E.; Hood, A. R.; Hecker, L. R.; Nortey, S. O.; Hanslin, A.; Costanzo, M. J.; Powell, E. T.; Molinari A. J. Improved Procedures for the Preparation of Cycloalkyl-, Arylalkyl-, and Arylthioureas *Synthesis* **1988**, 456-459.
26. Narasimhamurthy, N.; Samuelson A. G. Thiocarbonyl to carbonyl group transformation using CuCl and NaOH *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3911-3912
27. Yang, G.; Chen, Z.; Zhang, H. Clean synthesis of an array of N-benzoyl-N'-aryl ureas using polymer-supported reagents *Green Chem.* **2003**, *5*, 441-442
28. Taipale, J.; Chen, J. K.; Cooper, M. K.; Wang, B.; Mann, R. K.; Milenkovic, L.; Scott, M. P.; Beachy, P. A. Effects of oncogenic mutations in Smoothened and Patched can be reversed by cyclopamine *Nature* **2000**, *406*, 1005-1009.
29. Masdeu, C.; Faure, H.; Coulombe, J.; Schoenfelder, A.; Mann, A.; Brabet, I.; Pin, J.-P.; Traiffort, E.; Ruat, M. Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothened to G₁₅ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *349* 471-479
30. Hyman, J. M.; Firestone, A. J.; Heine, V.M.; Zhao, Y.; Ocasio, C.A.; Han, K.; Sun, M.; Rack, P. G.; Sinha, S.; Wu, J. J.; Solow-Cordero, D. E.; Jiang, J.; Rowitch, D. H.; Chen, J. K. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 14132-14137.
31. Chen, J. K.; Taipale, J.; Young, K. E.; Maiti, T.; Beachy, P. A. Small molecule modulation of smoothened activity *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14071-14076.
32. Goodrich, L. V.; Milenkovic, L.; Higgins, K. M.; Scott, M. P. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants *Science* **1997**, *277*, 1109-1113.
33. Romer, J.T.; Kimura, H.; Magdaleno, S.; Sasai, K.; Fuller, C.; Baines, H.; Connelly, M.; Stewart, C. F.; Gould, S.; Rubin, L. L.; Curran, T. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1+/-p53-/- mice *Cancer Cell* **2004**, *6*, 229-240.
34. Charytoniuk, D.; Porcel, B.; Rodriguez Gomez, J.; Faure, H.; Ruat, M.; Traiffort, E. Sonic Hedgehog signalling in the developing and adult brain. *J Physiol Paris* **2002**, *96*, 9-16.
35. Roudaut, H.; Traiffort, E.; Gorojankina, T.; Vincent, L.; Faure, H.; Schoenfelder, A.; Mann, A.; Manetti, F.; Solinas, A.; Taddei, M.; Ruat, M. *Mol Pharmacol* **2011**, *79*, 453-460.
36. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, and Beachy PA Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2743-2748.
37. Rominger, C. M.; Bee, W.-L. T.; Copeland, R. A.; Davenport, E. A.; Gilmartin, A.; Gontarek, R.; Hornberger, K. R.; Kallal, L. A.; Lai, Z.; Lawrie, K.; Lu, Q.; McMillan, L.; Truong, M.; Tummino, P. J.; Turunen, B.; Will, M.; Zuercher, W. J.; Rominger, D. H. Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothened receptor *J. Pharm. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 995-1005
38. Martinez, M. C.; Larbret, F.; Zobairi, F.; Coulombe, J.; Debili, N.; Vainchenker, W.; Ruat, M.; Freyssinet, J.-M. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens *Blood* **2006**, *108*, 3012-3020.
39. Pascual, O.; Traiffort, E.; P. Baker, D.; Galdes, A.; Ruat, M.; Champagnat, J. Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius *Eur. J. Neurosc.* **2005**, *22*, 389-396.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis le développement d'un modèle pharmacophorique des antagonistes du récepteur Smo, un outil remarquable pour l'identification de nouvelles familles de petites molécules de structures originales et ayant pour cible ce récepteur. Plusieurs composés de hautes affinités ont été identifiés et caractérisés, ce qui offre de nouvelles perspectives pour l'étude pharmacologique de la voie Hh et en particulier l'analyse fine de la régulation du récepteur Smo. La discussion de ces résultats s'articulera autour de 3 axes principaux : 1) L'apport du modèle pharmacophorique et de l'approche par criblage virtuel de banques de molécules pour l'identification de ligands originaux de Smo ; 2) L'originalité structurale de la famille des composés MRT; 3) L'intérêt thérapeutique potentiel et l'apport du développement de nouvelles molécules antagonistes de Smo, comme outils pharmacologiques utiles à la compréhension des mécanismes de régulation de la voie Hh, en particulier au niveau du cil primaire.

I. Modèle pharmacophorique et criblage virtuel : une approche novatrice pour la recherche d'antagonistes de Smo

Des études cristallographiques et de modélisation moléculaire combinées à de la mutagenèse dirigée ont montré que la région comprenant les 7 domaines TM des RCPG est souvent un site de liaison des petites molécules agonistes, antagonistes ou des modulateurs allostériques de ces récepteurs ; pour revues, (*Congreve and Marshall, 2010; Rosenbaum et al., 2009*). C'est le cas pour Smo au niveau duquel la molécule agoniste SAG ou le composé agoniste inverse, cyclopamine, interagissent au niveau de l'heptahélice TM (*Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002b*). Cependant, à l'heure actuelle et depuis la cristallisation du récepteur à la rhodopsine (*Palczewski et al., 2000*), seules les cristallisations de 5 autres membres de la famille des RCPG (les récepteurs adrénergiques $\beta 1$ et $\beta 2$, le récepteur adénosine A_{2a} et plus récemment le CXCR4 et le récepteur dopaminergique de type 3) ont pu être réalisées ; pour revue, (*Rosenbaum et al., 2009*). De plus, contrairement à ce que l'on observe pour les ligands d'autres familles de protéines, peu de nouveaux ligands des récepteurs à 7 domaines TM dérivent de la modélisation par homologie du site putatif de fixation des ligands. Dans le cas précis du récepteur Smo, bien que la structure

tridimensionnelle du récepteur ne soit pas encore connue, de récents travaux ont permis l'expression hétérologue de la conformation native du récepteur Smo humain dans des cellules de levures. Cette étude va considérablement faciliter la cristallisation du récepteur. Cependant, à l'heure actuelle, c'est par HTS de larges banques de molécules que de petites molécules régulatrices sont identifiées (*Nehme et al., 2010*).

1. Le criblage à haut débit, avantages et inconvénients

Le HTS est une technique largement employée par l'industrie pharmaceutique permettant d'isoler de petites molécules potentiellement actives pour réguler un RCPG. Cependant, cette technique présente un certain nombre de limites. Elle consiste à tester à l'aide d'un test cellulaire relativement simple, l'efficacité de composés issus de banques de molécules. Dans le cas du récepteur Smo, le test basé sur la mesure de l'activité du rapporteur Gli-luciférase est le plus souvent utilisé. Cette approche est onéreuse puisqu'elle requiert un matériel automatisé et n'est donc pas à la portée de tous les laboratoires académiques (**Figure 18**). De plus, même si l'utilisation du gène rapporteur permet de sélectionner des composés ayant vraisemblablement un effet spécifique sur le mécanisme cellulaire en jeu ou la voie de signalisation testée, il est nécessaire de confirmer les résultats de ce premier criblage à l'aide d'un second test afin d'éliminer un certain nombre de faux-positifs ; pour revue, (*Thorne et al., 2010*).

Alternativement, il est possible d'employer des tests multiparamétriques basés sur des analyses d'images (à l'aide de marqueurs immunofluorescents), mais ces criblages sont plus coûteux encore et consomment beaucoup de temps. Il est aussi envisageable de cribler les molécules à l'échelle d'un organisme entier comme l'ont fait Tang et collaborateurs pour l'identification des antagonistes de Smo SANT-74 et SANT-75 sur l'embryon de poisson-zèbre. Le principal inconvénient de cette méthode est de nécessiter des quantités de composés très importantes (*Yang et al., 2009*); pour revue, (*Zhu et al., 2010*).

2. Modèle pharmacophorique de Smo et criblage virtuel

L'alternative au HTS est l'utilisation de modèles pharmacophoriques suivie du criblage virtuel de banques de molécules ; pour revues, (*Chang et al., 2006; Congreve and*

Marshall, 2010; McInnes, 2007). La notion de pharmacophore est apparue dans les années 1900 grâce à P. Ehrlich qui faisait référence à « une structure moléculaire qui porte les principales caractéristiques responsables de l'activité biologique d'un médicament ». La découverte progressive de la structure tridimensionnelle des molécules a permis d'inclure dans ce concept l'arrangement spatial des différents éléments constituant le pharmacophore. Les modèles pharmacophoriques prennent notamment en compte les groupements donneurs/accepteurs de liaisons hydrogènes, les régions hydrophobes, les charges positives/négatives. Le modèle pharmacophorique peut dériver soit du site de liaison du récepteur (méthode directe) lorsque celui-ci est connu ou a été modélisé en 3 dimensions, soit d'un ensemble de ligands actifs (méthode indirecte). Le modèle pharmacophorique généré est ensuite utilisé pour cribler virtuellement de larges banques de molécules nécessitant le développement d'algorithmes sophistiqués ou bien pour mettre en place une approche FBDD (FBDD pour Fragment-based drug discovery) qui crible spécifiquement de très petites molécules ou « fragments » efficaces qui seront ensuite allongées ou rattachées les unes aux autres pour augmenter leur efficacité sur la cible (*de Kloe et al., 2009*). L'un des avantages majeurs de l'approche associant le modèle pharmacophorique et le criblage virtuel comparé à l'HTS classique est d'éliminer rapidement, les molécules ne présentant pas les caractéristiques identifiées comme essentielles pour leurs liaisons au récepteur cible. L'analyse computationnelle élaborée permet un filtrage extensif des banques de composés permettant d'aboutir rapidement et à moindre coût à une sélection précise de molécules potentiellement intéressantes c'est-à-dire présentant les meilleures affinités et possédant les motifs structuraux répondant le mieux aux contraintes fonctionnelles et spatiales imposées par le modèle (**Figure 18** ; pour revue, (*McInnes, 2007*)). Jusqu'à présent, dans le cas des RCPG, le criblage virtuel s'avérait être une méthode délicate en raison du peu d'informations concernant la structure tridimensionnelle des récepteurs et de leur importante flexibilité. Cependant, la connaissance des structures des RCPG cristallisés a permis de créer des modèles par homologie pour des récepteurs de structures voisines. Ces derniers modèles ont été utilisés notamment pour cribler virtuellement des banques de molécules antagonistes des récepteurs mGluR5 (récepteur métabotrope glutamatergique de sous-type 5, (*Radestock et al., 2008*)) ou des récepteurs TRH1-2 (TRH pour thyrotropin-releasing hormone receptor, (*Engel et al., 2008*)).

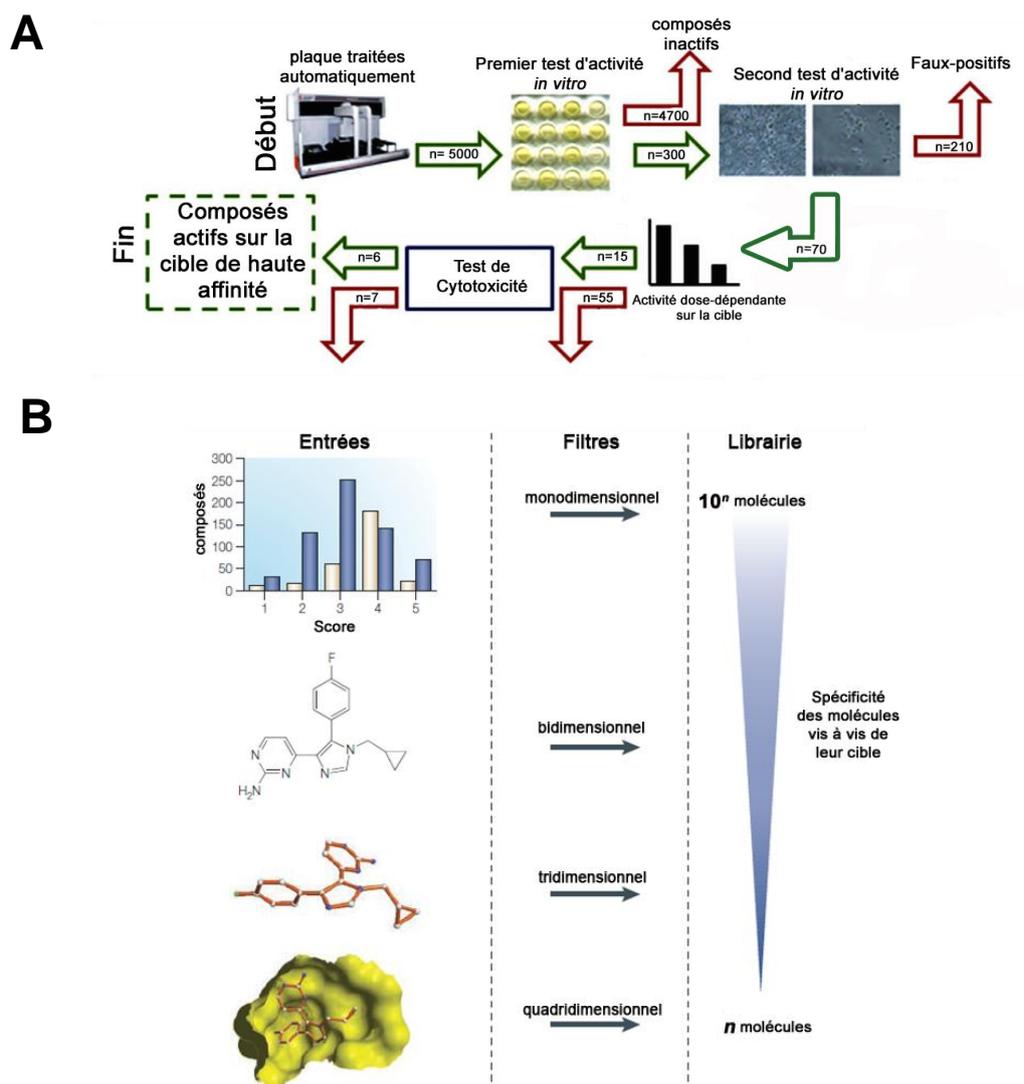


Figure 18 : Schémas des deux principales approches de criblages de molécules.

(A) Principe du criblage à haut débit. Les flèches vertes indiquent les composés qui peuvent progresser à l'étape suivante du criblage, tandis que les flèches rouges représentent les molécules exclues des tests suivants. Les chiffres indiqués sont arbitraires. (B) Principe du criblage virtuel. Il peut être subdivisé en 4 étapes. Elles se distinguent par leur niveau de complexité et sont considérées comme des entrées. Le premier filtre dit « monodimensionnel » est constitué de critères tels que le poids moléculaire, la lipophilicité ou l'instabilité métabolique potentielle. Le second filtre dit « bidimensionnel » consiste en l'analyse topologique des composés en comparaison avec la structure de ligands connus de la cible. Le troisième filtre est l'analyse de l'ajustement effectif de la molécule au modèle pharmacophorique. Enfin, le ligand sélectionné est virtuellement positionné au niveau du site de liaison de la cible. Les paramètres de flexibilité/rigidité des interactions établies donnent un score qui reflète le niveau de complémentarité entre le site de liaison putatif et la molécule. Le dégradé bleu de la librairie représente le degré de spécificité des composés. Adapté de (Bleicher *et al.*, 2003; Lipinski and Bushman, 2010).

Dans le cas du récepteur Smo, l'approche par criblage virtuel basé sur le développement d'un modèle pharmacophorique s'avère tout à fait appropriée et nous l'avons validée. Le modèle que nous avons développé au cours de ce projet de thèse a été obtenu par la méthode dite indirecte en utilisant des antagonistes de Smo de structures variées et de haute affinité pour le récepteur Smo. Il a permis l'identification de 3 accepteurs de liaisons hydrogènes et de 3 régions hydrophobes requis pour l'interaction des molécules au récepteur Smo. Il est donc désormais possible d'envisager l'utilisation d'un modèle pharmacophorique comparable pour l'identification de molécules agonistes du récepteur Smo.

Un autre avantage majeur de cette approche est qu'elle permet de tenir compte de la flexibilité de la structure des récepteurs ; pour revue, (*McInnes, 2007*). Si la structure tridimensionnelle de Smo n'est pas connue, des études basées sur la technique du FRET ont permis de proposer que le récepteur Smo possède une structure particulièrement flexible. D'abord, le rapprochement des extrémités N-terminales de deux molécules Smo a été montré comme responsable de son activité constitutive en induisant sa dimérisation. De plus, lorsque le récepteur est dans sa conformation inactive, son domaine C-terminal est proche de la boucle intracytoplasmique L3. La levée d'inhibition que Ptc exerce sur Smo provoque un changement conformationnel de Smo conduisant à l'éloignement du domaine C-terminal et de la boucle L3 et au rapprochement des extrémités C-terminales de chaque molécule du dimère (*Zhao et al., 2007*). L'analyse précise des différents états d'activation du récepteur Smo par mesure de FRET est donc une approche à envisager et l'utilisation des composés MRT pour ces études serait tout à fait adaptée grâce à leur haute affinité pour les formes endogènes des récepteurs Smo humains et murins.

II. Découverte de nouvelles familles de composés

1. Structures originales des composés MRT

Le développement d'un modèle pharmacophorique de Smo afin de cribler virtuellement une banque de plus de 400 000 composés nous a tout d'abord, permis d'isoler une acylthiourée, MRT-10. La transformation du groupement thiourée du composé en un groupement urée a conduit au dérivé acylurée, MRT-14. Cette modification est à l'origine d'une augmentation de l'affinité du composé pour le récepteur qui le rend aussi efficace que l'antagoniste de référence, la cyclopatamine. L'optimisation de la structure des composés MRT-

10 et MRT-14 a abouti à la synthèse du composé acylguanidine MRT-83, qui est aussi puissant que l'antagoniste GDC-0449. En raison des affinités obtenues pour MRT-10 et MRT-14 sur le récepteur Smo, nous avons mené des études de relations structure-activité afin d'identifier de nouvelles molécules acylthiourée et acylurée inhibant l'activité du récepteur Smo à haute affinité. Ces molécules sont respectivement les composés MRT-60 et MRT-71 décrits dans notre prochain article. Des acylurées et acylthiourées ont précédemment été décrites dans la littérature et certaines molécules ont été utilisées à des fins thérapeutiques notamment dans le traitement de tumeurs solides (*Hallur et al., 2006 ; Okada et al., 1991*). Les composés acylurées ont également été identifiés comme de puissants inhibiteurs de l'enzyme hépatique glycogène phosphorylase humaine (*Klabunde et al., 2005*), de l'autophosphorylation du récepteur au PDGF (*Furuta et al., 2006*) et des activateurs de l'enzyme glucokinase (*Haynes et al., 2010*). Durant l'écriture de ce manuscrit de thèse, une série de dérivés ayant une fonction urée, issus d'un HTS, viennent d'être décrits comme de nouveaux antagonistes de Smo. Les composés présentent des affinités de l'ordre du nanomolaire pour inhiber l'activité de la voie Shh et une faible clairance chez le chien et le rat suggérant qu'ils pourraient aussi être de nouveaux outils adaptés à l'étude de la signalisation Hh (*Ontoria et al., 2011*).

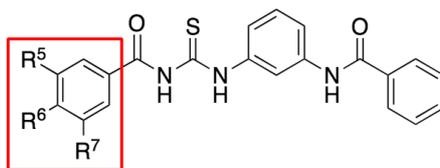
L'utilisation en médecine de composés à fonction guanidine est fréquente pour leurs propriétés inhibitrices de l'échangeur Na^+/H^+ ou pour leur effet anticoagulant. Des molécules à fonction guanidine ont été préalablement caractérisées comme une classe de ligands très actifs sur le RCPG liant le neuropeptide Y (*Schneider et al., 2007*) ainsi que sur les récepteurs histaminergiques ; pour revue, (*Saczewski and Balewski, 2009*). Si les premiers agonistes du récepteur H2 de l'histamine possédant une fonction guanidine présentaient une mauvaise pénétration dans le SNC et une très faible biodisponibilité, la synthèse d'une nouvelle série de bioesters dérivés des guanidines a récemment conduit à la découverte de composés présentant une amélioration de leurs propriétés pharmacocinétiques sur le récepteur H2. Certains de ces composés sont également de puissants antagonistes ou agonistes partiels des récepteurs histaminergiques H1 et H3 humains. Un effet agoniste partiel sur le récepteur H4 humain a également été rapporté pour certaines molécules possédant un groupement guanidine (*Ghorai et al., 2008*).

2. Les composés MRT au sein des autres antagonistes de Smo

2.1. Au niveau de leur structure et de leurs sites de liaison sur Smo

Si les 3 séries chimiques que nous venons de caractériser comme antagonistes de Smo demeurent originales et ont pour cette raison, été brevetées par le CNRS, il est cependant intéressant de noter une ressemblance structurale avec l'un des premiers antagonistes de synthèse développé pour Smo, le composé SANT-2. La partie gauche de nos séries de molécules est en effet semblable à celle de SANT-2. Le groupe triméthoxy phényle est un élément majeur du pharmacophore puisque l'atome d'oxygène d'un des groupes méthoxy se superpose à l'un des 3 groupes accepteurs d'hydrogène du modèle et le phényle correspond à l'une des 3 régions hydrophobes. Grâce à des études de relations structure-activité, nous avons montré que si la conversion des groupements méthoxy en groupements éthoxy (comme sur le SANT-2) sur le phényle modifie peu les propriétés biologiques des molécules (composés 20, 21, 24 ; **Tableau 4**), la perte d'un groupement en position méta est, quant à elle, dramatique pour l'activité du composé (composés 19, 23, 26 ; **Tableau 4**). Cependant, les données actuelles ne nous permettent pas d'apporter d'autres conclusions sur l'identité précise des sites de liaison de SANT-2 et de nos molécules sur Smo.

Un certain nombre de travaux ont permis de suggérer l'existence de plusieurs sites de liaison des ligands sur Smo. Ainsi, l'utilisation des composés radiomarqués [³H]-SAG-1.3 et [³H]cyclophamide a montré que le composé SANT-1 ne déplace pas complètement la liaison du [³H]-SAG-1.3 contrairement à SANT-2, alors qu'ils sont tous deux capables d'inhiber complètement une réponse cellulaire induite par l'agoniste de Smo, SAG-1.3 (*Rominger et al., 2009*). De plus, il avait été précédemment montré que les composés SANT1-4 sont tous capables de bloquer la liaison du ligand BODIPY-cyclophamide sur le récepteur Smo murin, mais SANT-1 et SANT-3 n'inhibent pas complètement cette liaison suggérant que les 4 composés présentent des mécanismes d'action ou des sites de liaison différents sur le récepteur Smo (*Chen et al., 2002b*). Il serait particulièrement intéressant de caractériser de manière plus approfondie le site de fixation de MRT-83 sur le récepteur Smo humain et murin par exemple en utilisant les radioligands disponibles ou en développant un radioligand dérivé des séries chimiques que nous venons de caractériser.



- 19:** R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = H; **23:** 2-OMe, R⁵ = R⁷ = H, R⁶ = OMe.
20: R⁵ = R⁷ = OMe, R⁶ = OEt; **24:** R⁵ = R⁶ = R⁷ = OEt;
21: R⁵ = R⁶ = OEt, R⁷ = OMe; **25:** R⁵-R⁶ = -OCH₂CH₂O-, R⁷ = H;
22: R⁷ = OMe, R⁵, R⁶ = -OCH₂O-; **26:** R⁵ = R⁶ = OMe, R⁷ = H

Composé	Shh-light2, (Shh 5 nM)		C3H10T1/2, (SAG 0,1 µM)	
	% d'inhibition ¹	% d'inhibition ²	CI ₅₀ , µM	
MRT-10	96 ± 1	96 ± 4	0.9 ± 0.2	
19	84 ± 8	82 ± 1	1.9 ± 0.2	
20	99 ± 2	94 ± 5	0.6 ± 0.1	
21	100 ± 1	82 ± 8	0.8 ± 0.2	
22	92 ± 2	85 ± 11	1.1 ± 0.6	
23	34 ± 4	60 ± 13	4.1 ± 0.3	
24	100 ± 2	96 ± 2	0.8 ± 0.1	
25	inactif	nd	nd	
26	71 ± 8	45 ± 8	nd	

Tableau 4 : Etude de relation structure-activité de dérivés de MRT-10.

Les composés ont été testés à ¹ 3 µM, ² 10 µM ; means ± SEM ; n ≥ 3 pour toutes les expériences ; nd : non déterminé. Le surlignage vert correspond aux modifications de la position des groupements méthyl sur le phényl dans la partie gauche de la molécule (encadré rouge). Le surlignage jaune correspond au remplacement de groupement méthoxy par des groupements éthoxy sur ce même phényl (encadré rouge). Le MRT-10 correspond à R⁵=R⁶=R⁷= OMe. D'après ((Heretsch *et al.*, 2010 ; Roudaut *et al.*, 2011).

2.2. Au niveau du mécanisme de régulation de Smo

Il est désormais bien établi que dans les cellules de vertébrés, la translocation du récepteur Smo au cil primaire n'est pas suffisante pour induire l'activation de la signalisation Hh mais constitue une étape du processus d'activation. Dans le modèle actuellement proposé (*Rohatgi et al., 2009*), Smo existerait sous 3 formes : une forme cytoplasmique inactive (Smo1) et des formes localisées dans le cil primaire alternativement inactives (Smo2) ou actives (Smo3 ; **Figure 19**). Ce modèle s'inspire des études ayant démontré que l'activation de la plupart des RCPG n'est pas une simple étape de conversion d'un état inactif à un état actif, mais plutôt un processus nécessitant plusieurs étapes intermédiaires ayant chacune des effets distincts sur les protéines en aval de la signalisation ; pour revue, (*Kenakin, 2003*). L'utilisation de molécules agonistes et antagonistes se révèle donc utile pour stabiliser les états intermédiaires des RCPG et ainsi disséquer le mécanisme d'action du récepteur. Les antagonistes de Smo, cyclopamine, SANT-1 et SANT-2 ont permis de démontrer l'existence des 3 états du récepteur. Des expériences d'immunofluorescence sur la lignée de cellules murines NIH3T3 exprimant le récepteur Smo de manière endogène ont montré que les antagonistes SANT-1 et SANT-2 bloquent la translocation du récepteur dans le cil induite par la présence du ligand Shh. En revanche, la cyclopamine n'inhibe pas cette translocation bien qu'elle bloque la signalisation Hh dans ces mêmes cellules. De manière encore plus surprenante, lorsque les cellules sont traitées avec la cyclopamine seule, le récepteur Smo se trouve transloqué dans le cil primaire. Ainsi, les inhibiteurs SANT-1, SANT-2 et MRT-83 semblent bloquer le récepteur dans son état Smo1 inactif dans le cytoplasme alors que la cyclopamine bloque le récepteur Smo dans son état Smo2 inactif dans le cil primaire (**Figure 19**).

Ce modèle a permis de suggérer l'existence de deux catégories d'antagonistes de Smo, les composés ayant une activité proche de la cyclopamine qui empêchent l'étape d'activation du récepteur et les composés ayant une activité proche des composés SANT-1/2 qui bloquent la translocation du récepteur au cil primaire et auxquels se rattache MRT-83. Une étude complémentaire indique que le mécanisme d'activation du récepteur Smo au cil primaire semble très complexe. En effet, l'utilisation d'outils pharmacologiques variés a montré que Smo peut adopter plusieurs conformations qui autorisent son adressage dans le cil primaire, mais seule une partie de ces conformations sont capables d'activer la cascade de signalisation Hh. L'activation de la sous-unité Gas ou de la PKA engendre l'accumulation du récepteur à la

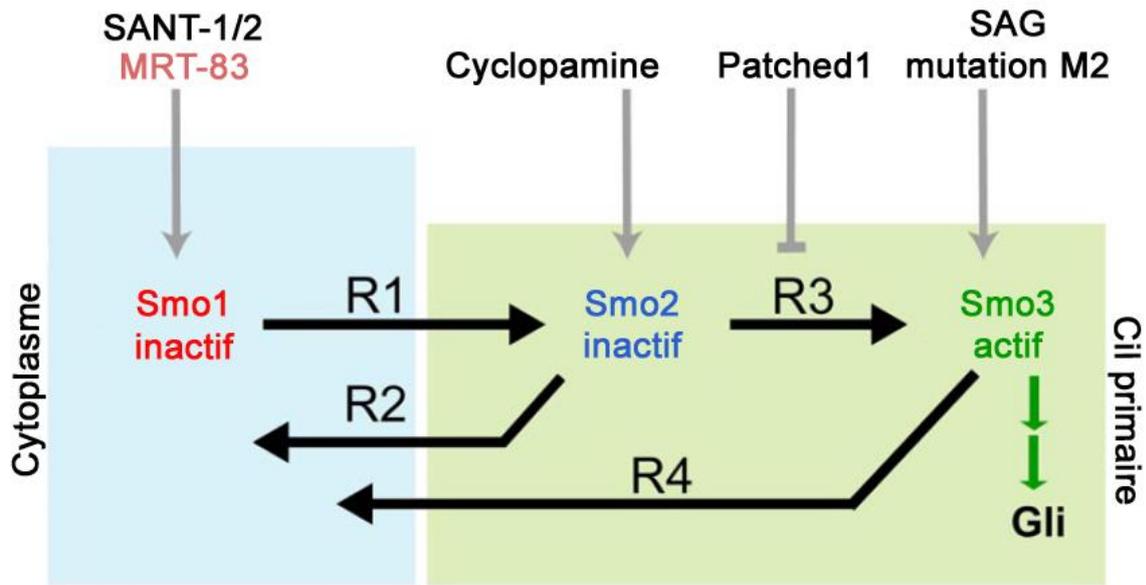


Figure 19 : Modèle d'activation du récepteur Smoothened chez les vertébrés.

L'activation complète du récepteur requiert deux étapes. Tout d'abord, Smo1 doit être transloqué au cil primaire (Smo2) puis être activé (Smo3). Ce dernier état est celui permettant au récepteur d'activer la signalisation en aval conduisant à l'activation des facteurs de transcription Gli. Les flèches noires représentent des étapes individuelles. Le transport au cil primaire du récepteur (Smo1→Smo2) est contrôlé par les étapes d'entrée et de sortie du récepteur dans l'organelle, désignées ici par R1 et R2; l'étape d'activation (Smo2→Smo3) est contrôlée par R3 dont la nature biochimique n'est pas encore connue aujourd'hui, mais qui pourrait correspondre à une modification post-traductionnelle, une interaction protéique ou un changement conformationnel du récepteur (*Zhao et al., 2007*); la sortie de Smo3 du cil primaire est contrôlée par R4. Les sites d'actions proposés pour les différents régulateurs de la signalisation Hedgehog sont indiqués par les flèches grises. D'après (*Rohatgi et al., 2009*).

base du cil. Cette localisation peut être bloquée par le composé SANT-1, mais pas par la cyclopamine suggérant que SANT-1 agirait sur la forme cytoplasmique du récepteur pour le séquestrer ou empêcher son interaction avec une β -arrestine nécessaire à l'adressage du récepteur dans l'axonème ciliaire (*Wilson et al., 2009a*). L'application de MRT-83 sur des cellules exprimant de manière endogène les récepteurs Smo murins (lignée C3H10T1/2) ou humains (lignées NT2) a permis de montrer la disparition complète de l'expression de la protéine dans le cil primaire suggérant une fois encore que MRT-83 agirait sur la même forme de Smo que SANT-1. L'utilisation des composés MRT et en particulier de MRT-83, semble donc être particulièrement appropriée à l'étude fine des mécanismes d'adressage et d'activation du récepteur Smo dans les cellules.

III. Intérêt et apport fonctionnel des nouveaux outils pharmacologiques

Bien que les résultats obtenus sur l'utilisation *in vivo* du MRT-83 restent préliminaires, il constitue un outil intéressant pour approfondir les connaissances actuelles sur les mécanismes de tumorigenèse associés à une dérégulation de la voie Hh. Par ailleurs, les antagonistes de Smo utilisés dans les phases initiales des essais cliniques ayant mis en évidence des limitations à leur utilisation, le développement de nouvelles familles chimiques de composés reste nécessaire à l'heure actuelle.

1. Rôle du cil primaire dans la signalisation Hh et les tumeurs Hh-dépendantes

MRT-83 va constituer un outil de choix pour améliorer notre compréhension de la régulation de Smo au niveau du cil primaire. Cette structure étant à la fois impliquée dans l'activation physiologique de la voie Hh et l'émergence de pathologies Hh-dépendantes, il est d'un intérêt majeur d'analyser la régulation du récepteur Smo au sein de cette organelle. A l'heure actuelle, un nombre important de questions persistent : existe-t-il une voie de signalisation Hh indépendante du cil chez les mammifères ? Comment se fait le transport de Smo au cil ? Par quel mécanisme Smo active-t-il les facteurs de transcription Gli dans cette structure ?

Dans des conditions physiologiques, il semble que les signaux Hh puissent se transmettre de façon dépendante ou indépendante du cil chez les mammifères. Ainsi, Sufu

contrôlerait le niveau d'expression des formes répressives des facteurs de transcription Gli de manière indépendante du cil primaire. A l'inverse, la transactivation des facteurs de transcription Gli en leurs formes activatrices nécessite la translocation de Smo dans le cil primaire (*Chen et al., 2009*). Par ailleurs, l'ablation du cil primaire dans les cellules souches GFAP⁺ du cerveau adulte induit une réduction de la prolifération cellulaire dans la ZSG de l'hippocampe adulte (*Han et al., 2008*), mais pas dans la ZSV (*Amador-Arjona et al., 2011*). Ce dernier résultat suggère que dans la ZSV, contrairement à la ZSG, la signalisation Shh exerce ses effets sur la niche neurogènique de manière indépendante du cil primaire.

Néanmoins, la compartimentation de la signalisation Hh au cil primaire demeure fondamentale et permet d'assurer la spécificité du signal. Le cil primaire pourrait constituer un compartiment enrichi en une molécule lipidique capable d'activer Smo ou dépourvu d'une molécule lipidique capable d'inhiber Smo, puisque l'organelle a été montrée être à l'origine de la compartimentation de certains lipides (*Emmer et al., 2010*). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour le mécanisme de relocalisation de Smo au cil. Ainsi après sa synthèse, Smo pourrait être envoyé dans le cil depuis les vésicules issues de l'appareil de Golgi (pour revue, *Pazour & Bloodgood, 2008*) ou bien après un adressage préalable à la membrane plasmique (*Milenkovic et al., 2009*). Par ailleurs, l'utilisation d'une construction Smo:GFP montre qu'avant d'être exprimé dans le cil, Smo est contenu dans les stocks intracytoplasmiques de la cellule (*Wang et al., 2009*). Récemment, l'étude des mécanismes de régulation d'entrée et de sortie des protéines membranaires dans le cil primaire a révélé qu'un réseau NHERF1-ERM-actine (NHERF pour Na⁺/H⁺ exchanger 3 regulatory factor et ERM pour Ezrin-Radixin-Moesin qui sont des protéines de la famille des protéines de liaison à l'actine), exprimé sous la membrane plasmique est responsable de l'exclusion des protéines membranaires du domaine de la membrane ciliaire. Ce réseau aurait une activité complémentaire à celle de la barrière de diffusion septin 2 récemment proposée pour expliquer la régulation de l'entrée des protéines dans le cil primaire (*Hu et al., 2010*). L'utilisation d'une construction GFP-hSmo-NHERF1, avec une étiquette GFP sur l'extrémité N-terminale du récepteur et un domaine de liaison NHERF1-ERM en C-terminal montre que ce signal de rétention exprimé sur le récepteur Smo empêche le passage de la protéine vers la membrane ciliaire et qu'il doit être clivé pour que le récepteur soit adressé au cil primaire (*Francis et al., 2011*). Cependant, la relocalisation du récepteur n'est pas régulée par un mécanisme unique. En effet, elle requiert également la machinerie IFT et en particulier IFT122 qui régule à la fois l'entrée et la sortie

des protéines Smo, Sufu et des facteurs de transcription Gli2 et 3 (*Qin et al., 2011*). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré le rôle de différentes petites GTPases dans la formation et la fonction du cil primaire ; pour revue, (*Li and Hu, 2011*). En particulier, le transport ciliaire fait intervenir la sous-famille des Rab GTPases. Ainsi, Rab23 régulerait les entrées et sorties de Smo dans l'organelle, participant ainsi au recyclage du récepteur (*Boehlke et al., 2010*).

Par ailleurs, la PKA initialement considérée comme un inhibiteur de la voie Hh, vient d'être plus récemment associée à des effets positifs sur la signalisation Hh. En effet, sa localisation qui vient d'être montrée à la base du cil primaire de manière Hh-dépendante, semble être requise pour des effets prolifératifs associés à la signalisation Hh (*Barzi et al., 2010*). De plus, *in vitro*, l'activation de la PKA induit l'accumulation du récepteur Smo dans le cil primaire (*Wilson et al., 2009*). Cependant, à l'heure actuelle, les données disponibles ne permettent pas de savoir s'il s'agit de la conformation active ou inactive du récepteur ; pour revue, (*Milenkovic and Scott, 2010*). Les composés MRT que nous venons de caractériser comme de puissants antagonistes du récepteur Smo capables de bloquer le récepteur dans sa conformation inactive pourraient, là encore, se révéler comme des outils efficaces pour ces études.

Des données particulièrement étonnantes ont récemment révélé la dualité des rôles du cil primaire sur le développement de deux types de tumeurs associées à la dérégulation de la signalisation Hh. En effet, si l'ablation génétique du cil primaire bloque la formation de MB lorsque la tumeur est liée à une mutation activatrice de Smo, elle favorise l'expansion des tumeurs dépendant d'une activation constitutive de Gli2 (*Han et al., 2009*). Ce rôle bivalent du cil primaire a également été décrit sur des BCC (*Wong et al., 2009*). MRT-83 inhibant la translocation de Smo au cil comme le font les composés SANT-1/2, semblerait être un outil tout à fait approprié dans le cas des tumeurs dépendant du cil primaire. Par ailleurs, la mutation M2 retrouvée sur des BCC (*Xie et al., 1998*), induit la translocation du récepteur au cil. *In vitro*, SANT-1, contrairement à la cyclopamine, est capable d'inhiber l'activité de la voie Hh médiée par la forme oncogénique de Smo, SmoM2 (*Chen et al., 2002b; Taipale et al., 2000*). Cette mutation pourrait expliquer certaines résistances au traitement par la cyclopamine de tumeurs Hh-dépendantes. MRT-83 présentant un mode d'action similaire à celui de SANT-1 et de surcroît, étant capable d'interagir avec le récepteur Smo humain, on

peut supposer que ce composé pourrait être efficace sur des tumeurs Hh-dépendantes telles que les BCC liés à la mutation SmoM2.

2. Mutations et résistances consécutives à un traitement par un antagoniste de Smo

La diversité des structures chimiques des molécules actuellement développées pour bloquer la signalisation Hh est primordiale si l'on considère les mutations de Smo apparues au cours des traitements par le GDC-0449 (*Rudin et al., 2009*) ou le LDE-225 (*Buonamici et al., 2010*). Les sites de fixation des ligands sur Smo étant vraisemblablement multiples, MRT-83 ou des molécules dérivées pourraient être une alternative intéressante à ces derniers composés.

Le patient atteint d'une forme métastatique de MB ayant développé une résistance au GDC-0449 correspond au premier cas d'apparition d'une résistance du récepteur Smo à un modulateur pharmacologique. Ce phénomène de résistance est aussi le premier à être décrit dans le cadre des RCPG ; pour revue, (*Metcalf and de Sauvage, 2011*). L'analyse d'échantillons tissulaires du MB de ce patient a démontré la présence d'une mutation faux-sens du gène Smo à l'origine d'une modification de l'acide aminé 473, un aspartate transformé en une histidine (D473H; **Figure 20**; (*Yauch et al., 2009*). L'analyse *in vitro* du mutant Smo-D473H indique que cette forme du récepteur est capable d'activer la signalisation Hh, qu'elle n'est pas oncogénique mais qu'elle n'est plus inhibable par le composé GDC-0449. L'aspartate en position 473 est donc un acide aminé essentiel pour la liaison de GDC-0449 au récepteur Smo (*Yauch et al., 2009*). L'activité inhibitrice de MRT-83 sur ce mutant serait particulièrement intéressante à déterminer. Par ailleurs, une étude de mutagenèse dirigée du récepteur Smo a également permis l'identification d'un autre site de mutation responsable d'une résistance à GDC-0449, il s'agit de la mutation E518K sur le récepteur humain (*Dijkgraaf et al., 2011*).

Plus récemment, le traitement d'allogreffes de MB issus de souris Ptc^{+/-}p53^{-/-} par l'antagoniste LDE-225 a également engendré l'apparition d'une résistance (*Buonamici et al., 2010*). Parmi les 135 lignées tumorales résistantes à LDE-225 générées, 7 présentent des mutations faux-sens liées à des substitutions sur 5 acides aminés différents (N223D, L225R, D388N, S391N et G457S), mais aucune ne correspond à la mutation D477 (l'équivalent de D473 sur le récepteur humain) responsable de la résistance au composé GDC-0449

(*Buonamici et al., 2010*); **Figure 20**) suggérant donc que les résistances sont associées à des mutations affectant de multiples sites de liaison sur Smo. Là encore, l'activité de la molécule MRT-83 sur ces mutants sera intéressante à analyser. L'utilisation combinée de molécules ayant des sites d'action différents sur le récepteur Smo apparaît ainsi être d'un intérêt majeur pour le traitement des tumeurs.

Parallèlement aux mutations faux-sens retrouvées sur le récepteur Smo, d'autres modifications sont en causes dans les phénomènes de résistance. Une augmentation du niveau d'expression de Gli2 a été retrouvée sur des échantillons de tumeurs résistantes aux drogues (*Buonamici et al., 2010; Yauch et al., 2009*); **Figure 20**) suggérant que l'utilisation combinée de molécules antagonistes du récepteur Smo et de composés inhibiteurs des facteurs de transcription Gli serait une piste thérapeutique pour le traitement de tumeurs Hh-dépendantes. Par ailleurs, dans le cas de la résistance au composé GDC-0449, une amplification de l'expression du gène cycline D1, préalablement identifié comme un élément clef de la pathogénicité des MB développés sur des modèles murins, a également été rapportée (*Dijkgraaf et al., 2011*); pour revue, (*Hatten and Roussel, 2011*); **Figure 20**). Enfin, l'expression des gènes Igf1R (pour « récepteur à l'Igf1 ») et PI3K est fortement augmentée dans des échantillons de tissus issus de tumeurs résistantes au traitement par le LDE-225. Cette observation suggère que l'augmentation du niveau d'expression de ces voies de signalisation normalement impliquées dans le développement cérébelleux, constitue une réponse compensatrice à l'inhibition de la signalisation Hh et contribue ainsi au développement de la résistance (*Buonamici et al., 2010*); (*Chamoun et al., 2001*) **Figure 20**). La voie PI3K semble donc être une autre cible intéressante pour le développement de petites molécules efficaces contre les tumeurs Hh-dépendantes; pour revue, (*Metcalfe and de Sauvage, 2011*).

3. Deuxième génération d'antagonistes de Smo capables d'interagir avec le récepteur mutant D473H

La récente mise en évidence des mécanismes de résistance que nous venons de décrire, nous suggère bien sûr de caractériser l'activité de MRT-83 sur ces formes mutées de Smo. Le développement d'un ligand radiomarqué serait là encore d'un intérêt majeur. Les laboratoires

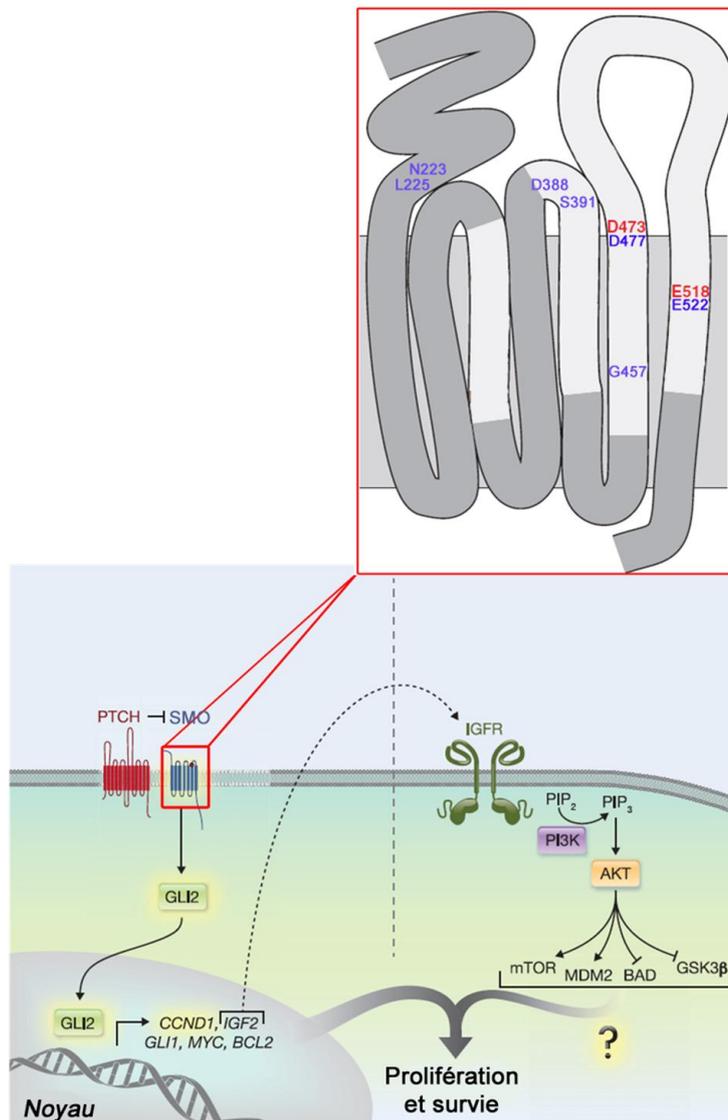


Figure 20 : Schéma des modifications aboutissant aux résistances observées après le traitement de médulloblastomes par des antagonistes de Smoothened.

Les mutations de Smo présentées dans l'encadré rouge et l'amplification de Gli2 et des gènes cibles de la voie tels que la Cycline D1 (CCND1) ont été identifiés comme des mécanismes potentiels de résistance survenant lors du traitement de médulloblastomes chez l'Homme ou dans un modèle murin de tumeur par des antagonistes de Smo. Les mutations faux-sens identifiées sur les récepteurs Smo murin (en bleu) ou humain (en rouge), à l'origine des résistances au traitement par GDC-0449 (D473, D477, E518 et E522) ou LDE-225 (N223, L225, D388, S391 et G457) sont reportées sur la représentation schématique du récepteur. L'augmentation de l'expression de la voie PI3K est un autre mécanisme de résistance identifié qui pourrait contribuer à la réémergence des tumeurs après traitement par les antagonistes de Smo. Le niveau d'expression du récepteur à l'Igf1, Igf1R, est également augmenté en réponse à une activation de la voie Hedgehog. D'après (Dijkgraaf *et al.*, 2011; Metcalfe and de Sauvage, 2011).

Genentech ont déjà rapporté la synthèse de composés de type bis-amide capables d'interagir avec la forme mutante du récepteur Smo insensible à la liaison du GDC-0449 (*Dijkgraaf et al., 2011*). De même, deux molécules ALLO-1 et ALLO-2 ont été récemment décrites. Il s'agit d'antagonistes de Smo capables de bloquer la prolifération des GCP et le développement de tumeurs dans un modèle murin $Ptc^{+/-}p53^{-/}$. Ces composés inhibent également *in vitro* et *in vivo* l'activité de la voie Hh transmise par la forme de Smo résistante au GDC-0449. ALLO-1 et ALLO-2 présentent une particularité supplémentaire puisqu'ils ne sont pas capables d'inhiber la liaison des formes radiomarquées de SAG et de HH-Ag1.5 indiquant une fois encore, l'existence de multiples sites de liaison des ligands sur le récepteur Smo (*Tao et al., 2011*).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse auront, tout d'abord, permis la validation d'un modèle pharmacophorique du récepteur Smo qui ouvre de nouvelles perspectives pour la recherche et le développement de petites molécules régulatrices de ce récepteur. Ce modèle a conduit à l'identification de nouvelles familles de molécules de structures originales et caractérisées comme de puissants antagonistes du récepteur Smo. En particulier, l'affinité nanomolaire du composé MRT-83, de l'acylurée 60 et de l'acylthiourée 71 sur le récepteur Smo murin et humain, leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire des précurseurs des cellules granulaires du cervelet induite par la signalisation Hh *in vitro* et l'efficacité spécifique du composé MRT-83 *in vivo*, laissent supposer que ce dernier pourrait être la nouvelle tête de série de molécules utilisables en thérapeutique pour le traitement de tumeurs Hh-dépendantes. L'investigation des profils pharmacodynamique et cinétique du composé, mais aussi de son efficacité à réprimer le développement tumoral sur des modèles murins pourrait à présent être envisagé. Il serait également intéressant d'étudier son activité éventuelle sur les formes de Smo résistantes aux composés GDC-0449 et LDE-225 pour d'une part, nous renseigner sur le site de liaison du composé au récepteur Smo et, d'autre part, éventuellement envisager à terme, son utilisation dans le cadre du traitement des tumeurs résistantes.

La très haute affinité de MRT-83 est un atout considérable qui en fait un outil pharmacologique très prometteur. En effet, la synthèse de dérivés fluorescents ou radiomarqués de MRT-83 ou de ses dérivés est envisageable et permettrait de mieux caractériser sa liaison sur les formes sauvages et mutantes du récepteur Smo murin et humain. L'utilisation de ces dérivés pourrait être envisagée afin de déterminer les acides aminés impliqués dans la liaison des ligands au récepteur comme l'équipe l'a préalablement fait pour un autre RCPG, le récepteur au calcium CaSR (Calcium-sensing receptor ; *Petrel et al., 2004*). Ces dérivés pourraient également permettre de réaliser la cartographie précise de l'expression du récepteur Smo dans le cerveau. Enfin, ils pourraient également faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation et translocation du récepteur Smo au cil primaire, un phénomène qui n'est pas encore totalement élucidé et qui présente un intérêt à la fois fondamental et appliqué à la thérapeutique en raison du rôle important de l'organelle dans les pathologies reliées à des dérégulations de la voie Hh.

BIBLIOGRAPHIE

- Aanstad P, Santos N, Corbit KC, Scherz PJ, Trinh le A, Salvenmoser W, Huisken J, Reiter JF and Stainier DY (2009) The extracellular domain of Smoothed regulates ciliary localization and is required for high-level Hh signaling. *Curr Biol* **19**(12):1034-1039.
- Adolphe C, Hetherington R, Ellis T and Wainwright B (2006) Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer research* **66**(4):2081-2088.
- Aguinaga M, Zenteno JC, Perez-Cano H and Moran V (2010) Sonic hedgehog mutation analysis in patients with VACTERL association. *American journal of medical genetics* **152A**(3):781-783.
- Ahn S and Joyner AL (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**(7060):894-897.
- Aikin RA, Ayers KL and Therond PP (2008) The role of kinases in the Hedgehog signalling pathway. *EMBO reports* **9**(4):330-336.
- Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M and Hooper JE (1996) The Drosophila smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* **86**(2):221-232.
- Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, Krauss RS and McMahon AP (2011) Overlapping Roles and Collective Requirement for the Coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH Pathway Function. *Developmental cell* **20**(6):775-787.
- Allen BL, Tenzen T and McMahon AP (2007) The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & development* **21**(10):1244-1257.
- Alvarez-Medina R, Cayuso J, Okubo T, Takada S and Marti E (2008) Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development (Cambridge, England)* **135**(2):237-247.
- Alves G, Limbourg-Bouchon B, Tricoire H, Brissard-Zahraoui J, Lamour-Isnard C and Busson D (1998) Modulation of Hedgehog target gene expression by the Fused serine-threonine kinase in wing imaginal discs. *Mechanisms of development* **78**(1-2):17-31.
- Amador-Arjona A, Elliott J, Miller A, Ginbey A, Pazour GJ, Enikolopov G, Roberts AJ and Terskikh AV (2011) Primary cilia regulate proliferation of amplifying progenitors in adult hippocampus: implications for learning and memory. *J Neurosci* **31**(27):9933-9944.
- Angot E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M and Traiffort E (2008) Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**(9):2311-2320.
- Apionishev S, Katanayeva NM, Marks SA, Kalderon D and Tomlinson A (2005) Drosophila Smoothed phosphorylation sites essential for Hedgehog signal transduction. *Nature cell biology* **7**(1):86-92.
- Ayers KL and Therond PP (2010) Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends in cell biology* **20**(5):287-298.
- Bailey JM, Mohr AM and Hollingsworth MA (2009) Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* **28**(40):3513-3525.
- Balordi F and Fishell G (2007a) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* **27**(22):5936-5947.
- Balordi F and Fishell G (2007b) Mosaic removal of hedgehog signaling in the adult SVZ reveals that the residual wild-type stem cells have a limited capacity for self-renewal. *J Neurosci* **27**(52):14248-14259.

- Banerjee SB, Rajendran R, Dias BG, Ladiwala U, Tole S and Vaidya VA (2005) Recruitment of the Sonic hedgehog signalling cascade in electroconvulsive seizure-mediated regulation of adult rat hippocampal neurogenesis. *The European journal of neuroscience* **22**(7):1570-1580.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A and Eberhart CG (2007) Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**(10):2524-2533.
- Barakat MT, Humke EW and Scott MP (2010) Learning from Jekyll to control Hyde: Hedgehog signaling in development and cancer. *Trends in molecular medicine* **16**(8):337-348.
- Barnes EA, Kong M, Ollendorff V and Donoghue DJ (2001) Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *The EMBO journal* **20**(9):2214-2223.
- Barzi M, Berenguer J, Menendez A, Alvarez-Rodriguez R and Pons S (2010) Sonic-hedgehog-mediated proliferation requires the localization of PKA to the cilium base. *Journal of cell science* **123**(Pt 1):62-69.
- Barzi M, Kostrz D, Menendez A and Pons S (2011) Sonic Hedgehog-induced proliferation requires specific Galpha inhibitory proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**(10):8067-8074.
- Beachy PA, Hymowitz SG, Lazarus RA, Leahy DJ and Siebold C (2010) Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes & development* **24**(18):2001-2012.
- Beachy PA, Karhadkar SS and Berman DM (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**(7015):324-331.
- Beauchamp EM, Ringer L, Bulut G, Sajwan KP, Hall MD, Lee YC, Peaceman D, Ozdemirli M, Rodriguez O, Macdonald TJ, Albanese C, Toretsky JA and Uren A (2011) Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *The Journal of clinical investigation* **121**(1):148-160.
- Bellaiche Y, The I and Perrimon N (1998) Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* **394**(6688):85-88.
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM and Beachy PA (2002) Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science (New York, NY)* **297**(5586):1559-1561.
- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN and Beachy PA (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**(6960):846-851.
- Beug ST, Parks RJ, McBride HM and Wallace VA (2011) Processing-dependent trafficking of Sonic hedgehog to the regulated secretory pathway in neurons. *Molecular and cellular neurosciences* **46**(3):583-596.
- Bezard E, Baufreton J, Owens G, Crossman AR, Dudek H, Taupignon A and Brotchie JM (2003) Sonic hedgehog is a neuromodulator in the adult subthalamic nucleus. *Faseb J* **17**(15):2337-2338.
- Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F and Peppelenbosch MP (2006) Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS biology* **4**(8):e232.

- Bishop B, Aricescu AR, Harlos K, O'Callaghan CA, Jones EY and Siebold C (2009) Structural insights into hedgehog ligand sequestration by the human hedgehog-interacting protein HHIP. *Nature structural & molecular biology* **16**(7):698-703.
- Bleicher KH, Bohm HJ, Muller K and Alanine AI (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2**(5):369-378.
- Boehlke C, Bashkurov M, Buescher A, Krick T, John AK, Nitschke R, Walz G and Kuehn EW (2010) Differential role of Rab proteins in ciliary trafficking: Rab23 regulates smoothed levels. *Journal of cell science* **123**(Pt 9):1460-1467.
- Borzillo GV and Lippa B (2005) The Hedgehog signaling pathway as a target for anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* **5**(2):147-157.
- Bosanac I, Maun HR, Scales SJ, Wen X, Lingel A, Bazan JF, de Sauvage FJ, Hymowitz SG and Lazarus RA (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.
- Bragina O, Sergejeva S, Serg M, Zarkovsky T, Maloverjan A, Kogerman P and Zarkovsky A (2010) Smoothed agonist augments proliferation and survival of neural cells. *Neuroscience letters* **482**(2):81-85.
- Brancati F, Iannicelli M, Travaglini L, Mazzotta A, Bertini E, Boltshauser E, D'Arrigo S, Emma F, Fazzi E, Gallizzi R, Gentile M, Loncarevic D, Mejaski-Bosnjak V, Pantaleoni C, Rigoli L, Salpietro CD, Signorini S, Stringini GR, Verloes A, Zablocka D, Dallapiccola B, Gleeson JG and Valente EM (2009) MKS3/TMEM67 mutations are a major cause of COACH Syndrome, a Joubert Syndrome related disorder with liver involvement. *Human mutation* **30**(2):E432-442.
- Breunig JJ, Sarkisian MR, Arellano JI, Morozov YM, Ayoub AE, Sojitra S, Wang B, Flavell RA, Rakic P and Town T (2008) Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(35):13127-13132.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O and Gotz M (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature neuroscience* **12**(12):1524-1533.
- Briscoe J, Chen Y, Jessell TM and Struhl G (2001) A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Molecular cell* **7**(6):1279-1291.
- Brownell I, Guevara E, Bai CB, Loomis CA and Joyner AL (2011) Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell* **8**(5):552-565.
- Bruggemann LW, Queiroz KC, Zamani K, van Straaten A, Spek CA and Bijlsma MF (2010) Assessing the efficacy of the hedgehog pathway inhibitor vitamin D3 in a murine xenograft model for pancreatic cancer. *Cancer biology & therapy* **10**(1):79-88.
- Brunton SA, Stibbard JH, Rubin LL, Guicherit OM, Kruse LI, Price S, di Lucrezia R, MacKinnon CH, Avery A, Park Y, Buxton D and Boyd EA (2009) Potent agonists of the Hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**(15):4308-4311.
- Brunton SA, Stibbard JH, Rubin LL, Kruse LI, Guicherit OM, Boyd EA and Price S (2008) Potent inhibitors of the hedgehog signaling pathway. *Journal of medicinal chemistry* **51**(5):1108-1110.

- Buglino JA and Resh MD (2008) Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog. *The Journal of biological chemistry* **283**(32):22076-22088.
- Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR and Dorsch M (2010) Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Science translational medicine* **2**(51):51ra70.
- Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ and 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.
- Buttner A, Seifert K, Cottin T, Sarli V, Tzagkaroulaki L, Scholz S and Giannis A (2009) Synthesis and biological evaluation of SANT-2 and analogues as inhibitors of the hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17**(14):4943-4954.
- Butts T, Chaplin N and Wingate RJ (2011) Can clues from evolution unlock the molecular development of the cerebellum? *Molecular neurobiology* **43**(1):67-76.
- Callejo A, Biloni A, Mollica E, Gorfinkiel N, Andres G, Ibanez C, Torroja C, Doglio L, Sierra J and Guerrero I (2011) Feature Article: 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 of the United States of America* **108**(31):12591-12598.
- Capdevila J, Pariente F, Sampedro J, Alonso JL and Guerrero I (1994) Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in Drosophila embryos. *Development (Cambridge, England)* **120**(4):987-998.
- Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A and de Sauvage FJ (1998) Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(23):13630-13634.
- Casali A (2010) Self-induced patched receptor down-regulation modulates cell sensitivity to the hedgehog morphogen gradient. *Science signaling* **3**(136):ra63.
- Casali A and Struhl G (2004) Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound Patched protein. *Nature* **431**(7004):76-80.
- Castanedo GM, Wang S, Robarge KD, Blackwood E, Burdick D, Chang C, Dijkgraaf GJ, Gould S, Gunzner J, Guichert O, Halladay J, Khojasteh C, Lee L, Marsters JC, Jr., Murray L, Peterson D, Plise E, Salphati L, de Sauvage FJ, Wong S and Sutherlin DP (2010) Second generation 2-pyridyl biphenyl amide inhibitors of the hedgehog pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**(22):6748-6753.
- Chamberlain CE, Jeong J, Guo C, Allen BL and McMahon AP (2008) Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development (Cambridge, England)* **135**(6):1097-1106.
- Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA and Basler K (2001) Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science (New York, NY)* **293**(5537):2080-2084.
- Chan JA, Balasubramanian S, Witt RM, Nazemi KJ, Choi Y, Pazyra-Murphy MF, Walsh CO, Thompson M and Segal RA (2009) Proteoglycan interactions with Sonic Hedgehog specify mitogenic responses. *Nature neuroscience* **12**(4):409-417.

- Chang C, Ekins S, Bahadduri P and Swaan PW (2006) Pharmacophore-based discovery of ligands for drug transporters. *Advanced drug delivery reviews* **58**(12-13):1431-1450.
- Chang H, Li Q, Moraes RC, Lewis MT and Hamel PA (2010) Activation of Erk by sonic hedgehog independent of canonical hedgehog signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**(9):1462-1471.
- Charytoniuk D, Traiffort E, Hantraye P, Hermel JM, Galdes A and Ruat M (2002) Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *The European journal of neuroscience* **16**(12):2351-2357.
- Chen JK, Taipale J, Cooper MK and Beachy PA (2002a) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes & development* **16**(21):2743-2748.
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T and Beachy PA (2002b) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(22):14071-14076.
- Chen MH, Gao N, Kawakami T and Chuang PT (2005) Mice deficient in the fused homolog do not exhibit phenotypes indicative of perturbed hedgehog signaling during embryonic development. *Molecular and cellular biology* **25**(16):7042-7053.
- Chen MH, Li YJ, Kawakami T, Xu SM and Chuang PT (2004a) Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes & development* **18**(6):641-659.
- Chen MH, Wilson CW, Li YJ, Law KK, Lu CS, Gacayan R, Zhang X, Hui CC and Chuang PT (2009) Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes & development* **23**(16):1910-1928.
- Chen W, Ren XR, Nelson CD, Barak LS, Chen JK, Beachy PA, de Sauvage F and Lefkowitz RJ (2004b) Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science (New York, NY)* **306**(5705):2257-2260.
- Chen W, Tang T, Eastham-Anderson J, Dunlap D, Alicke B, Nannini M, Gould S, Yauch R, Modrusan Z, Dupree KJ, Darbonne WC, Plowman G, de Sauvage FJ and Callahan CA (2011a) Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(23):9589-9594.
- Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T and Konishi I (2007) Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis. *Cancer science* **98**(1):68-76.
- Chen X, Tukachinsky H, Huang CH, Jao C, Chu YR, Tang HY, Mueller B, Schulman S, Rapoport TA and Salic A (2011b) Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **192**(5):825-838.
- Chen Y, Li S, Tong C, Zhao Y, Wang B, Liu Y, Jia J 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 & development* **24**(18):2054-2067.
- Chen Y, Sasai N, Ma G, Yue T, Jia J, Briscoe J and Jiang J (2011c) Sonic Hedgehog Dependent Phosphorylation by CK1alpha and GRK2 Is Required for Ciliary Accumulation and Activation of Smoothened. *PLoS biology* **9**(6):e1001083.
- Chen Y and Struhl G (1996) Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**(3):553-563.
- Cheng SY and Yue S (2008) Role and regulation of human tumor suppressor SUFU in Hedgehog signaling. *Advances in cancer research* **101**:29-43.

- Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA and Dlugosz AA (1999) Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Developmental biology* **205**(1):1-9.
- Chuang PT, Kawcak T and McMahon AP (2003) Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes & development* **17**(3):342-347.
- Chuang PT and McMahon AP (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**(6720):617-621.
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I and Ruiz i Altaba A (2007) HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* **17**(2):165-172.
- Congreve M and Marshall F (2010) The impact of GPCR structures on pharmacology and structure-based drug design. *British journal of pharmacology* **159**(5):986-996.
- Cooper MK, Porter JA, Young KE and Beachy PA (1998) Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science (New York, NY)* **280**(5369):1603-1607.
- Cooper MK, Wassif CA, Krakowiak PA, Taipale J, Gong R, Kelley RI, Porter FD and Beachy PA (2003) A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nature genetics* **33**(4):508-513.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY and Reiter JF (2005) Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* **437**(7061):1018-1021.
- Corcoran RB and Scott MP (2006) Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(22):8408-8413.
- Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM and Joyner AL (2006) The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development (Cambridge, England)* **133**(9):1811-1821.
- Corrales JD, Rocco GL, Blaess S, Guo Q and Joyner AL (2004) Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development (Cambridge, England)* **131**(22):5581-5590.
- Cotsarelis G, Sun TT and Lavker RM (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**(7):1329-1337.
- Coulombe J, Traiffort E, Loulier K, Faure H and Ruat M (2004) Hedgehog interacting protein in the mature brain: membrane-associated and soluble forms. *Molecular and cellular neurosciences* **25**(2):323-333.
- Croyle MJ, Lehman JM, O'Connor AK, Wong SY, Malarkey EB, Iribarne D, Dowdle WE, Schoeb TR, Verney ZM, Athar M, Michaud EJ, Reiter JF and Yoder BK (2011) Role of epidermal primary cilia in the homeostasis of skin and hair follicles. *Development (Cambridge, England)* **138**(9):1675-1685.
- Dafinger C, Liebau MC, Elsayed SM, Hellenbroich Y, Boltshauser E, Korenke GC, Fabretti F, Janecke AR, Ebermann I, Nurnberg G, Nurnberg P, Zentgraf H, Koerber F, Addicks K, Elsobky E, Benzing T, Schermer B and Bolz HJ (2011) Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *The Journal of clinical investigation* **121**(7):2662-2667.
- Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P and Ruiz i Altaba A (1997) Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* **389**(6653):876-881.
- Dahmane N and Ruiz i Altaba A (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development (Cambridge, England)* **126**(14):3089-3100.

- Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H and Ruiz i Altaba A (2001) The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development (Cambridge, England)* **128**(24):5201-5212.
- Dakubo GD, Beug ST, Mazerolle CJ, Thurig S, Wang Y and Wallace VA (2008) Control of glial precursor cell development in the mouse optic nerve by sonic hedgehog from retinal ganglion cells. *Brain research* **1228**:27-42.
- Dass B, Iravani MM, Jackson MJ, Engber TM, Galdes A and Jenner P (2002) Behavioural and immunohistochemical changes following supranigral administration of sonic hedgehog in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmosets. *Neuroscience* **114**(1):99-109.
- Davey MG, Paton IR, Yin Y, Schmidt M, Bangs FK, Morrice DR, Smith TG, Buxton P, Stamataki D, Tanaka M, Munsterberg AE, Briscoe J, Tickle C and Burt DW (2006) The chicken talpid3 gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes & development* **20**(10):1365-1377.
- de Kloe GE, Bailey D, Leurs R and de Esch IJ (2009) Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry. *Drug discovery today* **14**(13-14):630-646.
- DeCamp DL, Thompson TM, de Sauvage FJ and Lerner MR (2000) Smoothed activates Galphai-mediated signaling in frog melanophores. *The Journal of biological chemistry* **275**(34):26322-26327.
- Dessaud E, McMahon AP and Briscoe J (2008) Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development (Cambridge, England)* **135**(15):2489-2503.
- Dessaud E, Ribes V, Balaskas N, Yang LL, Pierani A, Kicheva A, Novitsch BG, Briscoe J and Sasai N (2010) Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS biology* **8**(6):e1000382.
- Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitsch BG and Briscoe J (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* **450**(7170):717-720.
- Dessole G, Branca D, Ferrigno F, Kinzel O, Muraglia E, Palumbi MC, Rowley M, Serafini S, Steinkuhler C and Jones P (2009) Discovery of N-[(1-aryl-1H-indazol-5-yl)methyl]amides derivatives as smoothed antagonists for inhibition of the hedgehog pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**(15):4191-4195.
- Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF, Schultz P and Warmuth M (2007) Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nature medicine* **13**(8):944-951.
- Dijkgraaf GJ, Alicke B, Weinmann L, Januario T, West K, Modrusan Z, Burdick D, Goldsmith R, Robarge K, Sutherlin D, Scales SJ, Gould SE, Yauch RL and de Sauvage FJ (2011) Small molecule inhibition of GDC-0449 refractory smoothed mutants and downstream mechanisms of drug resistance. *Cancer research* **71**(2):435-444.
- Ding Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J and Hui CC (1998) Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. *Development (Cambridge, England)* **125**(14):2533-2543.
- Douglas AE, Heim JA, Shen F, Amada LL, Riobo NA, Fernandez-Zapico ME and Manning DR (2011) The α subunit of the G protein G13 regulates the activity of one or more Gli transcription factors independently of smoothed. *The Journal of biological chemistry*.

- Dowdle WE, Robinson JF, Kneist A, Sirerol-Piquer MS, Frints SG, Corbit KC, Zaghloul NA, van Lijnschoten G, Mulders L, Verver DE, Zerres K, Reed RR, Attie-Bitach T, Johnson CA, Garcia-Verdugo JM, Katsanis N, Bergmann C and Reiter JF (2011) Disruption of a ciliary b9 protein complex causes meckel syndrome. *American journal of human genetics* **89**(1):94-110.
- Dwyer JR, Sever N, Carlson M, Nelson SF, Beachy PA and Parhami F (2007) Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry* **282**(12):8959-8968.
- Eaton S (2008) Multiple roles for lipids in the Hedgehog signalling pathway. *Nature reviews* **9**(6):437-445.
- Ellis T, Smyth I, Riley E, Graham S, Elliot K, Narang M, Kay GF, Wicking C and Wainwright B (2003) Patched 1 conditional null allele in mice. *Genesis* **36**(3):158-161.
- Emadi A and Gore SD (2010) Arsenic trioxide - An old drug rediscovered. *Blood reviews* **24**(4-5):191-199.
- Emmer BT, Maric D and Engman DM (2010) Molecular mechanisms of protein and lipid targeting to ciliary membranes. *Journal of cell science* **123**(Pt 4):529-536.
- Engel S, Skoumbourdis AP, Childress J, Neumann S, Deschamps JR, Thomas CJ, Colson AO, Costanzi S and Gershengorn MC (2008) A virtual screen for diverse ligands: discovery of selective G protein-coupled receptor antagonists. *Journal of the American Chemical Society* **130**(15):5115-5123.
- Epstein EH (2008) Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* **8**(10):743-754.
- Ericson J, Morton S, Kawakami A, Roelink H and Jessell TM (1996) Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* **87**(4):661-673.
- Etheridge LA, Crawford TQ, Zhang S and Roelink H (2010) Evidence for a role of vertebrate Displ in long-range Shh signaling. *Development (Cambridge, England)* **137**(1):133-140.
- Evron T, Philipp M, Lu J, Meloni AR, Burkhalter M, Chen W and Caron MG (2011) Growth arrest Specific 8 (Gas8) and GPCR kinase 2 (GRK2) cooperate in the control of smoothed signaling. *The Journal of biological chemistry* **286**(31):27676-27686.
- Fan CM, Porter JA, Chiang C, Chang DT, Beachy PA and Tessier-Lavigne M (1995) Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell* **81**(3):457-465.
- Fan H, Oro AE, Scott MP and Khavari PA (1997) Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nature medicine* **3**(7):788-792.
- Fan L, Pepicelli CV, Dibble CC, Catbagan W, Zarycki JL, Laciak R, Gipp J, Shaw A, Lamm ML, Munoz A, Lipinski R, Thrasher JB and Bushman W (2004) Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology* **145**(8):3961-3970.
- Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W and Maitra A (2007) Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer research* **67**(5):2187-2196.
- Feldmann G, Fendrich V, McGovern K, Bedja D, Bisht S, Alvarez H, Koorstra JB, Habbe N, Karikari C, Mullendore M, Gabrielson KL, Sharma R, Matsui W and Maitra A (2008) An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor

- initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Molecular cancer therapeutics* **7**(9):2725-2735.
- Fiaschi M, Rozell B, Bergstrom A and Toftgard R (2009) Development of mammary tumors by conditional expression of GLI1. *Cancer research* **69**(11):4810-4817.
- Filmus J and Capurro M (2008) The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **7**(18):2787-2790.
- Fisher CE and Howie SE (2006) The role of megalin (LRP-2/Gp330) during development. *Developmental biology* **296**(2):279-297.
- Flora A, Klisch TJ, Schuster G and Zoghbi HY (2009) Deletion of Atoh1 disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma. *Science (New York, NY)* **326**(5958):1424-1427.
- Forbes AJ, Nakano Y, Taylor AM and Ingham PW (1993) Genetic analysis of hedgehog signalling in the Drosophila embryo. *Dev Suppl*:115-124.
- Francis SS, Sfakianos J, Lo B and Mellman I (2011) A hierarchy of signals regulates entry of membrane proteins into the ciliary membrane domain in epithelial cells. *The Journal of cell biology* **193**(1):219-233.
- Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL and Porter JA (2002) Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *Journal of biology* **1**(2):10.
- Frappart PO, Lee Y, Russell HR, Chalhoub N, Wang YD, Orii KE, Zhao J, Kondo N, Baker SJ and McKinnon PJ (2009) Recurrent genomic alterations characterize medulloblastoma arising from DNA double-strand break repair deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(6):1880-1885.
- Fuccillo M, Joyner AL and Fishell G (2006) Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* **7**(10):772-783.
- Furuta T, Sakai T, Senga T, Osawa T, Kubo K, Shimizu T, Suzuki R, Yoshino T, Endo M and Miwa A (2006) Identification of potent and selective inhibitors of PDGF receptor autophosphorylation. *Journal of medicinal chemistry* **49**(7):2186-2192.
- Fuse N, Maiti T, Wang B, Porter JA, Hall TM, Leahy DJ and Beachy PA (1999) Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(20):10992-10999.
- Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Paliak S, Drum MA, Pastakia B, McBride OW, Kase R and et al. (1992) Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell* **69**(1):111-117.
- Gallet A (2011) Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends in cell biology* **21**(4):238-246.
- Gallet A and Therond PP (2005) Temporal modulation of the Hedgehog morphogen gradient by a patched-dependent targeting to lysosomal compartment. *Developmental biology* **277**(1):51-62.
- Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, Ramaswami G, Otto EA, Noriega TR, Seol AD, Robinson JF, Bennett CL, Josifova DJ, Garcia-Verdugo JM, Katsanis N, Hildebrandt F and Reiter JF (2011) A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nature genetics* **43**(8):776-784.

- Garcia AD, Petrova R, Eng L and Joyner AL (2010) Sonic hedgehog regulates discrete populations of astrocytes in the adult mouse forebrain. *J Neurosci* **30**(41):13597-13608.
- Gerber AN, Wilson CW, Li YJ and Chuang PT (2007) The hedgehog regulated oncogenes Gli1 and Gli2 block myoblast differentiation by inhibiting MyoD-mediated transcriptional activation. *Oncogene* **26**(8):1122-1136.
- Gerdes JM, Davis EE and Katsanis N (2009) The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**(1):32-45.
- Ghahramani Seno MM, Kwan BY, Lee-Ng KK, Moessner R, Lionel AC, Marshall CR and Scherer SW (2011) Human PTCHD3 nulls: rare copy number and sequence variants suggest a non-essential gene. *BMC medical genetics* **12**:45.
- Ghorai P, Kraus A, Keller M, Gotte C, Igel P, Schneider E, Schnell D, Bernhardt G, Dove S, Zabel M, Elz S, Seifert R and Buschauer A (2008) Acylguanidines as bioisosteres of guanidines: NG-acylated imidazolylpropylguanidines, a new class of histamine H2 receptor agonists. *Journal of medicinal chemistry* **51**(22):7193-7204.
- Giannetti AM, Wong H, Dijkgraaf GJ, Dueber EC, Ortwine DF, Bravo BJ, Gould SE, Plise EG, Lum BL, Malhi V and Graham RA (2011) Identification, characterization, and implications of species-dependent plasma protein binding for the oral Hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449). *Journal of medicinal chemistry* **54**(8):2592-2601.
- Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Curre DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R and Gilbertson RJ (2010) Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* **468**(7327):1095-1099.
- Glazer AM, Wilkinson AW, Backer CB, Lapan SW, Gutzman JH, Cheeseman IM and Reddien PW (2010) The Zn finger protein Iguana impacts Hedgehog signaling by promoting ciliogenesis. *Developmental biology* **337**(1):148-156.
- Goetz SC and Anderson KV (2010) The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* **11**(5):331-344.
- Goldberg LH, Landau JM, Moody MN, Kazakevich N, Holzer AM and Myers A (2011) Resolution of Odontogenic Keratocysts of the Jaw in Basal Cell Nevus Syndrome With GDC-0449. *Archives of dermatology* **147**(7):839-841.
- Gongal PA, French CR and Waskiewicz AJ (2011) Aberrant forebrain signaling during early development underlies the generation of holoprosencephaly and coloboma. *Biochimica et biophysica acta* **1812**(3):390-401.
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA and Scott MP (1996) Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes & development* **10**(3):301-312.
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM and Scott MP (1997) Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science (New York, NY)* **277**(5329):1109-1113.
- Gorlin RJ (1987) Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* **66**(2):98-113.
- Grachtchouk M, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC and Dlugosz AA (2000) Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nature genetics* **24**(3):216-217.
- Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A, Wilbert D, Patel RM, Ferris J, Diener J, Allen M, Lim S, Syu LJ, Verhaegen M and Dlugosz AA (2011)

- Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *The Journal of clinical investigation* **121**(5):1768-1781.
- Grover VK, Valadez JG, Bowman AB and Cooper MK (2011) Lipid modifications of sonic hedgehog ligand dictate cellular reception and signal response. *PloS one* **6**(7):e21353.
- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B and Bale AE (1996) Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**(6):841-851.
- Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G and Zimmer A (1998) Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nature medicine* **4**(5):619-622.
- Hallahan AR, Pritchard JJ, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA and Olson JM (2004) The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer research* **64**(21):7794-7800.
- Hallur G, Jimeno A, Dalrymple S, Zhu T, Jung MK, Hidalgo M, Isaacs JT, Sukumar S, Hamel E and Khan SR (2006) Benzoylphenylurea sulfur analogues with potent antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry* **49**(7):2357-2360.
- Hammerschmidt M and McMahon AP (1998) The effect of pertussis toxin on zebrafish development: a possible role for inhibitory G-proteins in hedgehog signaling. *Developmental biology* **194**(2):166-171.
- Han C, Belenkaya TY, Wang B and Lin X (2004) Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process. *Development (Cambridge, England)* **131**(3):601-611.
- Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, Ellison DW, Gilbertson RJ and Alvarez-Buylla A (2009) Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nature medicine* **15**(9):1062-1065.
- Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S and Alvarez-Buylla A (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature neuroscience* **11**(3):277-284.
- Harris PJ, Takebe N and Ivy SP (2010) Molecular conversations and the development of the hair follicle and basal cell carcinoma. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* **3**(10):1217-1221.
- Hatten ME and Roussel MF (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Trends in neurosciences* **34**(3):134-142.
- Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ and Yoder BK (2005) Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS genetics* **1**(4):e53.
- Haynes NE, Corbett WL, Bizzarro FT, Guertin KR, Hilliard DW, Holland GW, Kester RF, Mahaney PE, Qi L, Spence CL, Teng J, Dvorozniak MT, Railkar A, Matschinsky FM, Grippo JF, Grimsby J and Sarabu R (2010) Discovery, structure-activity relationships, pharmacokinetics, and efficacy of glucokinase activator (2R)-3-cyclopentyl-2-(4-methanesulfonylphenyl)-N-thiazol-2-yl-propionamide (RO0281675). *Journal of medicinal chemistry* **53**(9):3618-3625.
- Heretsch P, Buttner A, Tzagkaroulaki L, Zahn S, Kirchner B and Giannis A (2011) Exo-Cyclopamine-a stable and potent inhibitor of hedgehog-signaling. *Chemical communications (Cambridge, England)* **47**(26):7362-7364.

- Heretsch P, Rabe S and Giannis A (2009) Synthesis of all diastereomers of the piperidine--alkaloid substructure of cyclopamine. *Organic letters* **11**(23):5410-5412.
- Heretsch P, Tzagkaroulaki L and Giannis A (2010) Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**(18):6613-6624.
- Hildebrandt F, Benzing T and Katsanis N (2011) Ciliopathies. *The New England journal of medicine* **364**(16):1533-1543.
- Hooper JE (1994) Distinct pathways for autocrine and paracrine Wingless signalling in *Drosophila* embryos. *Nature* **372**(6505):461-464.
- Hooper JE and Scott MP (1989) The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* **59**(4):751-765.
- Hosoya T, Arai MA, Koyano T, Kowithayakorn T and Ishibashi M (2008) Naturally occurring small-molecule inhibitors of hedgehog/GLI-mediated transcription. *Chembiochem* **9**(7):1082-1092.
- Hu Q, Milenkovic L, Jin H, Scott MP, Nachury MV, Spiliotis ET and Nelson WJ (2010) A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science (New York, NY)* **329**(5990):436-439.
- Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, Litingtung Y and Chiang C (2010) Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(18):8422-8427.
- Huangfu D and Anderson KV (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(32):11325-11330.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L and Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* **426**(6962):83-87.
- Humke EW, Dorn KV, Milenkovic L, Scott MP and Rohatgi R (2010) The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes & development* **24**(7):670-682.
- Huse JT and Holland EC (2009) Genetically engineered mouse models of brain cancer and the promise of preclinical testing. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **19**(1):132-143.
- Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ, Solow-Cordero DE, Jiang J, Rowitch DH and Chen JK (2009) Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(33):14132-14137.
- Hynes M, Porter JA, Chiang C, Chang D, Tessier-Lavigne M, Beachy PA and Rosenthal A (1995) Induction of midbrain dopaminergic neurons by Sonic hedgehog. *Neuron* **15**(1):35-44.
- Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, Levine JH, Guinto CD, Lezameta M, Kriegstein AR and Alvarez-Buylla A (2011) Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* **71**(2):250-262.
- Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP and Roelink H (1998) The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)* **125**(18):3553-3562.
- Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP and Roelink H (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-

1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(22):12044-12049.
- Ingham PW (1991) Segment polarity genes and cell patterning within the *Drosophila* body segment. *Current opinion in genetics & development* **1**(2):261-267.
- Ingham PW, Nystedt S, Nakano Y, Brown W, Stark D, van den Heuvel M and Taylor AM (2000) Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Curr Biol* **10**(20):1315-1318.
- Izzi L, Levesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, Krauss RS, McMahon AP, Allen BL and Charron F (2011) Boc and gas1 each form distinct shh receptor complexes with ptch1 and are required for shh-mediated cell proliferation. *Developmental cell* **20**(6):788-801.
- Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh Z, C OM, Naumann H, Alvarez-Buylla A and Brandner S (2010) Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *The EMBO journal* **29**(1):222-235.
- Jenkins D (2009) Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cellular signalling* **21**(7):1023-1034.
- Jeong J and McMahon AP (2005) Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development (Cambridge, England)* **132**(1):143-154.
- Jia H, Liu Y, Yan W and Jia J (2009a) PP4 and PP2A regulate Hedgehog signaling by controlling Smo and Ci phosphorylation. *Development (Cambridge, England)* **136**(2):307-316.
- Jia J, Kolterud A, Zeng H, Hoover A, Teglund S, Toftgard R and Liu A (2009b) Suppressor of Fused inhibits mammalian Hedgehog signaling in the absence of cilia. *Developmental biology* **330**(2):452-460.
- Jia J, Tong C and Jiang J (2003) Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-terminal tail. *Genes & development* **17**(21):2709-2720.
- Jia J, Tong C, Wang B, Luo L and Jiang J (2004) Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* **432**(7020):1045-1050.
- Jiang J and Hui CC (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Developmental cell* **15**(6):801-812.
- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr. and Scott MP (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science (New York, NY)* **272**(5268):1668-1671.
- Joubert O, Nehme R, Fleury D, De Rivoyre M, Bidet M, Polidori A, Ruat M, Pucci B, Mollat P and Mus-Veteau I (2009) Functional studies of membrane-bound and purified human Hedgehog receptor Patched expressed in yeast. *Biochimica et biophysica acta* **1788**(9):1813-1821.
- Kagawa H, Shino Y, Kobayashi D, Demizu S, Shimada M, Ariga H and 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.
- Kaizerman JA, Aaron W, An S, Austin R, Brown M, Chong A, Huang T, Hungate R, Jiang B, Johnson MG, Lee G, Lucas BS, Orf J, Rong M, Toteva MM, Wickramasinghe D, Xu G, Ye Q, Zhong W and McMinn DL (2010) Addressing PXR liabilities of

- phthalazine-based hedgehog/smoothened antagonists using novel pyridopyridazines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**(15):4607-4610.
- Kanda S, Mochizuki Y, Suematsu T, Miyata Y, Nomata K and Kanetake H (2003) Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **278**(10):8244-8249.
- Kang JS, Gao M, Feinleib JL, Cotter PD, Guadagno SN and Krauss RS (1997) CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *The Journal of cell biology* **138**(1):203-213.
- Kang JS, Mulieri PJ, Hu Y, Taliana L and Krauss RS (2002) BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *The EMBO journal* **21**(1-2):114-124.
- Kang JS, Zhang W and Krauss RS (2007) Hedgehog signaling: cooking with Gas1. *Sci STKE* **2007**(403):pe50.
- Kappler R, Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Koleva M, Herwig A, Piontek G, Graedler F, Adamski J, Heinzmann U, Schlegel J, Hemmerlein B, Quintanilla-Martinez L and Hahn H (2003) Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma. *The Journal of pathology* **200**(3):348-356.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM and Beachy PA (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**(7009):707-712.
- Kasai K, Takahashi M, Osumi N, Sinnarajah S, Takeo T, Ikeda H, Kehrl JH, Itoh G and Arnheiter H (2004) The G12 family of heterotrimeric G proteins and Rho GTPase mediate Sonic hedgehog signalling. *Genes Cells* **9**(1):49-58.
- Kavran JM, Ward MD, Oladosu OO, Mulepati S and Leahy DJ (2010) All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *The Journal of biological chemistry* **285**(32):24584-24590.
- Kawabata N, Ijiri K, Ishidou Y, Yamamoto T, Nagao H, Nagano S, Maeda S, Komiya S and Setoguchi T (2011) Pharmacological inhibition of the Hedgehog pathway prevents human rhabdomyosarcoma cell growth. *International journal of oncology* **39**(4):899-906.
- Kenakin T (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends in pharmacological sciences* **24**(7):346-354.
- Kenney AM, Cole MD and Rowitch DH (2003) Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development (Cambridge, England)* **130**(1):15-28.
- Kenney AM and Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Molecular and cellular biology* **20**(23):9055-9067.
- Kenney AM, Widlund HR and Rowitch DH (2004) Hedgehog and PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development (Cambridge, England)* **131**(1):217-228.
- Khaliullina H, Panakova D, Eugster C, Riedel F, Carvalho M and Eaton S (2009) Patched regulates Smoothened trafficking using lipoprotein-derived lipids. *Development (Cambridge, England)* **136**(24):4111-4121.
- Kim HR, Richardson J, van Eeden F and Ingham PW (2010a) Gli2a protein localization reveals a role for Iguana/DZIP1 in primary ciliogenesis and a dependence of Hedgehog signal transduction on primary cilia in the zebrafish. *BMC biology* **8**:65.

- Kim J, Kato M and Beachy PA (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 of the United States of America* **106**(51):21666-21671.
- Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D and Beachy PA (2010b) Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(30):13432-13437.
- Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, Chong CR, Chang KS, Fereshteh M, Gardner D, Reya T, Liu JO, Epstein EH, Stevens DA and Beachy PA (2010c) Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer cell* **17**(4):388-399.
- Kim JJ, Gill PS, Rotin L, van Eede M, Henkelman RM, Hui CC and Rosenblum ND (2011) Suppressor of fused controls mid-hindbrain patterning and cerebellar morphogenesis via GLI3 repressor. *J Neurosci* **31**(5):1825-1836.
- Kinzel O, Alfieri A, Altamura S, Brunetti M, Bufali S, Colaceci F, Ferrigno F, Filocamo G, Fonsi M, Gallinari P, Malancona S, Hernando JI, Monteagudo E, Orsale MV, Palumbi MC, Pucci V, Rowley M, Sasso R, Scarpelli R, Steinkuhler C and Jones P (2011) Identification of MK-5710 ((8aS)-8a-methyl-1,3-dioxo-2-[(1S,2R)-2-phenylcyclopropyl]-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)hexahydro-imidazo[1,5-a]pyrazine-7(1H) -carboxamide), a potent smoothed antagonist for use in Hedgehog pathway dependent malignancies, Part 2. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**(15):4429-4435.
- Klabunde T, Wendt KU, Kadereit D, Brachvogel V, Burger HJ, Herling AW, Oikonomakos NG, Kosmopoulou MN, Schmoll D, Sarubbi E, von Roedern E, Schonafinger K and Defossa E (2005) Acyl ureas as human liver glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of medicinal chemistry* **48**(20):6178-6193.
- Kniazeff J, Prezeau L, Rondard P, Pin JP and Goudet C (2011) Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & therapeutics* **130**(1):9-25.
- Kobayashi T and Dynlacht BD (2011) Regulating the transition from centriole to basal body. *The Journal of cell biology* **193**(3):435-444.
- Kolpak A, Zhang J and Bao ZZ (2005) Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* **25**(13):3432-3441.
- Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K and Ishibashi M (2008) Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development (Cambridge, England)* **135**(16):2717-2727.
- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC and Versteeg R (2008) Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PloS one* **3**(8):e3088.
- Kovacs JJ, Whalen EJ, Liu R, Xiao K, Kim J, Chen M, Wang J, Chen W and Lefkowitz RJ (2008) Beta-arrestin-mediated localization of smoothed to the primary cilium. *Science (New York, NY)* **320**(5884):1777-1781.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S and Katano M (2004) Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer research* **64**(17):6071-6074.

- Lai CK, Gupta N, Wen X, Rangell L, Chih B, Peterson AS, Bazan JF, Li L and Scales SJ (2011) Functional characterization of putative cilia genes by high-content analysis. *Molecular biology of the cell* **22**(7):1104-1119.
- Lai K, Kaspar BK, Gage FH and Schaffer DV (2003) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience* **6**(1):21-27.
- Lam CW, Xie J, To KF, Ng HK, Lee KC, Yuen NW, Lim PL, Chan LY, Tong SF and McCormick F (1999) A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas. *Oncogene* **18**(3):833-836.
- Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T and Toftgard R (2007) Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(20):8455-8460.
- Lauth M, Rohnalter V, Bergstrom A, Kooshesh M, Svenningsson P and Toftgard R (2010) Antipsychotic drugs regulate hedgehog signaling by modulation of 7-dehydrocholesterol reductase levels. *Molecular pharmacology* **78**(3):486-496.
- Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI and Beachy PA (1994) Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science (New York, NY)* **266**(5190):1528-1537.
- Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T and McKinnon PJ (2007) Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene* **26**(44):6442-6447.
- Lee Y, Miller HL, Jensen P, Hernan R, Connelly M, Wetmore C, Zindy F, Roussel MF, Curran T, Gilbertson RJ and McKinnon PJ (2003) A molecular fingerprint for medulloblastoma. *Cancer research* **63**(17):5428-5437.
- Lee Y, Miller HL, Russell HR, Boyd K, Curran T and McKinnon PJ (2006) Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer research* **66**(14):6964-6971.
- Lewis PM, Dunn MP, McMahan JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B and McMahan AP (2001) Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**(5):599-612.
- Li A, Saito M, Chuang JZ, Tseng YY, Dedesma C, Tomizawa K, Kaitsuka T and Sung CH (2011a) Ciliary transition zone activation of phosphorylated Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase entry and fate of neural progenitors. *Nature cell biology* **13**(4):402-411.
- Li C, Chi S and Xie J (2011b) Hedgehog signaling in skin cancers. *Cellular signalling* **23**(8):1235-1243.
- Li JJ, Shanmugasundaram V, Reddy S, Fleischer LL, Wang Z, Smith Y, Harter WG, Yue WS, Swaroop M, Li L, Ji CX, Dettling D, Osak B, Fitzgerald LR and Conradi R (2010) Smoothed antagonists for hair inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**(16):4932-4935.
- Li Y and Hu J (2011) Small GTPases and cilia. *Protein & cell* **2**(1):13-25.
- Liem KF, Jr., He M, Ocbina PJ and Anderson KV (2009) Mouse Kif7/Costal2 is a cilia-associated protein that regulates Sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(32):13377-13382.
- Lin AC, Seeto BL, Bartoszko JM, Khoury MA, Whetstone H, Ho L, Hsu C, Ali SA and Alman BA (2009) Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nature medicine* **15**(12):1421-1425.
- Lipinski RJ and Bushman W (2010) Identification of Hedgehog signaling inhibitors with relevant human exposure by small molecule screening. *Toxicol In Vitro* **24**(5):1404-1409.

- Lipinski RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD and Bushman W (2006) Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. *Experimental cell research* **312**(11):1925-1938.
- Lledo PM, Alonso M and Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* **7**(3):179-193.
- Loulier K, Ruat M and Traiffort E (2006) Increase of proliferating oligodendroglial progenitors in the adult mouse brain upon Sonic hedgehog delivery in the lateral ventricle. *Journal of neurochemistry* **98**(2):530-542.
- Louvi A and Grove EA (2011) Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* **69**(6):1046-1060.
- Low JA and de Sauvage FJ (2010) Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol* **28**(36):5321-5326.
- Low WC, Wang C, Pan Y, Huang XY, Chen JK and Wang B (2008) The decoupling of Smoothed from Galphai proteins has little effect on Gli3 protein processing and Hedgehog-regulated chick neural tube patterning. *Developmental biology* **321**(1):188-196.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD and Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**(2):317-329.
- Lucas BS, Aaron W, An S, Austin RJ, Brown M, Chan H, Chong A, Hungate R, Huang T, Jiang B, Johnson MG, Kaizerman JA, Lee G, McMinn DL, Orf J, Powers JP, Rong M, Toteva MM, Uyeda C, Wickramasinghe D, Xu G, Ye Q and Zhong W (2010) Design of 1-piperazinyl-4-arylphthalazines as potent Smoothed antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **20**(12):3618-3622.
- Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M and Beachy PA (2003a) Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science (New York, NY)* **299**(5615):2039-2045.
- Lum L, Zhang C, Oh S, Mann RK, von Kessler DP, Taipale J, Weis-Garcia F, Gong R, Wang B and Beachy PA (2003b) Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Molecular cell* **12**(5):1261-1274.
- Lunt SC, Haynes T and Perkins BD (2009) Zebrafish *ift57*, *ift88*, and *ift172* intraflagellar transport mutants disrupt cilia but do not affect hedgehog signaling. *Dev Dyn* **238**(7):1744-1759.
- Lupo G, Harris WA and Lewis KE (2006) Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**(2):103-114.
- Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K and Beachy PA (2002) Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell* **111**(1):63-75.
- Machado AF, Hovland DN, Jr., Pilafas S and Collins MD (1999) Teratogenic response to arsenite during neurulation: relative sensitivities of C57BL/6J and SWV/Fnn mice and impact of the splotch allele. *Toxicol Sci* **51**(1):98-107.
- Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP and Fishell G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**(6):937-950.
- Mahindroo N, Punchihewa C and Fujii N (2009) Hedgehog-Gli signaling pathway inhibitors as anticancer agents. *Journal of medicinal chemistry* **52**(13):3829-3845.

- Maity T, Fuse N and Beachy PA (2005) Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(47):17026-17031.
- Malancona S, Altamura S, Filocamo G, Kinzel O, Hernando JI, Rowley M, Scarpelli R, Steinkuhler C and Jones P (2011) Identification of MK-5710 ((8aS)-8a-methyl-1,3-dioxo-2-[(1S,2R)-2-phenylcyclopropyl]-N-(1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)hexahydroimidazo[1,5-a]pyrazine-7(1H)-carboxamide), a potent smoothed antagonist for use in Hedgehog pathway dependent malignancies, Part 1. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**(15):4422-4428.
- Manetti F, Faure H, Roudaut H, Gorojankina T, Traiffort E, Schoenfelder A, Mann A, Solinas A, Taddei M and Ruat M (2010) Virtual screening-based discovery and mechanistic characterization of the acylthiourea MRT-10 family as smoothed antagonists. *Molecular pharmacology* **78**(4):658-665.
- Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D and McMahon AP (2006) A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer research* **66**(20):10171-10178.
- Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B and Cui H (2009) A critical role of Sonic Hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Cancer science* **100**(10):1848-1855.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM and Tabin CJ (1996) Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* **384**(6605):176-179.
- Marks SA and Kalderon D (2011) Regulation of mammalian Gli proteins by Costal 2 and PKA in *Drosophila* reveals Hedgehog pathway conservation. *Development (Cambridge, England)* **138**(12):2533-2542.
- Martin V, Carrillo G, Torroja C and Guerrero I (2001) The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol* **11**(8):601-607.
- Martinelli DC and Fan CM (2007) Gas1 extends the range of Hedgehog action by facilitating its signaling. *Genes & development* **21**(10):1231-1243.
- Martinelli DC and Fan CM (2009) A sonic hedgehog missense mutation associated with holoprosencephaly causes defective binding to GAS1. *The Journal of biological chemistry* **284**(29):19169-19172.
- Mas C and Ruiz i Altaba A (2010) Small molecule modulation of HH-Gli signaling: current leads, trials and tribulations. *Biochemical pharmacology* **80**(5):712-723.
- Masdeu C, Bernard V, Faure H, Traiffort E and Ruat M (2007) Distribution of Smoothed at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuroreport* **18**(4):395-399.
- Masdeu C, Faure H, Coulombe J, Schoenfelder A, Mann A, Brabet I, Pin JP, Traiffort E and Ruat M (2006) Identification and characterization of Hedgehog modulator properties after functional coupling of Smoothed to G15. *Biochemical and biophysical research communications* **349**(2):471-479.
- Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ and Hymowitz SG (2010) Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *The Journal of biological chemistry* **285**(34):26570-26580.
- May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zarbalis K, Reiter J, Ericson J and Peterson AS (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Developmental biology* **287**(2):378-389.

- McCarthy RA, Barth JL, Chintalapudi MR, Knaak C and Argraves WS (2002) Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *The Journal of biological chemistry* **277**(28):25660-25667.
- McInnes C (2007) Virtual screening strategies in drug discovery. *Current opinion in chemical biology* **11**(5):494-502.
- McLellan JS, Yao S, Zheng X, Geisbrecht BV, Ghirlando R, Beachy PA and Leahy DJ (2006) Structure of a heparin-dependent complex of Hedgehog and Ihog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(46):17208-17213.
- McLellan JS, Zheng X, Hauk G, Ghirlando R, Beachy PA and Leahy DJ (2008) The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* **455**(7215):979-983.
- McMahon AP, Ingham PW and Tabin CJ (2003) Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Current topics in developmental biology* **53**:1-114.
- Meloni AR, Fralish GB, Kelly P, Salahpour A, Chen JK, Wechsler-Reya RJ, Lefkowitz RJ and Caron MG (2006) Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Molecular and cellular biology* **26**(20):7550-7560.
- Metcalf C and de Sauvage FJ (2011) Hedgehog Fights Back: Mechanisms of Acquired Resistance against Smoothed Antagonists. *Cancer research* **71**(15):5057-5061.
- Miao N, Wang M, Ott JA, D'Alessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, Mahanthappa NK and Pang K (1997) Sonic hedgehog promotes the survival of specific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult In vitro. *J Neurosci* **17**(15):5891-5899.
- Milenkovic L and Scott MP (2010) Not lost in space: trafficking in the hedgehog signaling pathway. *Science signaling* **3**(117):pe14.
- Milenkovic L, Scott MP and Rohatgi R (2009) Lateral transport of Smoothed from the plasma membrane to the membrane of the cilium. *The Journal of cell biology* **187**(3):365-374.
- Miller-Moslin K, Peukert S, Jain RK, McEwan MA, Karki R, Llamas L, Yusuff N, He F, Li Y, Sun Y, Dai M, Perez L, Michael W, Sheng T, Lei H, Zhang R, Williams J, Bourret A, Ramamurthy A, Yuan J, Guo R, Matsumoto M, Vattay A, Maniara W, Amaral A, Dorsch M and Kelleher JF, 3rd (2009) 1-amino-4-benzylphthalazines as orally bioavailable smoothed antagonists with antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry* **52**(13):3954-3968.
- Molnar C, Holguin H, Mayor F, Jr., Ruiz-Gomez A and de Celis JF (2007) The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(19):7963-7968.
- Monje M, Mitra SS, Freret ME, Raveh TB, Kim J, Masek M, Attema JL, Li G, Haddix T, Edwards MS, Fisher PG, Weissman IL, Rowitch DH, Vogel H, Wong AJ and Beachy PA (2011) Hedgehog-responsive candidate cell of origin for diffuse intrinsic pontine glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(11):4453-4458.
- Mullor JL and Guerrero I (2000) A gain-of-function mutant of patched dissects different responses to the hedgehog gradient. *Developmental biology* **228**(2):211-224.
- Murone M, Rosenthal A and de Sauvage FJ (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* **9**(2):76-84.
- Nakano Y, Nystedt S, Shivdasani AA, Strutt H, Thomas C and Ingham PW (2004) Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein Smoothed in *Drosophila*. *Mechanisms of development* **121**(6):507-518.

- Nehme R, Joubert O, Bidet M, Lacombe B, Polidori A, Pucci B and Mus-Veteau I (2010) Stability study of the human G-protein coupled receptor, Smoothened. *Biochimica et biophysica acta* **1798**(6):1100-1110.
- Ng JM and Curran T (2011) The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer* **11**(7):493-501.
- Nielsen SK, Mollgard K, Clement CA, Veland IR, Awan A, Yoder BK, Novak I and Christensen ST (2008) Characterization of primary cilia and Hedgehog signaling during development of the human pancreas and in human pancreatic duct cancer cell lines. *Dev Dyn* **237**(8):2039-2052.
- Nilsson M, Unden AB, Krause D, Malmqwist U, Raza K, Zaphiropoulos PG and Toftgard R (2000) Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(7):3438-3443.
- Noveen A, Jiang TX and Chuong CM (1996) cAMP, an activator of protein kinase A, suppresses the expression of sonic hedgehog. *Biochemical and biophysical research communications* **219**(1):180-185.
- Nusslein-Volhard C and Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**(5785):795-801.
- O'Toole SA, Machalek DA, Shearer RF, Millar EK, Nair R, Schofield P, McLeod D, Cooper CL, McNeil CM, McFarland A, Nguyen A, Ormandy CJ, Qiu MR, Rabinovich B, Martelotto LG, Vu D, Hannigan GE, Musgrove EA, Christ D, Sutherland RL, Watkins DN and Swarbrick A (2011) Hedgehog Overexpression Is Associated with Stromal Interactions and Predicts for Poor Outcome in Breast Cancer. *Cancer research* **71**(11):4002-4014.
- Ocbina PJ, Eggenschwiler JT, Moskowitz I and Anderson KV (2011) Complex interactions between genes controlling trafficking in primary cilia. *Nature genetics* **43**(6):547-553.
- Ogden SK, Ascano M, Jr., Stegman MA, Suber LM, Hooper JE and Robbins DJ (2003) Identification of a functional interaction between the transmembrane protein Smoothened and the kinesin-related protein Costal2. *Curr Biol* **13**(22):1998-2003.
- Ogden SK, Fei DL, Schilling NS, Ahmed YF, Hwa J and Robbins DJ (2008) G protein Galphai functions immediately downstream of Smoothened in Hedgehog signalling. *Nature* **456**(7224):967-970.
- Ohlig S, Farshi P, Pickhinke U, van den Boom J, Hoing S, Jakushev S, Hoffmann D, Dreier R, Scholer HR, Dierker T, Bordych C and Grobe K (2011) Sonic hedgehog shedding results in functional activation of the solubilized protein. *Developmental cell* **20**(6):764-774.
- Ohlmeyer JT and Kalderon D (1998) Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* **396**(6713):749-753.
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, Tessier-Lavigne M and McConnell SK (2006) Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* **444**(7117):369-373.
- Okada H, Koyanagi T, Yamada N and Haga T (1991) Synthesis and antitumor activities of novel benzoylphenylurea derivatives. *Chemical & pharmaceutical bulletin* **39**(9):2308-2315.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, Madhu B, Goldgraben MA, Caldwell ME, Allard D, Frese KK, Denicola G, Feig C, Combs C, Winter SP, Ireland-Zecchini H, Reichelt S, Howat WJ, Chang A, Dhara M, Wang L, Ruckert F, Grutzmann R, Pilarsky C, Izeradjene K, Hingorani SR, Huang P, Davies SE, Plunkett W, Egorin M, Hruban RH, Whitebread N, McGovern K, Adams J,

- Iacobuzio-Donahue C, Griffiths J and Tuveson DA (2009) Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, NY)* **324**(5933):1457-1461.
- Oliver TG, Grasdeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP and Wechsler-Reya RJ (2003) Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(12):7331-7336.
- Ontoria JM, Bufi LL, Torrisi C, Bresciani A, Giomini C, Rowley M, Serafini S, Bin H, Hao W, Steinkuhler C and Jones P (2011) Identification of a series of 4-[3-(quinolin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]piperazinyl ureas as potent smoothed antagonist hedgehog pathway inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**(18):5274-5282.
- Oro AE and Higgins K (2003) Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Developmental biology* **255**(2):238-248.
- Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH, Jr. and Scott MP (1997) Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science (New York, NY)* **276**(5313):817-821.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science (New York, NY)* **289**(5480):739-745.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A and Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development (Cambridge, England)* **132**(2):335-344.
- Pan S WX, Jiang J, Gao W, Wan Y, Cheng D, Han D, Liu J, Englund N, Wang Y, Peukert S, Miller-Moslin K, Yuan J, Guo R, Matsumoto M, Vattay A, Jiang Y, Tsao J, Sun F, Pferdekamper AM, Dodd S, Tuntland T, Maniara W, Kelleher J, Yao Y, Warmuth M, Williams J, Dorsch M (2010) Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **1**(3):130-134.
- Panakova D, Sprong H, Marois E, Thiele C and Eaton S (2005) Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* **435**(7038):58-65.
- Papanikolaou T, Lenington JB, Betz A, Figueiredo C, Salamone JD and Conover JC (2008) In vitro generation of dopaminergic neurons from adult subventricular zone neural progenitor cells. *Stem cells and development* **17**(1):157-172.
- Parker DS, White MA, Ramos AI, Cohen BA and Barolo S (2011) The cis-Regulatory Logic of Hedgehog Gradient Responses: Key Roles for Gli Binding Affinity, Competition, and Cooperativity. *Science signaling* **4**(176):ra38.
- Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR and Mirsky R (1999) Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* **23**(4):713-724.
- Parra LM and Zou Y (2010) Sonic hedgehog induces response of commissural axons to Semaphorin repulsion during midline crossing. *Nature neuroscience* **13**(1):29-35.
- Pasca di Magliano M and Hebrok M (2003) Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* **3**(12):903-911.
- Pascual O, Traiffort E, Baker DP, Galdes A, Ruat M and Champagnat J (2005) Sonic hedgehog signalling in neurons of adult ventrolateral nucleus tractus solitarius. *The European journal of neuroscience* **22**(2):389-396.

- Pazzaglia S, Mancuso M, Atkinson MJ, Tanori M, Rebessi S, Majo VD, Covelli V, Hahn H and Saran A (2002) High incidence of medulloblastoma following X-ray-irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice. *Oncogene* **21**(49):7580-7584.
- Pedersen LB and Rosenbaum JL (2008) Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Current topics in developmental biology* **85**:23-61.
- Peng LF, Stanton BZ, Maloof N, Wang X and Schreiber SL (2009) Syntheses of aminoalcohol-derived macrocycles leading to a small-molecule binder to and inhibitor of Sonic Hedgehog. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**(22):6319-6325.
- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA and Galdes A (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *The Journal of biological chemistry* **273**(22):14037-14045.
- Persson M, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J and Briscoe J (2002) Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes & development* **16**(22):2865-2878.
- Petralia RS, Schwartz CM, Wang YX, Mattson MP and Yao PJ (2011) Subcellular localization of patched and smoothed, the receptors for sonic hedgehog signaling, in the hippocampal neuron. *The Journal of comparative neurology*.
- Peukert S, Jain RK, Geisser A, Sun Y, Zhang R, Bourret A, Carlson A, Dasilva J, Ramamurthy A and Kelleher JF (2009) Identification and structure-activity relationships of ortho-biphenyl carboxamides as potent Smoothed antagonists inhibiting the Hedgehog signaling pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**(2):328-331.
- Peukert S and Miller-Moslin K (2010) Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. *ChemMedChem* **5**(4):500-512.
- Po A, Ferretti E, Miele E, De Smaele E, Paganelli A, Canettieri G, Coni S, Di Marcotullio L, Biffoni M, Massimi L, Di Rocco C, Screpanti I and Gulino A (2010) Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *The EMBO journal* **29**(15):2646-2658.
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T and Isner JM (2001) The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature medicine* **7**(6):706-711.
- Polizio AH, Chinchilla P, Chen X, Kim S, Manning DR and Riobo NA (2011) Heterotrimeric G proteins link hedgehog signaling to activation of rho small GTPases to promote fibroblast migration. *The Journal of biological chemistry* **286**(22):19589-19596.
- Pons S, Trejo JL, Martinez-Morales JR and Marti E (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development (Cambridge, England)* **128**(9):1481-1492.
- Porter FD and Herman GE (2011) Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *Journal of lipid research* **52**(1):6-34.
- Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV and Beachy PA (1996a) Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* **86**(1):21-34.
- Porter JA, Young KE and Beachy PA (1996b) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science (New York, NY)* **274**(5285):255-259.
- Putoux A, Thomas S, Coene KL, Davis EE, Alanay Y, Ogur G, Uz E, Buzas D, Gomes C, Patrier S, Bennett CL, Elkhartoufi N, Frison MH, Rigonnot L, Joye N, Pruvost S,

- Utine GE, Boduroglu K, Nitschke P, Fertitta L, Thauvin-Robinet C, Munnich A, Cormier-Daire V, Hennekam R, Colin E, Akarsu NA, Bole-Feysot C, Cagnard N, Schmitt A, Goudin N, Lyonnet S, Encha-Razavi F, Siffroi JP, Winey M, Katsanis N, Gonzales M, Vekemans M, Beales PL and Attie-Bitach T (2011) KIF7 mutations cause fetal hydroletharus and acrocallosal syndromes. *Nature genetics* **43**(6):601-606.
- Qin J, Lin Y, Norman RX, Ko HW and Eggenschwiler JT (2011) Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(4):1456-1461.
- Radestock S, Weil T and Renner S (2008) Homology model-based virtual screening for GPCR ligands using docking and target-biased scoring. *Journal of chemical information and modeling* **48**(5):1104-1117.
- Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T and Reifenberger G (2005) Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *The British journal of dermatology* **152**(1):43-51.
- Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P and Reifenberger G (1998) Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer research* **58**(9):1798-1803.
- Reilly JO, Karavanova ID, Williams KP, Mahanthappa NK and Allendoerfer KL (2002) Cooperative effects of Sonic Hedgehog and NGF on basal forebrain cholinergic neurons. *Molecular and cellular neurosciences* **19**(1):88-96.
- Rifai Y, Arai MA, Sadhu SK, Ahmed F and Ishibashi M (2011) New Hedgehog/GLI signaling inhibitors from *Excoecaria agallocha*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**(2):718-722.
- Rink JC, Gurley KA, Elliott SA and Sanchez Alvarado A (2009) Planarian Hh signaling regulates regeneration polarity and links Hh pathway evolution to cilia. *Science (New York, NY)* **326**(5958):1406-1410.
- Riobo NA, Lu K, Ai X, Haines GM and Emerson CP, Jr. (2006a) Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(12):4505-4510.
- Riobo NA and Manning DR (2007) Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *The Biochemical journal* **403**(3):369-379.
- Riobo NA, Saucy B, Dilizio C and Manning DR (2006b) Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(33):12607-12612.
- Robarge KD, Brunton SA, Castaneda GM, Cui Y, Dina MS, Goldsmith R, Gould SE, Guichert O, Gunzner JL, Halladay J, Jia W, Khojasteh C, Koehler MF, Kotkow K, La H, Lalonde RL, Lau K, Lee L, Marshall D, Marsters JC, Jr., Murray LJ, Qian C, Rubin LL, Salphati L, Stanley MS, Stibbard JH, Sutherlin DP, Ubhayaker S, Wang S, Wong S and Xie M (2009) GDC-0449-a potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**(19):5576-5581.
- Roelink H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA and Jessell TM (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**(3):445-455.
- Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB and Scott MP (2009) Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(9):3196-3201.
- Rohatgi R, Milenkovic L and Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science (New York, NY)* **317**(5836):372-376.
- Rohatgi R and Scott MP (2007) Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nature cell biology* **9**(9):1005-1009.
- Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL and Curran T (2004) Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer cell* **6**(3):229-240.
- Rominger CM, Bee WL, Copeland RA, Davenport EA, Gilmartin A, Gontarek R, Hornberger KR, Kallal LA, Lai Z, Lawrie K, Lu Q, McMillan L, Truong M, Tummino PJ, Turunen B, Will M, Zuercher WJ and Rominger DH (2009) Evidence for allosteric interactions of antagonist binding to the smoothed receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**(3):995-1005.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG and Kobilka BK (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**(7245):356-363.
- Roudaut H, Traiffort E, Gorojankina T, Vincent L, Faure H, Schoenfelder A, Mann A, Manetti F, Solinas A, Taddei M and Ruat M (2011) Identification and mechanism of action of the acylguanidine MRT-83, a novel potent Smoothed antagonist. *Molecular pharmacology* **79**(3):453-460.
- Rubin JB, Choi Y and Segal RA (2002) Cerebellar proteoglycans regulate sonic hedgehog responses during development. *Development (Cambridge, England)* **129**(9):2223-2232.
- Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ and Low JA (2009) Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *The New England journal of medicine* **361**(12):1173-1178.
- Ruel L, Rodriguez R, Gallet A, Lavenant-Staccini L and Therond PP (2003) Stability and association of Smoothed, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nature cell biology* **5**(10):907-913.
- Ruiz-Perez VL, Blair HJ, Rodriguez-Andres ME, Blanco MJ, Wilson A, Liu YN, Miles C, Peters H and Goodship JA (2007) Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia. *Development (Cambridge, England)* **134**(16):2903-2912.
- Ruiz i Altaba A, Mas C and Stecca B (2007) The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends in cell biology* **17**(9):438-447.
- Rush SZ, Abel TW, Valadez JG, Pearson M and Cooper MK (2010) Activation of the Hedgehog pathway in pilocytic astrocytomas. *Neuro-oncology* **12**(8):790-798.
- Saczewski F and Balewski L (2009) Biological activities of guanidine compounds. *Expert opinion on therapeutic patents* **19**(10):1417-1448.
- Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S and Ruiz i Altaba A (2004) Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(34):12561-12566.
- Sang L, Miller JJ, Corbit KC, Giles RH, Brauer MJ, Otto EA, Baye LM, Wen X, Scales SJ, Kwong M, Huntzicker EG, Sfakianos MK, Sandoval W, Bazan JF, Kulkarni P, Garcia-Gonzalo FR, Seol AD, O'Toole JF, Held S, Reutter HM, Lane WS, Rafiq MA, Noor A, Ansar M, Devi AR, Sheffield VC, Slusarski DC, Vincent JB, Doherty DA,

- Hildebrandt F, Reiter JF and Jackson PK (2011) Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell* **145**(4):513-528.
- Scales SJ and de Sauvage FJ (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in pharmacological sciences* **30**(6):303-312.
- Schneider E, Keller M, Brennauer A, Hoefelschweiger BK, Gross D, Wolfbeis OS, Bernhardt G and Buschauer A (2007) Synthesis and characterization of the first fluorescent nonpeptide NPY Y1 receptor antagonist. *Chembiochem* **8**(16):1981-1988.
- Schulte G (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacological reviews* **62**(4):632-667.
- Scott CE, Wynn SL, Sesay A, Cruz C, Cheung M, Gomez Gaviro MV, Booth S, Gao B, Cheah KS, Lovell-Badge R and Briscoe J (2010) SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nature neuroscience* **13**(10):1181-1189.
- Seppala M, Depew MJ, Martinelli DC, Fan CM, Sharpe PT and Cobourne MT (2007) Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *The Journal of clinical investigation* **117**(6):1575-1584.
- Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR and Mirsky R (2006) The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. *J Neurosci* **26**(23):6364-6376.
- Shaw-Smith C (2010) Genetic factors in esophageal atresia, tracheo-esophageal fistula and the VACTERL association: roles for FOXF1 and the 16q24.1 FOX transcription factor gene cluster, and review of the literature. *European journal of medical genetics* **53**(1):6-13.
- Sheng H, Goich S, Wang A, Grachtchouk M, Lowe L, Mo R, Lin K, de Sauvage FJ, Sasaki H, Hui CC and Dlugosz AA (2002) Dissecting the oncogenic potential of Gli2: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype. *Cancer research* **62**(18):5308-5316.
- Singh S, Wang Z, Liang Fei D, Black KE, Goetz JA, Tokhunts R, Giambelli C, Rodriguez-Blanco J, Long J, Lee E, Briegel KJ, Bejarano PA, Dmitrovsky E, Capobianco AJ and Robbins DJ (2011) Hedgehog-Producing Cancer Cells Respond to and Require Autocrine Hedgehog Activity. *Cancer research* **71**(13):4454-4463.
- Sinha S and Chen JK (2006) Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened. *Nature chemical biology* **2**(1):29-30.
- Skvara H, Kalthoff F, Meingassner JG, Wolff-Winiski B, Aschauer H, Kelleher JF, Wu X, Pan S, Mickel L, Schuster C, Stary G, Jalili A, David OJ, Emotte C, Antunes AM, Rose K, Decker J, Carlson I, Gardner H, Stuetz A, Bertolino AP, Stingl G and De Rie MA (2011) Topical Treatment of Basal Cell Carcinomas in Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome with a Smoothened Inhibitor. *The Journal of investigative dermatology* **131**(8):1735-1744.
- Soignet SL, Frankel SR, Douer D, Tallman MS, Kantarjian H, Calleja E, Stone RM, Kalaycio M, Scheinberg DA, Steinherz P, Sievers EL, Coutre S, Dahlberg S, Ellison R and Warrell RP, Jr. (2001) United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* **19**(18):3852-3860.
- Sotelo C (2004) Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Progress in neurobiology* **72**(5):295-339.
- Spassky N, Han YG, Aguilar A, Strehl L, Besse L, Laclef C, Ros MR, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A (2008) Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Developmental biology* **317**(1):246-259.

- Stanton BZ and Peng LF (2010) Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Molecular bioSystems* **6**(1):44-54.
- Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, Taveras KM, Hyman JM, Lee SW, Koehler AN, Chen JK, Fox JL, Mandinova A and Schreiber SL (2009) A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nature chemical biology* **5**(3):154-156.
- Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F and Ruiz IAA (2007) Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(14):5895-5900.
- Stecca B and Ruiz i Altaba A (2009) A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *The EMBO journal* **28**(6):663-676.
- Steinhauer J and Treisman JE (2009) Lipid-modified morphogens: functions of fats. *Current opinion in genetics & development* **19**(4):308-314.
- Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F and Rosenthal A (1996) The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**(6605):129-134.
- Strand MF, Wilson SR, Dembinski JL, Holsworth DD, Khvat A, Okun I, Petersen D and Krauss S (2011) A novel synthetic smoothed antagonist transiently inhibits pancreatic adenocarcinoma xenografts in a mouse model. *PloS one* **6**(6):e19904.
- Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM and Ingham PW (2001) Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation. *Curr Biol* **11**(8):608-613.
- Su Y, Ospina JK, Zhang J, Michelson AP, Schoen AM and Zhu AJ (2011) Sequential phosphorylation of smoothed transduces graded hedgehog signaling. *Science signaling* **4**(180):ra43.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP and Beachy PA (2000) Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**(6799):1005-1009.
- Taipale J, Cooper MK, Maiti T and Beachy PA (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* **418**(6900):892-897.
- Tang JY, Xiao TZ, Oda Y, Chang KS, Shpall E, Wu A, So PL, Hebert J, Bikle D and Epstein EH, Jr. (2011a) Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in murine Basal cell carcinomas. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa)* **4**(5):744-751.
- Tang T, Tang JY, Li D, Reich M, Callahan CA, Fu L, Yauch RL, Wang F, Kotkow K, Chang KS, Shpall E, Wu A, Rubin LL, Marsters JC, Jr., Epstein EH, Jr., Caro I and de Sauvage FJ (2011b) Targeting superficial or nodular Basal cell carcinoma with topically formulated small molecule inhibitor of smoothed. *Clin Cancer Res* **17**(10):3378-3387.
- Tao H, Jin Q, Koo DI, Liao X, Englund NP, Wang Y, Ramamurthy A, Schultz PG, Dorsch M, Kelleher J and Wu X (2011) Small molecule antagonists in distinct binding modes inhibit drug-resistant mutant of smoothed. *Chemistry & biology* **18**(4):432-437.
- Teglund S and Toftgard R (2010) Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* **1805**(2):181-208.
- Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS and McMahon AP (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Developmental cell* **10**(5):647-656.

- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL and Hebrok M (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**(6960):851-856.
- Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM and Mehlen P (2003) Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science (New York, NY)* **301**(5634):843-846.
- Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A and Gilbertson RJ (2006) Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* **24**(12):1924-1931.
- Thorne N, Auld DS and Inglese J (2010) Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference. *Current opinion in chemical biology* **14**(3):315-324.
- Tian F, Mysliwicz J, Ellwart J, Gamarra F, Huber RM and Bergner A (2011) Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations. *Clinical and experimental medicine*.
- Tian H, Callahan CA, DuPree KJ, Darbonne WC, Ahn CP, Scales SJ and de Sauvage FJ (2009) Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(11):4254-4259.
- Tokhunts R, Singh S, Chu T, D'Angelo G, Baubet V, Goetz JA, Huang Z, Yuan Z, Ascano M, Zavros Y, Therond PP, Kunes S, Dahmane N and Robbins DJ (2010) The full-length unprocessed hedgehog protein is an active signaling molecule. *The Journal of biological chemistry* **285**(4):2562-2568.
- Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R and Unden AB (2006) Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *The Journal of pathology* **208**(1):17-25.
- Tostar U, Toftgard R, Zaphiropoulos PG and Shimokawa T (2010) Reduction of human embryonal rhabdomyosarcoma tumor growth by inhibition of the hedgehog signaling pathway. *Genes & cancer* **1**(9):941-951.
- Traiffort E, Angot E and Ruat M (2010) Sonic Hedgehog signaling in the mammalian brain. *Journal of neurochemistry* **113**(3):576-590.
- Traiffort E, Charytoniuk D, Watroba L, Faure H, Sales N and Ruat M (1999) Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *The European journal of neuroscience* **11**(9):3199-3214.
- Traiffort E, Charytoniuk DA, Faure H and Ruat M (1998) Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *Journal of neurochemistry* **70**(3):1327-1330.
- Traiffort E, Dubourg C, Faure H, Rognan D, Odent S, Durou MR, David V and Ruat M (2004) Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *The Journal of biological chemistry* **279**(41):42889-42897.
- Traiffort E, Moya KL, Faure H, Hassig R and Ruat M (2001) High expression and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *The European journal of neuroscience* **14**(5):839-850.
- Tran PV, Haycraft CJ, Besschetnova TY, Turbe-Doan A, Stottmann RW, Herron BJ, Chesebro AL, Qiu H, Scherz PJ, Shah JV, Yoder BK and Beier DR (2008) THM1

- negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nature genetics* **40**(4):403-410.
- Tremblay MR, Lescarbeau A, Grogan MJ, Tan E, Lin G, Austad BC, Yu LC, Behnke ML, Nair SJ, Hagel M, White K, Conley J, Manna JD, Alvarez-Diez TM, Hoyt J, Woodward CN, Sydor JR, Pink M, MacDougall J, Campbell MJ, Cushing J, Ferguson J, Curtis MS, McGovern K, Read MA, Palombella VJ, Adams J and Castro AC (2009) Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *Journal of medicinal chemistry* **52**(14):4400-4418.
- Tremblay MR, McGovern K, Read MA and Castro AC (2010) New developments in the discovery of small molecule Hedgehog pathway antagonists. *Current opinion in chemical biology* **14**(3):428-435.
- Tremblay MR, Nevalainen M, Nair SJ, Porter JR, Castro AC, Behnke ML, Yu LC, Hagel M, White K, Faia K, Grenier L, Campbell MJ, Cushing J, Woodward CN, Hoyt J, Foley MA, Read MA, Sydor JR, Tong JK, Palombella VJ, McGovern K and Adams J (2008) Semisynthetic cyclopamine analogues as potent and orally bioavailable hedgehog pathway antagonists. *Journal of medicinal chemistry* **51**(21):6646-6649.
- Trousse F, Marti E, Gruss P, Torres M and Bovolenta P (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development (Cambridge, England)* **128**(20):3927-3936.
- Tsuboi K and Shults CW (2002) Intrastratial injection of sonic hedgehog reduces behavioral impairment in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* **173**(1):95-104.
- Tzelepi V, Karlou M, Wen S, Hoang A, Logothetis C, Troncoso P and Efstathiou E (2011) Expression of hedgehog pathway components in prostate carcinoma microenvironment: shifting the balance towards autocrine signalling. *Histopathology* **58**(7):1037-1047.
- Uden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R and Vorechovsky I (1996) Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer research* **56**(20):4562-4565.
- van den Heuvel M and Ingham PW (1996) smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* **382**(6591):547-551.
- Varjosalo M, Li SP and Taipale J (2006) Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between Drosophila and mammals. *Developmental cell* **10**(2):177-186.
- Varjosalo M and Taipale J (2008) Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development* **22**(18):2454-2472.
- Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P and Ruiz i Altaba A (2009) Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO molecular medicine* **1**(6-7):338-351.
- Vassal G (2009) Will children with cancer benefit from the new European Paediatric Medicines Regulation? *Eur J Cancer* **45**(9):1535-1546.
- Vescovi AL, Galli R and Reynolds BA (2006) Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**(6):425-436.
- Visvader JE and Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* **8**(10):755-768.
- Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR, Mackey HM, Lum BL, Darbonne WC, Marsters JC, Jr., de

- Sauvage FJ and Low JA (2009) Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *The New England journal of medicine* **361**(12):1164-1172.
- Vyas N, Goswami D, Manonmani A, Sharma P, Ranganath HA, VijayRaghavan K, Shashidhara LS, Sowdhamini R and Mayor S (2008) Nanoscale organization of hedgehog is essential for long-range signaling. *Cell* **133**(7):1214-1227.
- Wallace VA (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* **9**(8):445-448.
- Wallace VA and Raff MC (1999) A role for Sonic hedgehog in axon-to-astrocyte signalling in the rodent optic nerve. *Development (Cambridge, England)* **126**(13):2901-2909.
- Walter K, Omura N, Hong SM, Griffith M, Vincent A, Borges M and Goggins M (2010) Overexpression of smoothened activates the sonic hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer-associated fibroblasts. *Clin Cancer Res* **16**(6):1781-1789.
- Wang GY, Wang J, Mancianti ML and Epstein EH, Jr. (2011) Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1(+/-) mice. *Cancer cell* **19**(1):114-124.
- Wang J, Lu J, Bond MC, Chen M, Ren XR, Lyerly HK, Barak LS and Chen W (2010) Identification of select glucocorticoids as Smoothened agonists: potential utility for regenerative medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(20):9323-9328.
- Wang L, Zhang ZG, Gregg SR, Zhang RL, Jiao Z, LeTourneau Y, Liu X, Feng Y, Gerwien J, Torup L, Leist M, Noguchi CT, Chen ZY and Chopp M (2007) The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *The Journal of biological chemistry* **282**(44):32462-32470.
- Wang Y, Zhou Z, Walsh CT and McMahon AP (2009) Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(8):2623-2628.
- Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA and Baylin SB (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature* **422**(6929):313-317.
- Weatherbee SD, Niswander LA and Anderson KV (2009) A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Human molecular genetics* **18**(23):4565-4575.
- Wechsler-Reya RJ and Scott MP (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* **22**(1):103-114.
- Wen X, Lai CK, Evangelista M, Hongo JA, de Sauvage FJ and Scales SJ (2010) Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Molecular and cellular biology* **30**(8):1910-1922.
- Wetmore C, Eberhart DE and Curran T (2000) The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer research* **60**(8):2239-2246.
- Wetmore C, Eberhart DE and Curran T (2001) Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer research* **61**(2):513-516.
- Williams EH, Pappano WN, Saunders AM, Kim MS, Leahy DJ and Beachy PA (2010) Dally-like core protein and its mammalian homologues mediate stimulatory and inhibitory effects on Hedgehog signal response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(13):5869-5874.
- Williams JA, Guicherit OM, Zaharian BI, Xu Y, Chai L, Wichterle H, Kon C, Gatchalian C, Porter JA, Rubin LL and Wang FY (2003) Identification of a small molecule inhibitor

- of the hedgehog signaling pathway: effects on basal cell carcinoma-like lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(8):4616-4621.
- Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK and Herz J (1996) Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(16):8460-8464.
- Wilson CW, Chen MH and Chuang PT (2009a) Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium. *PLoS one* **4**(4):e5182.
- Wilson CW and Chuang PT (2006) New "hogs" in Hedgehog transport and signal reception. *Cell* **125**(3):435-438.
- Wilson CW and Chuang PT (2010) Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development (Cambridge, England)* **137**(13):2079-2094.
- Wilson CW, Nguyen CT, Chen MH, Yang JH, Gacayan R, Huang J, Chen JN and Chuang PT (2009b) Fused has evolved divergent roles in vertebrate Hedgehog signalling and motile ciliogenesis. *Nature* **459**(7243):98-102.
- Wilson SR, Strand MF, Krapp A, Rise F, Petersen D and Krauss S (2010) Hedgehog antagonist cyclopamine isomerizes to less potent forms when acidified. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **52**(5):707-713.
- Wong H, Alicke B, West K, Pacheco P, La H, Januario T, Yauch RL, de Sauvage FJ and Gould SE (2011) PK/PD analysis of vismodegib in preclinical models of mutational and ligand-dependent hedgehog pathway activation. *Clin Cancer Res* **17**(14):4682-4692.
- Wong SY, Seol AD, So PL, Ermilov AN, Bichakjian CK, Epstein EH, Jr., Dlugosz AA and Reiter JF (2009) Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature medicine* **15**(9):1055-1061.
- Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS and Schultz PG (2002) A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *Journal of the American Chemical Society* **124**(49):14520-14521.
- Wu X, Walker J, Zhang J, Ding S and Schultz PG (2004) Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chemistry & biology* **11**(9):1229-1238.
- Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH, Jr. and de Sauvage FJ (1998) Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* **391**(6662):90-92.
- Yam PT, Langlois SD, Morin S and Charron F (2009) Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**(3):349-362.
- Yamanaka H, Oue T, Uehara S and Fukuzawa M (2011) Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft. *Journal of pediatric surgery* **46**(2):320-325.
- Yamazaki M, Nakamura K, Mizukami Y, Ii M, Sasajima J, Sugiyama Y, Nishikawa T, Nakano Y, Yanagawa N, Sato K, Maemoto A, Tanno S, Okumura T, Karasaki H, Kono T, Fujiya M, Ashida T, Chung DC and Kohgo Y (2008) Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer science* **99**(6):1131-1138.

- Yan D, Wu Y, Yang Y, Belenkaya TY, Tang X and Lin X (2010) The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development. *Development (Cambridge, England)* **137**(12):2033-2044.
- Yang H, Xiang J, Wang N, Zhao Y, Hyman J, Li S, Jiang J, Chen JK, Yang Z and Lin S (2009) Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules. *The Journal of biological chemistry* **284**(31):20876-20884.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schuller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ and Wechsler-Reya RJ (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer cell* **14**(2):135-145.
- Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, Bazan JF, Kan Z, Seshagiri S, Hann CL, Gould SE, Low JA, Rudin CM and de Sauvage FJ (2009) Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science (New York, NY)* **326**(5952):572-574.
- Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters JC, Rubin LL and de Sauvage FJ (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature* **455**(7211):406-410.
- Yavari A, Nagaraj R, Owusu-Ansah E, Folick A, Ngo K, Hillman T, Call G, Rohatgi R, Scott MP and Banerjee U (2010) Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Developmental cell* **19**(1):54-65.
- Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA and Blanpain C (2010) Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature cell biology* **12**(3):299-305.
- Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ, Jr., Schreiner CM and Robbins DJ (2001) A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* **411**(6838):716-720.
- Zhang C, Williams EH, Guo Y, Lum L and Beachy PA (2004) Extensive phosphorylation of Smoothed in Hedgehog pathway activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(52):17900-17907.
- Zhang W, Hong M, Bae GU, Kang JS and Krauss RS (2011) Boc modifies the holoprosencephaly spectrum of Cdo mutant mice. *Disease models & mechanisms* **4**(3):368-380.
- Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ and Krauss RS (2006) Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Developmental cell* **10**(5):657-665.
- Zhang X, Harrington N, Moraes RC, Wu MF, Hilsenbeck SG and Lewis MT (2009) Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothed (Smo). *Breast cancer research and treatment* **115**(3):505-521.
- Zhang XM, Ramalho-Santos M and McMahon AP (2001) Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* **106**(2):781-792.
- Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, Kwon HY, Kim J, Chute JP, Rizzieri D, Munchhof M, VanArsdale T, Beachy PA and Reya T (2009) Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* **458**(7239):776-779.
- Zhao C, Deng W and Gage FH (2008a) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**(4):645-660.

- Zhao H, Ayrault O, Zindy F, Kim JH and Roussel MF (2008b) Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes & development* **22**(6):722-727.
- Zhao Y, Tong C and Jiang J (2007) Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* **450**(7167):252-258.
- Zheng X, Mann RK, Sever N and Beachy PA (2010) Genetic and biochemical definition of the Hedgehog receptor. *Genes & development* **24**(1):57-71.
- Zhou Q and Kalderon D (2011) Hedgehog Activates Fused through Phosphorylation to Elicit a Full Spectrum of Pathway Responses. *Developmental cell* **20**(6):802-814.
- Zhou Q, Wang S and Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**(2):331-343.
- Zhu AJ, Zheng L, Suyama K and Scott MP (2003) Altered localization of Drosophila Smoothened protein activates Hedgehog signal transduction. *Genes & development* **17**(10):1240-1252.
- Zhu S, Wurdak H and Schultz PG (2010) Directed embryonic stem cell differentiation with small molecules. *Future medicinal chemistry* **2**(6):965-973.

